

## Potensi Peptida Sintetik *Wolbachia* (*WolFar*) bagi Pembangunan Biopestisid Berdasarkan Kesan Perubahan Histologi Pada Sel Ovari Kumbang Merah Palma, *Rhynchophorus ferrugineus*

(Potential of Synthetic *Wolbachia* (*WolFar*) Peptide for Biopesticide Development Based on the Impression of Histological Changes in Ovary Cells of the Red Palm Weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*)

WAN NURUL 'AIN WAN MOHD. NOR<sup>1</sup>, NURUL WAHIDA OTHMAN<sup>2,3</sup>, SALMAH YAAKOP<sup>2,3</sup>, & NOREFRINA SHAFINAZ MD. NOR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Malaysian Palm Oil Board (MPOB), Wisma Dura, Lot PT 11545, No. 3, Jalan P/9b, 43650 Bandar Baru Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>2</sup>Pusat Sistemik Serangga, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

<sup>3</sup>Jabatan Sains Biologi dan Bioteknologi, Fakulti Sains dan Teknologi, Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 UKM Bangi, Selangor, Malaysia

Diserahkan: 30 April 2024/Diterima: 7 Ogos 2024

### ABSTRAK

Pendekatan alternatif perlu diterokai dengan mengkaji potensi membangunkan biopestisid berdasarkan aplikasi kawalan biologi menggunakan nematoda, virus dan jangkitan bakteria terhadap serangga perosak untuk menawarkan penyelesaian yang lebih khusus dan lebih selamat berbanding racun kimia. *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) merupakan bakteria endosimbiotik yang telah mendapat banyak perhatian dan lebih dari sedekad ia digunakan secara meluas terhadap pelbagai pengurusan perosak dan vektor kerana mereka menunjukkan perubahan fisiologi sistem pembiakan dalam serangga yang dijangkiti. Berbanding menggunakan seluruh organisma sebagai agen kawalan biologi, novel *Wolbachia* sintetik peptida, *WolFar* telah disesuaikan dari kawasan yang dipelihara protein permukaan *Wolbachia* (*wsp*) dan pertama kali diuji pada spesies perosak invasif, kumbang merah palma (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus*. Kajian ini telah dijalankan untuk mengenal pasti kesan peptida *WolFar* berbeza kepekatan (0.83 mmol/L dan 1.66 mmol/L) terhadap perubahan sel ovari RPW menggunakan teknik histologi dan pewarnaan H&E. Hasil menunjukkan *WolFar* boleh dimanipulasi sebagai biopestisid yang berpotensi untuk RPW kerana ia menyebabkan perubahan tidak normal pada histologi sel selepas rawatan. Penemuan baharu kajian ini menunjukkan bahawa peptida berasaskan *Wolbachia*, *WolFar* mempunyai potensi besar sebagai alat baharu untuk dibangunkan sebagai formulasi biopestisid untuk mengawal populasi RPW.

Kata kunci: Agen kawalan biologi; histopatologi; kumbang perosak

### ABSTRACT

An alternative approach should be explored by examining the potential of developing a biopesticide based on biological control application using nematodes, viruses, and bacterial infection towards insect pests to offer more specific solutions. *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is a common inheritable endosymbiotic bacterium has received much attention and been broadly used for over a decade against various pest and vector management as they manifest physiological changes in infected insects. Rather than using whole organisms as a biological control agent, a novel *Wolbachia* synthetic peptide, *WolFar* was customized from a conserved region of the *Wolbachia* surface protein (*wsp*) and first tested on invasive pest species, the red palm weevil (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus*. A study was conducted to identify the effects of *WolFar* synthetic peptide on the histology on the RPW cell ovary. Results have shown *WolFar* could be manipulated as a potential biopesticide for RPW as it triggered immune system of RPW by causing abnormalities on the RPW cell histology after treatment. The promising finding of this study indicates that *Wolbachia*-based peptide, *WolFar* has huge potential as a new tool to be developed as a biopesticide formulation to control the population of RPW and probably other insect pests in the future.

Keywords: Biological control agent; histopathology; pest beetle

## PENGENALAN

Kumbang Merah Palma (RPW), *Rhynchophorus ferrugineus* yang merupakan serangga perosak pokok palma di seluruh dunia mampu menghasilkan telur sehingga 530 telur sepanjang 120 hari jangka hayatnya (Mahmud, Farminhao & Viez 2015). Penghasilan telur yang banyak oleh serangga perosak ini telah menjadi salah satu faktor utama yang menyumbang kepada kerosakan pokok palma yang sukar dikawal. Justeru, proses oogenesis boleh dijadikan sebagai sasaran yang menarik dalam membentuk strategi yang khusus dalam mengawal populasi serangga perosak atau vektor penyakit kepada manusia dan haiwan peliharaan (Büning 1994; Yang et al. 2021).

Terdapat beberapa kajian terdahulu yang juga memfokuskan kepada perubahan histologi organ pembiakan betina RPW dalam usaha mengawal serangga perosak ini. Sebagai contoh, kajian yang dilakukan oleh El-Bokl et al. (2010) yang melihat kesan pengawal atur pertumbuhan serangga sintetik, *flufenoxuron* yang bertindak sebagai perencat sintesis kitin terhadap histologi organ pembiakan betina RPW. *Flufenoxuron* telah mengganggu penghasilan gamet melalui tindakan terhadap timbunan pada granul kuning telur semasa vitelogenesis dan sel epitelial folikular. Selain itu, kajian oleh El Naggat, Mohamed dan Mahmoud (2010) pula telah melihat kesan sinar gamma. Sinar gamma yang tinggi telah menyebabkan pemanjangan pada filamen penghujung, pemecahan atau pengecutan pada epitelium folikular dan selaput luar ovariol, kemerosotan atau ketiadaan sel perawat serta pemecahan oosit.

*Wolbachia* sangat sinonim dengan kebolehnya yang mampu mengubah sistem reproduksi perumahannya melalui feminisasi, kematian jantan, partenogenesis dan ketidaksesuaian sitoplasma. Kesan *Wolbachia* pada perumah ini telah digunakan bagi kawalan vektor penyakit seperti nyamuk *Aedes* dan *Culex* dengan penghasilan nyamuk terjangkit dengan endosimbion ini. Penyelidikan ini membuktikan pelepasan nyamuk terjangkit dengan *Wolbachia* pada persekitaran telah mengurangkan jangkitan dan penyebaran penyakit seperti malaria, chikungunya, denggi, filiriasis, zika, demam kuning dan demam *West Nile* (Minwuyet et al. 2023). Namun begitu, *Wolbachia* juga dilaporkan memainkan peranan penting dalam pembentukan ovari ulat sutera (Zha et al. 2014) kerana tanpa kehadiran *Wolbachia*, ovari ulat sutera didapati menunjukkan fenotip ovari yang tidak normal yang mana struktur oviduktusnya lebih pendek berbanding ovari normal dan bilangan telur yang dihasilkan juga lebih sedikit. Selain itu, *Wolbachia* juga membantu dalam penghasilan oosit pada kumbang air beras, *Lissorhoptrus oryzophilus* (Chen et al. 2012) kerana dengan penyingkiran *Wolbachia* daripada kumbang ini melalui rawatan Tetracycline, daya biak kumbang ini telah menurun secara signifikan dan telur yang dihasilkan juga tidak mampu hidup. Akibat kesan *Wolbachia* yang berbeza terhadap serangga yang berlainan,

kajian terhadap organ pembiakan betina RPW ini perlu dilakukan bagi melihat kesan peptida sintetik *Wolbachia* terhadap serangga perosak ini. Oleh itu, kajian ini dilakukan untuk membandingkan perubahan morfometri ovarium RPW selain melihat perbandingan perubahan histologi ovarium RPW sebelum dan selepas disuntik dengan peptida sintetik *Wolbachia* (*WolFar*) dengan dua kepekatan yang berbeza. Hasil kajian ini dapat digunakan dalam membangunkan produk biopestisid yang lebih khusus terhadap serangga perosak ini.

