

REAKTIVITAS ANTIBODI MONOKLONAL DALAM MENDETEKSI VIRUS KERDIL KEDELAI PADA GULMA DENGAN DAS-ELISA

Reactivity of Monoclonal Antibody in Detection of Soybean Stunt Virus on Weeds Using by DAS-ELISA

Gratiana N.C. Tuhumury

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Pattimura,
Jl. Ir. M. Putuhena Kampus Poka Ambon, 97233

ABSTRACT

Tuhumury, G.N.C. 2009. *Reactivity of Monoclonal Antibody in Detection of Soybean Stunt Virus on Weeds Using by DAS-ELISA*. Jurnal Budidaya Pertanian 5: 89-93.

Soybean stunt diseases caused by *Soybean Stunt Virus (SSV)* is one of the important diseases of soybean. The objective of this research was to know reactivity of monoclonal antibody to detect SSV on weeds with serological method *Double Anti Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA)*. The research has three steps: purification of antibody, preparation of conjugate and detection SSV by DAS-ELISA. The result showed that SSV can