## BAHAN DAN KAEDAH KAJIAN

### PERSAMPELAN DAN PENYEDIAAN SAMPEL KAJIAN

Persampelan dilakukan di lokasi yang direkodkan telah mengalami infestasi RPW yang serius berdasarkan maklumat dan perbincangan bersama Jabatan Pertanian Malaysia. Tiga lokasi tanaman pokok kelapa terpilih bagi kajian adalah Seberang Takir, Terengganu, Yan, Kedah dan Kuala Krai, Kelantan. Kaedah yang digunakan untuk aktiviti persampelan RPW adalah pemasangan perangkap dengan menggunakan feromon (700 mg feromon (P028 Ferrolure+) yang mengandungi 90% 4-metil-5-nonanol dan 10% 4-metil-5-nonanon) dan tebu sebagai umpan makanan. Sampel RPW dewasa dibawa pulang ke makmal Pusat Sistemik Serangga, UKM Bangi. Sampel ini dibiakkan dan dibela di bilik pengkulturan dengan diet tebu pada suhu bilik  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  dengan kelembapan antara 60% sehingga 80% (Norzainih et al. 2015). Fotokala adalah 12:12 (L:D).

Setiap spesimen ditimbang terlebih dahulu bagi memastikan saiz semua sampel adalah dalam julat yang sama. Umur sampel yang digunakan adalah dua minggu selepas kemunculan dewasa daripada pupa (El Naggat, Mohamed & Mahmoud 2010). Sampel kemudian diberikan dua rawatan berbeza iaitu satu kumpulan disuntik dengan 10  $\mu\text{L}$  peptida sintetik *Wolbachia* (*WolFar*) dengan molariti 0.83 mmol/L dan satu kumpulan lagi disuntik dengan peptida sintetik *Wolbachia* dengan molariti 1.66 mmol/L menggunakan jarum mikroliter Hamilton siri 700. Suntikan dilakukan di bahagian segmen antara toraks dan abdomen bagi memastikan *WolFar* bercampur dengan cecair hemolimfanya. Kepekatan yang dipilih berdasarkan kajian Mohammed et al. (2018) dengan sedikit pengubahsuaian. Setiap rawatan dan kawalan menggunakan 10 sampel RPW dewasa betina berdasarkan replikasi biologi menggunakan populasi yang sama dengan tiga kali replikasi dilakukan. Kedua-dua rawatan ini menggunakan dua sela masa iaitu 24 dan 48 jam. Rawatan kawalan negatif pula menggunakan 10  $\mu\text{L}$  air suling ternyah-ion. Syarat keadaan sekitar bagi setiap rawatan dimalarkan iaitu pada suhu  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , sistem pengudaraan yang baik dan dalam julat kelembapan 60% sehingga 80%.

#### PENYEDIAAN SLAID TISU UNTUK KAJIAN HISTOLOGI

Sampel dibedah bagi mendedahkan bahagian abdomen dan struktur yang diperlukan dikeluarkan daripada abdomen spesimen. Proses ini dijalankan berdasarkan protokol oleh Wan Nurul 'Ain dan Nurul Wahida (2021) dan tisu diwarnakan dengan menggunakan pewarnaan standard H&E. Pemerhatian histologi sel dilakukan menggunakan mikroskop cahaya *Zeiss Axio Scope* dengan perisian *iSolutionLite*.

#### HASIL

Hasil rawatan *WolFar* terhadap RPW menunjukkan perbezaan bagi kumpulan rawatan dan kawalan. Kepekatan *WolFar* dengan molariti 1.66 mmol/L memberikan kesan yang lebih signifikan berbanding 0.83 mmol/L. Terdapat perubahan morfologi yang ketara pada ovari RPW terutama zon pra-vitelogenik ovariol bagi kumpulan yang dirawat dengan kepekatan *WolFar* yang lebih tinggi. Pembentukan vakuol pada ovari yang dirawat dengan *WolFar* juga menunjukkan berlakunya kemerosotan sel.

#### STRUKTUR SEL OVARI RPW KAWALAN

Berdasarkan hasil pencerapan keratan memanjang terhadap struktur sel ovari RPW kawalan dengan pewarnaan Hematoksilin dan Eosin, organ ini mempunyai ovariol dalam kategori meroistik dan merupakan jenis politrofik kerana mempunyai sel perawat dan setiap oositnya dilengkapi dengan sel perawatnya sendiri sepanjang peringkat perkembangan oosit tersebut dalam folikel yang berasingan (Rajah 1). Ovariol serangga ini juga terbahagi kepada empat bahagian utama iaitu filamen penghujung, germarium, vitelarium dan kaliks. Filamen penghujung adalah tiub panjang yang dipenuhi dengan tisu penghubung. Germarium pula adalah bahagian anterior ovariol yang mempunyai trofosit (sel perawat) (Rajah 2).

Rajah 3(a) pula menunjukkan bahagian vitelarium pada ovariol. Vitelarium merupakan bahagian selepas germarium dan bahagian utama bagi ovariol. Vitelarium mengandungi folikel dengan oosit yang diliputi dengan lapisan epitelium folikel jenis kuboid pada bahagian luar. Oosit pada bahagian anterior (pra-vitelogenik) iaitu yang berdekatan dengan germarium dicirikan dengan mengandungi sitoplasma bergranul dan vesikel germinal serta mengandungi kandungan bersifat basofil yang lebih tinggi kerana menunjukkan warna ungu yang lebih ketara. Tambahan pula, saiz oosit dan vesikel germinal semakin membesar apabila menghampiri bahagian posterior (vitelogenik) dan kaliks. Oosit pada bahagian ini pula mempunyai sitoplasma yang dipenuhi dengan granul yolka yang berbeza saiz (Rajah 3(b)) serta sel perawatnya yang kelihatan semakin berkurang. Jarak antara sel pada bahagian sel epitelium luar semakin menjauh dan menyebabkan ruang antara sel menjadi besar.

Hasil kajian ini juga mendapati bahawa ovari RPW tidak diliputi oleh sarung secara keseluruhan. Namun, setiap ovariol mempunyai dinding yang terdiri daripada dua lapisan dikenali sebagai sarung ovariol atau sarung epitelium di bahagian luar manakala dalamnya pula adalah tunika propria (Rajah 4).

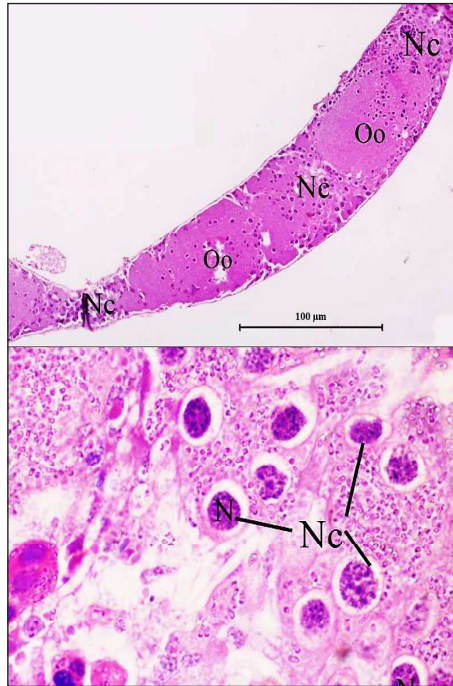
Dua bahagian hujung ovariol bagi setiap ovari didapati bercantum lalu membentuk kembangan oviduktus yang dikenali sebagai kaliks (Rajah 5(a)). Kaliks pula digarisi dengan sel epitelium kolumnar yang utuh dan berlipat serta mempunyai nukleus yang bulat serta berada pada posisi yang berbeza. Bahagian lumen kaliks dipenuhi dengan cecair rembesan yang mengandungi sisa sel (Rajah 5(b)).

Selain itu, pemerhatian terhadap keratan rentas oviduktus lateral (Rajah 6) dan oviduktus sepunya (Rajah 7(a) dan 7(b)) pula mendapati lumen pada oviduktus dikelilingi oleh lapisan intima yang tebal. Lapisan intima dilapisi oleh sel epitelium jenis kolumnar yang mempunyai struktur berlipat. Terdapat dua jenis sel otot ditemui pada oviduktus iaitu sel otot lingkar yang juga tebal melapisi sel epitelium dan sel otot longitudinal yang mengelilingi sel otot lingkar tersebut.

#### HISTOLOGI OVARI RPW SELEPAS RAWATAN PEPTIDA *WolFar*

Selepas dikenakan rawatan peptida sintetik *WolFar*, terdapat beberapa perubahan dikenal pasti seperti kemerosotan sel yang berlaku pada struktur histologi ovari RPW terutama bagi rawatan berkepekatan tinggi iaitu 1.66 mmol/L. Antara perubahan yang dikesan adalah pada bahagian terminal penghujung iaitu pembentukan vakuol pelbagai saiz di antara sel (Rajah 8(c) - 8(i)). Pembentukan vakuol dilihat semakin ketara terutamanya pada kepekatan 1.66 mmol/L dan pada jam ke-48 (Rajah 8(i) - 8(j)) berbanding RPW kawalan (Rajah 8(a) - 8(b)) yang mana tiada pembentukan vakuol dapat dikesan. Di samping itu, kedudukan sel dilihat tidak padat dan terdapat ruang antara sel pada RPW yang dikenakan rawatan peptida *WolFar* (Rajah 8(c) - 8(i)). Pewarnaan hematoksilin (ungu) juga semakin pudar pada RPW yang dikenakan rawatan peptida *WolFar* selepas 48 jam bagi kedua-dua kepekatan (Rajah 8(g) - 8(h) (0.83 mmol/L) dan Rajah 8(i) - 8(j) (1.66 mmol/L)).

Perubahan struktur sel pada kesemua empat bahagian utama ovari RPW selepas dirawat dengan peptida sintetik *WolFar* menunjukkan bahawa rawatan peptida ini telah memberi kesan secara histologi pada sistem pembiakan betina RPW. Pembentukan vakuol pada bahagian terminal penghujung dikaitkan dengan pemerosotan sel yang menyebabkannya kehilangan fungsi (Alves et al. 2014). Pembentukan vakuol juga menyebabkan wujudnya ruang antara sel. Pewarnaan hematoksilin yang semakin pudar menunjukkan bahawa kandungan protein atau DNA yang semakin berkurang pada sel selepas rawatan berbanding pada RPW kawalan (Osman et al. 2016). Menurut Buning

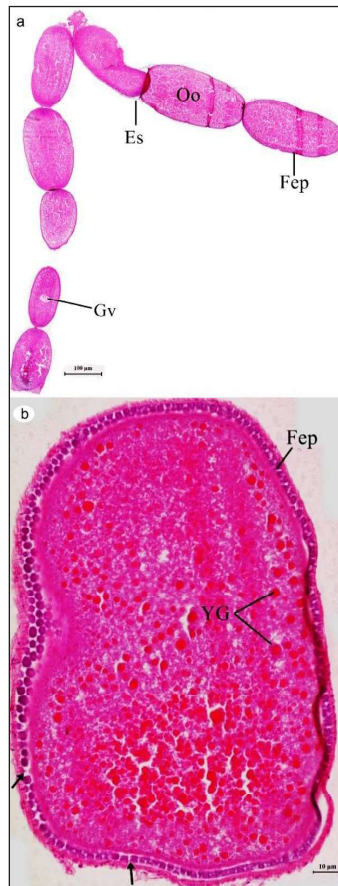


RAJAH 1. Histologi sel bagi ovariol RPW.  
 a) Keratan memanjang ovariol menunjukkan sel perawat (Nc) pada setiap oosit (Oo) (Magnifikasi 20X) dan b) Perincian sel perawat menunjukkan nukleus yang dipenuhi dengan kromatin (Magnifikasi 100X)



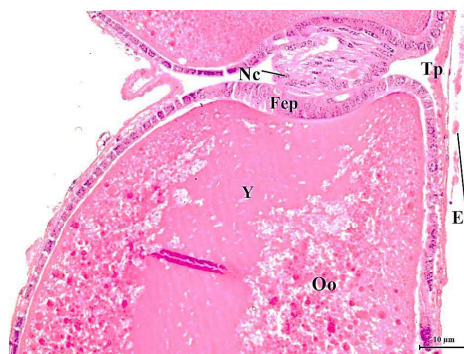
Tf: filament penghujung; G: germarium;  
 Nc: sel perawat; Es: sarung epitelium

RAJAH 2. Keratan memanjang pada bahagian terminal penghujung dan germarium RPW kawalan (Magnifikasi: 20X)



Es: sarung epitelium; Oo: oosit; Fep: epitelium folikul;  
Gv: vesikel germinal; YG: granul yolka

RAJAH 3. Keratan memanjang vitelarium pada ovariol RPW kawalan. a) Vitelarium dengan magnifikasi 10X dan b) Oosit matang dengan magnifikasi 100X yang mengandungi granul yolka dan ruang antara sel yang besar (anak panah)



Nc: sel perawat; Fep: epitelium folikel; Oo: oosit; Tp: tunika propria;  
Es: sarung epitelium; Y: granul yolka

RAJAH 4. Ovariol RPW kawalan dengan magnifikasi 100X yang menunjukkan dinding ovariol dilitupi dengan dua lapisan iaitu sarung epitelium dan tunika propria



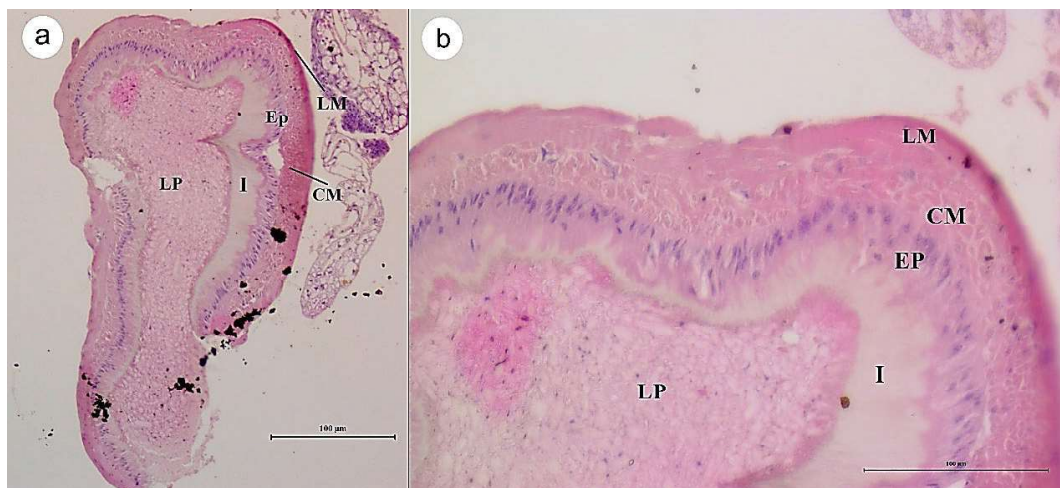
*Ep*: sel epitelium; *Es*: sarung epitelium; *S*: rembesan sel epitelium; *N*: Nukleus

RAJAH 5. Kaliks RPW kawalan. a) magnifikasi 10X dan b) Magnifikasi 20X menunjukkan sel epitelium kolumnar yang berlipat (bulatan)



L: lumen; I: intima; Ep: epitelium; CM: otot lingkar; LM: otot longitudinal

RAJAH 6. Keratan rentas oviduktus lateral RPW kawalan dengan magnifikasi 20X



LP: lamina propria; I: intima; Ep: epithelium; CM: otot lingkar; LM: otot longitudinal

RAJAH 7. Keratan rentas oviduktus sepunya RPW kawalan.  
a) magnifikasi 10X dan b) magnifikasi 40X. Skala = 100  $\mu$ m

(1994), terminal penghujung memainkan peranan penting dalam mengekalkan keutuhan ovariol. Oleh itu, kesan keabnormalan terhadap terminal penghujung RPW selepas rawatan peptida *Wolfar* terutamanya pada kepekatan 1.66 mmol/L dalam kajian ini menunjukkan ia berpotensi untuk mengakibatkan perubahan terhadap keutuhan ovari RPW. Bagi bahagian germarium pula, perubahan ketara yang dapat dilihat adalah pada sel perawat. Selepas dikenakan rawatan peptida *Wolfar*, pewarnaan nukleus pada sel perawat didapati semakin pudar dan sel perawat semakin berkurangan terutamanya selepas rawatan peptida *Wolfar* dengan kedua – dua kepekatan pada jam ke-48 (Rajah 9(d) dan 9(e)).

Perubahan pada sel perawat di bahagian germarium selepas rawatan peptida *Wolfar* adalah sama seperti laporan oleh Bakli et al. (2016), Catchot et al. (2020), Mohamed et al. (2015) serta Negm, Gabarty dan Elelimy (2022). Pemosotan sel perawat dalam kajian ini terutamanya apabila rawatan kepekatan dan masa ditingkatkan juga dilaporkan oleh Bakli et al. (2016) apabila rawatan racun serangga, Methoxyfenozide dikenakan pada rama-rama gandum, Lepidoptera, *Ephestia kuehniella* Zeller. Dalam kajian tersebut, pada rawatan LD50, sel perawat mengalami kecacatan dan berkurang pada hari ke-7 dan 9 selepas rawatan manakala apabila rawatan LD90 dikenakan, sel perawat semakin merosot. Bilangan sel perawat yang semakin berkurangan menunjukkan bahawa proses pembezaan sel terganggu yang menyebabkan degenerasi sel perawat (Glancey & Banks 1988; Negm, Gabarty & Elelimy 2022). Hal ini kerana peranan sel perawat adalah sebagai pembekal nutrisi kepada oosit. Oleh itu, gangguan kepada sel perawat akan secara tidak

langsung menyebabkan perkembangan oosit juga terjejas. Pewarnaan nukleus pada sel perawat yang semakin pudar pula menunjukkan kandungan kromatin atau DNA dalam nukleus yang semakin berkurangan dan menyebabkan sel tersebut kehilangan fungsi kerana kesan keabnormalan pada nukleus. Hal ini juga turut disokong dengan kenyataan oleh Hazaa, Alm El-Din dan El-Akhdar (2009) yang menyatakan bahawa kekurangan kandungan DNA adalah berkait dengan kegagalan oosit untuk berfungsi dengan baik bagi mendapatkan keperluan kandungan asid nukleik yang mencukupi untuk perkembangan yang normal memandangkan asid nukleik adalah penting dalam biosintesis protein selain hormon bagi serangga (Ge et al. 2009; Nijhout 2021; Ortolá & Daròs 2024).

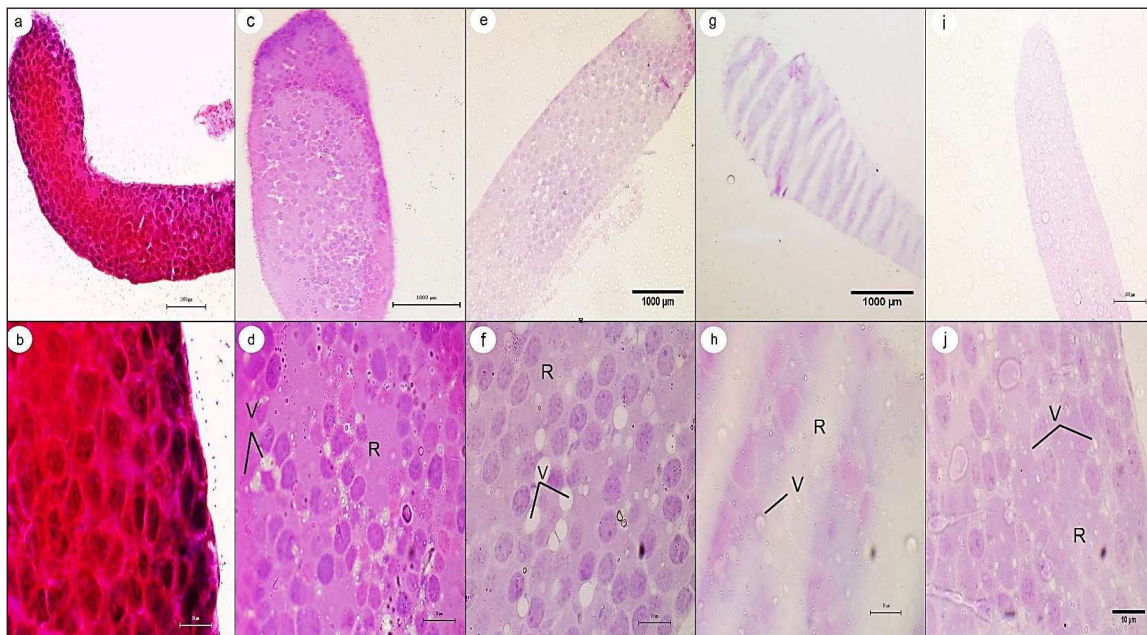
Perubahan pada bahagian pra-vitelogenik ovariol bagi bahagian vitelarium telah ditunjukkan dalam Rajah 10. Perubahan yang dapat dilihat adalah sel perawat yang semakin tidak kelihatan dan terdapat pembentukan vakuol (Rajah 10(c), 10(e), 10(g) dan 10(i)). Oosit juga berkurangan dan menyebabkan terdapatnya ruang antara oosit tersebut. Ruangan antara oosit itu dilihat semakin jelas pada rawatan kepekatan 1.66 mmol/L bagi kedua – dua sela masa iaitu pada Rajah 10(f) (24 jam) dan Rajah 10(j) (48 jam). Pewarnaan hematoksilin dan eosin semakin pudar terutamanya pada jam ke-48 selepas rawatan peptida *Wolfar* dengan kepekatan 1.66 mmol/L (Rajah 10(i) dan 10(j)) berbanding pada RPW kawalan (Rajah 10(a) dan 10(b)).

Zon pra-vitelogenik di bahagian vitelarium juga menunjukkan perubahan pada sel perawat selepas rawatan peptida *Wolfar* dan juga pembentukan vakuol. Kemerosotan pada sel perawat menyebabkan berlakunya

ruang yang luas bagi pembentukan vakuol. Di samping itu, kesan keabnormalan pada oosit di zon ini juga adalah selari dengan laporan oleh Mohamed et al. (2015). Oosit yang berkurang dikaitkan dengan sitolisis yang juga menyebabkan berlakunya ruang yang besar antara oosit terutamanya apabila ditingkatkan kepekatan rawatan *WolFar*.

Pemerhatian terhadap histopatologi zon vitelogenik juga menunjukkan perubahan selepas rawatan peptida *WolFar* dan ditunjukkan pada Rajah 11. Pemosotan pada sarung epitelium dapat dilihat terutamanya selepas rawatan peptida *WolFar* berkepekatan 1.66 mmol/L. Bentuk sel epitelium folikel pula dilihat semakin menipis dan leper berbanding bentuk asalnya iaitu kuboid selepas rawatan dan garisan sempadan antara sel juga tidak sekata serta nukleus yang tidak jelas. Granul yolka pada oosit semakin berkurang dan menunjukkan penyebarannya yang tidak sekata serta terdapat ruang antara granul yolka tersebut. Pewarnaan hematoksilin dan eosin semakin berkurang dan menyebabkan warna sel semakin pudar selepas rawatan terutamanya pada rawatan *WolFar* berkepekatan lebih tinggi (Rajah 11(e) - 11(f) dan Rajah 11(i) - 11(j)).

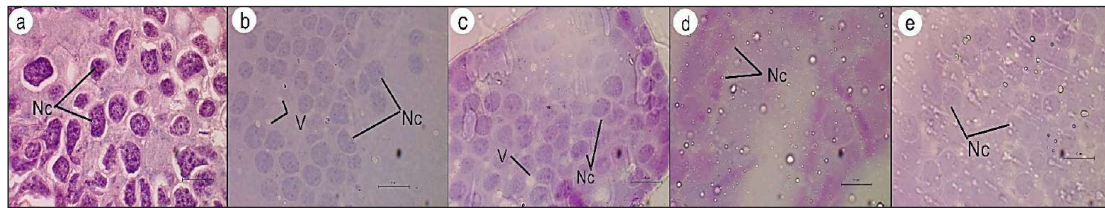
Perubahan pada zon vitelogenik di bahagian vitelarium ovariol RPW selepas rawatan peptida sintetik *WolFar* seperti pemosotan sarung epitelium adalah sama seperti yang dilaporkan oleh Mohamed et al. (2015) yang melihat kesan radiasi solar terhadap ovari kumbang kacang duduk, *C. maculatus*. Selain itu, kajian El-Naggar, Mohamed dan Mahmoud (2010) yang melihat kesan radiasi sinar gamma terhadap *R. ferrugineus* juga menunjukkan hasil yang sama. Bentuk epitelium yang menipis dan leper selepas rawatan juga turut dilaporkan dalam kajian oleh Bakli et al. (2016) yang melihat kesan racun serangga, Methoxyfenozide terhadap pertumbuhan oosit Lepidoptera, rama-rama gandum Mediterranean, *Ephestia kuehniella* Zeller. Menurut El Bokli et al. (2010), kerosakan pada epitelium folikel adalah dikaitkan dengan sel tersebut mengalami pemosotan, hiperplasia dan nekrosis dalam sel folikel. Nukleus pada epitelium folikel yang tidak jelas terutamanya pada rawatan kepekatan 1.66 mmol/L adalah berkait dengan kekurangan kandungan DNA atau kromatin dalam nukleus tersebut menyebabkan pewarnaannya menjadi pudar (Mohamed et al. 2015; Osman et al. 2016).



V: vakuol; R: ruang antara sel

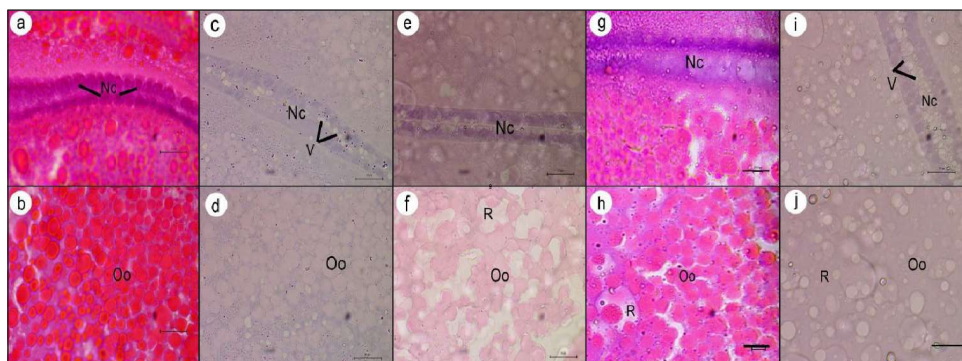
RAJAH 8. Keratan memanjang filamen penghujung RPW sebelum dan selepas rawatan peptida sintetik *WolFar* pada magnifikasi 20X (atas) dan 100X (bawah). a & b kawalan, c & d rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (24 jam), e & f rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (24 jam), g & h rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (48 jam) dan i & j rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (48 jam). Skala = 1000 µm (20X) dan 10 µm (100X)





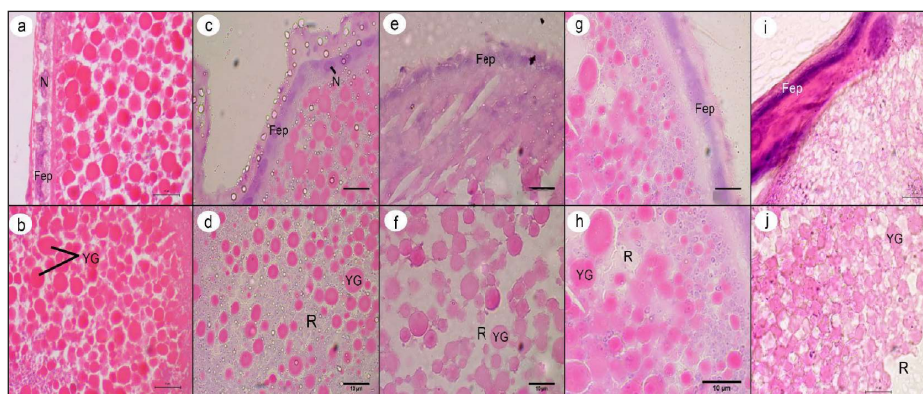
Nc: Sel perawat; V: vakuol

RAJAH 9. Keratan memanjang germarium RPW sebelum dan selepas rawatan peptida sintetik *WolFar* pada magnifikasi 100X. a) kawalan, b) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (24 jam), c) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (24 jam), d) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (48 jam) dan e) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (48 jam). Skala = 10  $\mu$ m



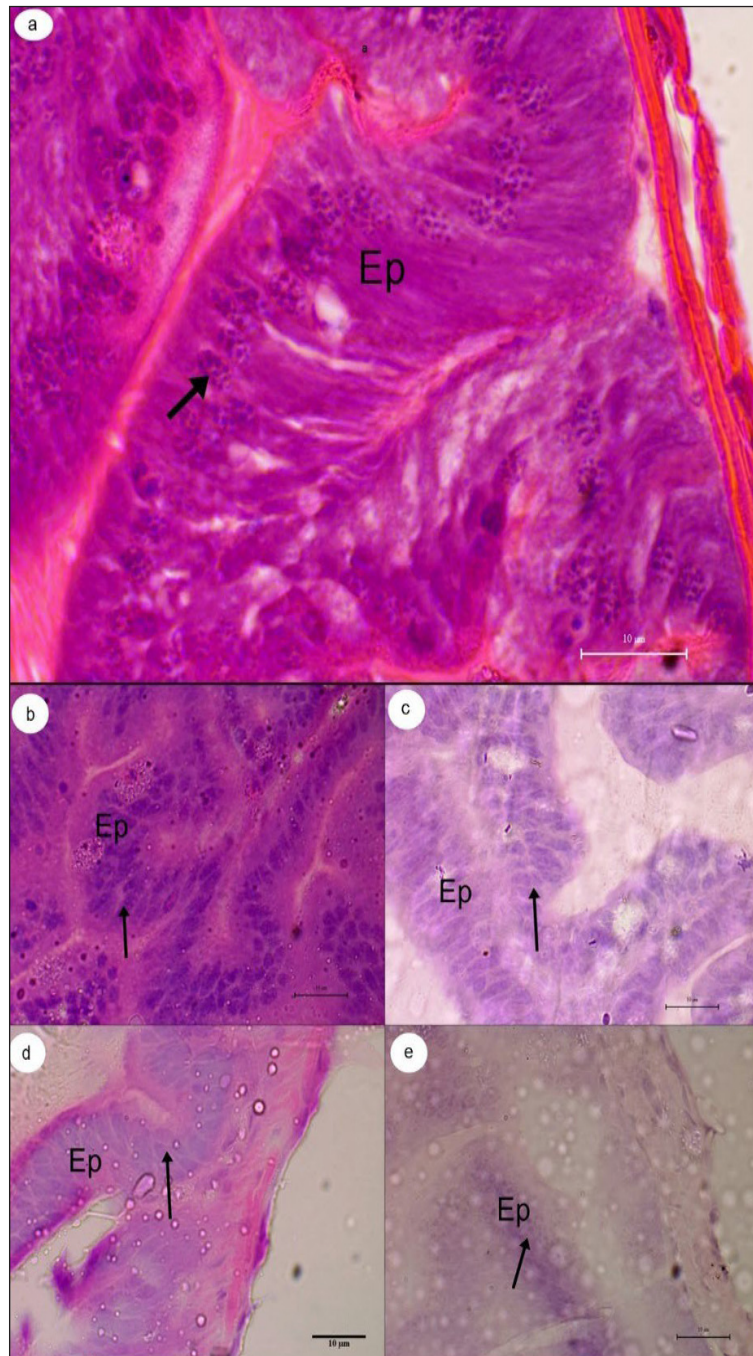
Nc: Sel perawat; Oo: oosit; R: Ruang antara oosit; V: vakuol

RAJAH 10. Keratan memanjang ovariol RPW bahagian pra-vitelogenik sebelum dan selepas rawatan peptida sintetik *WolFar* magnifikasi 100X. a – b) kawalan, c – d) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (24 jam), e – f) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (24 jam), g – h) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (48 jam) dan i – j) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (48 jam). Skala = 10  $\mu$ m



Fep: epitelium folikel; N: nukleus; YG: granul yolka; R: Ruang antara oosit

RAJAH 11. Keratan memanjang ovariol RPW bahagian vitelogenik sebelum dan selepas rawatan peptida *WolFar* magnifikasi 100X. a – b) kawalan, c – d) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (24 jam), e – f) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (24 jam), g – h) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L (48 jam) dan i – j) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L (48 jam). Skala = 10  $\mu$ m



*Ep*: epitelium

RAJAH 12. Keratan memanjang kaliks RPW sebelum dan selepas dikenakan rawatan peptida sintetik *WolFar* pada magnifikasi 100X. a) kawalan, b) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L pada 24 jam, c) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L pada 24 jam, d) rawatan peptida *WolFar* 0.83 mmol/L pada 48 jam dan e) rawatan peptida *WolFar* 1.66 mmol/L pada 48 jam. Anak panah menunjukkan kromatin pada nukleus sel. Skala = 10  $\mu$ m

Garisan sempadan antara sel yang tidak sekata selepas rawatan menunjukkan bahawa ruang antara sel (patensi) tidak berlaku dan menyebabkan penyukaran penghantaran protein daripada hemolimfa untuk memasuki oosit melalui epitelium folikel tersebut. Hal ini menyebabkan oosit tidak dapat berkembang dengan baik kerana mengalami kekurangan protein. Keadaan ini juga turut dilaporkan oleh Ghazawy (2012) yang melihat kesan Lufenuron iaitu sejenis perencat sintesis kitin terhadap gonad belalang padang pasir, *Schistocerca gregaria*. Pengurangan granul yolka pada oosit adalah berkemungkinan berkait rapat dengan kekurangan protein disebabkan oleh kesan keabnormalan pada epitelium folikel. Kerosakan pada epitelium folikel dan kelewatan dalam perkembangan oosit dan folikel merupakan antara ciri penting keabnormalan perkembangan ovari. Pengurangan pada granul yolka serta penyebaran yang tidak sekata dalam kajian ini juga merupakan ciri kelewatan perkembangan oosit dan seterusnya menghentikan perkembangan ovariol (El-Bokl et. 2010; Liu et al. 2022). Hal ini akan menyebabkan pengurangan kesuburan dan kebolehhidupan telur RPW betina. Selain itu, pewarnaan Hematoksilin dan Eosin yang semakin berkurang dan menyebabkan warna sel semakin pudar selepas rawatan pada kedua-dua zon vitelarium merujuk kepada komponen sel yang berubah atau kandungan protein yang berkurang menyebabkan tarikan basofilik atau asidofilik sel juga berkurang. Ini adalah kerana, pewarnaan hematoksilin lebih tertarik kepada sel yang bersifat asid seperti nukleus yang mengandungi DNA dan kromatin manakala eosin pula mewarnakan protein secara tidak khusus (Fischer et al. 2008). Pengurangan protein pada ovariol secara langsung akan mempengaruhi proses vitelogenesis iaitu proses sintesis, mengangkut dan pengumpulan protein pelopor pada yolka (Alves et al. 2014). Dalam proses ini, jasad lemak akan mensintesis dan merembeskan vitelogenin, karboksipeptidase vitelogenesis, katepsin B dan *lipophorin* (protein pelopor utama dalam yolka) ke dalam hemolimfa, yang turut bergabung dalam perkembangan oosit (Raikhel et al. 2002). Justeru, pengurangan kandungan protein pada ovariol RPW selepas rawatan peptida *Wolfar* dalam kajian ini boleh menyebabkan sistem pembiakan betina serangga ini terganggu.

Rajah 12 pula menunjukkan perbezaan struktur sel yang berlaku terhadap bahagian kaliks selepas dikenakan rawatan peptida *Wolfar*. Perubahan paling ketara pada bahagian ini adalah pewarnaan nukleus pada epitelium kolumnar yang semakin pudar dan kromatin yang semakin berkurang terutamanya pada RPW yang dirawat dengan peptida *Wolfar* yang lebih tinggi kepekatan dan pada masa yang lebih lama iaitu selepas 48 jam (Rajah 12(e)). Lipatan sel epitelium kolumnar juga dilihat kurang jelas pada bahagian ini berbanding kawalan (Rajah 12(a)).

Pewarnaan nukleus pada sel epitelium kolumnar kaliks yang semakin pudar serta kromatin yang semakin berkurang menunjukkan bahawa sel ini telah mengalami kemerosotan. Kesan keabnormalan pada nukleus sel ini akan secara langsung mengganggu fungsi kaliks. Lipatan sel epitelium kolumnar yang semakin berkurang selepas rawatan peptida *Wolfar* akan menyebabkan proses ovulasi RPW ini terjejas kerana menurut Kumar (2022), bentuk epitelium yang berlipat pada bahagian kaliks bertujuan untuk membenarkan bahagian tersebut mengembang semasa proses ovulasi berlaku. Kesan keabnormalan pada histologi ovari RPW selepas dikenakan rawatan peptida *Wolfar* dalam kajian ini akan memberi kesan kepada perkembangan oosit dan seterusnya menjejaskan proses penghasilan progeni normal.

Tambahan pula, kesan keabnormalan dapat dilihat pada histologi ovari RPW apabila dikenakan rawatan peptida *Wolfar* terutamanya yang berkepekatan tinggi mungkin dapat dikaitkan dengan kandungan peptida *Wolfar* itu sendiri. Peptida *Wolfar* mengandungi tujuh jenis asid amino iaitu arginina, leusin, valina, serin, tirosina, glutamin dan asparagin. Walaupun asid amino diketahui memainkan peranan penting dalam proses perkembangan dan kemandirian serangga, namun kehadirannya secara berlebihan mampu memberikan kesan negatif terhadap sesuatu hidupan. Sebagai contoh, menurut Zabala, Jaffe dan Maldonado (1984), arginina mampu memberikan kesan yang sama seperti tindakan morfin. Morfin adalah sejenis ubatan yang memberi kesan pada pembentukan ingatan dalam vertebrata dan kajian tersebut turut memberikan kesan yang sama terhadap mentadak, *Stagmatoptera biocellata*. Selain itu, arginina juga bertindak sebagai perantara dalam kitaran urea dan sebagai pelopor kepada biosintesis protein, poliamina, kreatina dan nitrik oksida (NO) (Lind 2004). Penemuan mengenai biosintesis arginina pada manusia yang bertindak menjana molekul nitrik oksida (NO) dikenali sebagai *arginine-derived NO* telah menunjukkan bahawa ianya boleh menyebabkan kanser. Sesetengah tumor pada manusia atau mamalia memerlukan arginina untuk membesar contohnya tumor auksotrof. Lind (2004) turut menyatakan bahawa kesan daripada arginina yang mensintesis NO akan menjadi penyebab kepada apoptosis sel iaitu keadaan berlakunya pengecutan sel, penonjolan membran, pemampatan kromatin, pemecahan sel dan pembentukan sel badan apoptotik. Pengaruh apoptosis memerlukan kepekatan NO yang tinggi. Pemosotan sel yang berlaku pada bahagian terminal penghujung dan vitelarium dalam kajian ini terutamanya pada rawatan kepekatan *Wolfar* 1.66 mmol/L mungkin juga berkaitan dengan kandungan arginina yang berlebihan dalam RPW.

## KESIMPULAN

Melalui kajian ini, ciri morfologi dan histologi ovarium RPW telah berjaya dikenal pasti. Selain itu, kajian ini juga telah menunjukkan perubahan keabnormalan pada morfologi dan histologi ovarium RPW bergantung kepada peningkatan kepekatan rawatan peptida sintetik *Wolfar*. Hal ini dibuktikan dengan perubahan pada morfologi ovarium RPW yang lebih signifikan pada bahagian pra-vitelogenik ovarium selepas rawatan kepekatan *Wolfar* 1.66 mmol/L. Di samping itu, kesan perubahan pada histologi ovarium RPW juga lebih ketara pada rawatan kepekatan yang lebih tinggi. Kesan perubahan morfologi dan histologi pada ovarium RPW ini secara tidak langsung akan dapat menjejaskan produktiviti serangga perosak ini dan juga memberi gambaran bahawa kesan yang diberikan oleh rawatan peptida sintetik ini juga adalah sama seperti rawatan penggunaan racun serangga atau bahan kimia yang lain. Oleh itu, peptida sintetik *Wolfar* ini mempunyai potensi untuk digunakan sebagai alternatif kepada bahan kimia dalam usaha mengawal RPW ini. Namun begitu, kajian yang lebih lanjut seperti kesan toksikologi peptida sintetik *Wolfar* perlu dilakukan pada masa akan datang bagi mengetahui kepekatan dan tempoh masa optimum untuk melihat keberkesanan peptida ini dengan lebih tepat.

## RUJUKAN

- Alves, T.J.S., Cruz, G.S., Wanderley-Teixeira, V., Teixeira, A.A.C., Oliveira, J.V., Correia, A.A., Câmara, C.A.G. & Cunha, F.M. 2014. Effects of *Piper hispidinervum* on spermatogenesis and histochemistry of ovarioles of *Spodoptera frugiperda*. *Biotechnic & Histochemistry* 89(4): 245-255.
- Bakli, D., Kirane-Amrani, L., Soltani-Mazouni, N. & Soltani, N. 2016. Methoxyfenozide, an ecdysteroid agonist insecticide, alters oocyte growth during metamorphosis of *Ephesia kuehniella* Zeller. *African Entomology* 24(2): 453-459.
- Büning, J. 1994. *Insect Ovary: Ultrastructure, Previtellogenic Growth and Evolution*. London: Chapman and Hall.
- Catchot, B., Anderson, C.Jh., Gore, J., Jackson, R., Rakshit, K., Musser, F. & Krishnan, N. 2020. Novaluron prevents oogenesis and oviposition by inducing ultrastructural changes in ovarian tissue of young adult *Lygus lineolaris*. *Pest Management Science* 76(12): 4057-4063.
- Chen, S.J., Lu, F., Cheng, J.A., Jiang, M.X. & Way, M.O. 2012. Identification and biological role of the endosymbionts *Wolbachia* in rice water weevil (Coleoptera: Curculionidae). *Environmental Entomology* 41(3): 469-477.
- El Naggar, S.E.M., Mohamed, H.F. & Mahmoud, E.A. 2010. Studies on the morphology and histology of the ovary of red palm weevil female irradiated with gamma rays. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 13: 9-16.
- El-Bokl, M.M., Baker, R.F.A., El-Gammal, H.L. & Mahmoud, M.Z. 2010. Biological and histopathological effects of some insecticidal agents against red palm weevil *Rhynchophorus ferrugineus*. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 1(1): 7-22.
- Fischer, A.H., Jacobson, K.A., Rose, J. & Zeller, R. 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harbor Protocols* 2008: pdb. prot4986.
- Ge, L.Q., Hu, J.H., Wu, J.C., Yang, G.Q. & Gu, H. 2009. Insecticide - induced changes in protein, RNA and DNA contents in ovary and fat body of female *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Journal of Economic Entomology* 102(4): 1506-1514.
- Ghazawy, N. 2012. Ultrastructural observations on the gonads and neurosecretory cells of *Schistocerca gregaria* after treatment with Lufenuron (CGA-184699). *Journal of Orthoptera Research* 21(2): 141-148.
- Glancey, B.M. & Banks, W.A. 1988. Effect of the insect growth regulator fenoxycarb on the ovaries of queens of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae). *Annals Entomological Society of America* 81(4): 642-648.
- Hazaa, M.A.M., Alm El-Din, M.M.S. & El-Akhdar, E.A.H. 2009. The histological and histochemical changes in the gonads of the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* (Boisd.). *Isotope and Radiation Research* 41(4): 1465-1484.
- Kumar, B. 2022. Sexual reproduction. In *Reproductive Strategies in Insects*, edited by Omcar & Mishra, G. Boca Raton: CRC Press.
- Lind, D.S. 2004. Arginine and cancer. *The Journal of Nutrition* 134: 2837-2841.
- Liu, X.J., Jun, G., Liang, X.Y., Zhang, X.Y., Zhang, T.T., Liu, W.M., Zhang, J.Z. & Zhang, M. 2022. Silencing of transcription factor E93 inhibits adult morphogenesis and disrupts cuticle, wing and ovary development in *Locusta migratoria*. *Insect Science* 29(2): 333-343.
- Mahmud, A.I., Farminhao, J. & Viegas, E.R.A. 2015. Red palm weevil (*Rhynchophorus ferrugineus* Olivier, 1790): Threat of palms. *Journal of Biological Sciences* 15(2): 56-67.
- Minwuyet, A., Petronio, G.P., Yewhalaw, D., Sciarretta, A., Magnifico, I., Nicolosi, D., Di Marco, R. & Atenafu, G. 2023. Symbiotic *Wolbachia* in mosquitoes and its role in reducing the transmission of mosquito-borne diseases: Updates and prospects. *Frontiers in Microbiology* 14: 1267832.

- Mohamed, M.I., Khaled, A.S., Abdel Fattah, H.M., Hussein, M.A., Salem, D.A.M. & Fawki, S. 2015. Ultrastructure and histopathological alteration in the ovaries of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera, Chrysomelidae) induced by the solar radiation. *The Journal of Basic & Applied Zoology* 68: 19-32.
- Mohammed, M.A., Aman-zuki, A., Wahida, N.O., Tagami, Y. & Yaakop, S. 2018. The role of a novel *Wolbachia* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) synthetic peptide, *WolFar*, in regulating prostaglandin levels in the hemolymph of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae). *Turkish Journal of Zoology* 42: 422-431.
- Negm, A.A., Gabarty, A. & Elelimy, H.A. 2022. Ultrastructure and histopathological alteration in the ovaries of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) induced by x-ray radiation. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology* 15(4): 171-182.
- Nijhout, H.F. 2021. *Insect Hormones*. Princeton: Princeton University Press.
- Norzainih, J.J., Harris, M.N., Nurul-Wahida, O., Salmah, Y. & Norefrina Shafinaz, M.N. 2015. Continuous rearing of the red palm weevils, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier), 1970 on sugarcane in laboratory for biological studies (Coleoptera: Dryophthoridae). *3rd International Conference on Chemical, Agricultural and Medical Sciences (CAMS-2015)*, Dec 10-11, 2015, Singapore. hlm. 38-40.
- Ortolá, B. & Daròs, J.A. 2024. RNA interference in insects: From a natural mechanism of gene expression regulation to a biotechnological crop protection promise. *Biology* 13(3): 137.
- Osman, S.E.I., Swidan, M.H., Kheirallah, D.A. & Nour, F.E. 2016. Histological effects of essential oils, their monoterpenoids and insect growth regulators on midgut, integument of larvae and ovaries of Khapra Beetle, *Trogoderma granarium* Everts. *Journal of Biological Sciences* 16(3): 93-101.
- Raikhel, A.S., Kokozei, V.A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S.F., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmei, A. & Attardo, N.G. 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemical and Molecular Biology* 32: 1275-1286.
- Wan Nurul 'Ain, W.M.N. & Nurul Wahida, O. 2021. Morphology, histology and serotonin immunoreactivity on salivary glands of stick insect, *Phobaeticus serratipes* (Phasmida: Phasmatidae). *Jordan Journal of Biological Sciences* 14(1): 11-15.
- Yang, R.L., Zhang, Q., Fan, J.Y., Yue, Y., Chen, E.H., Yuan, G.R., Dou, W. & Wang, J.J. 2021. RNA interference of Argonaute-1 delays ovarian development in the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Pest Management Science* 77(9): 3921-3933.
- Zabala, N.A., Jaffe, K. & Maldonado, H. 1984. Arginine has morphine-like action in insects. *Experientia* 40: 733-734.
- Zha, X., Zhang, W., Zhou, C., Zhang, L., Xiang, Z. & Xia, Q. 2014. Detection and characterization of *Wolbachia* in silkworm. *Genetics and Molecular Biology* 37(3): 573-580.

\*Pengarang untuk surat-menyurat; email: wahida@ukm.edu.my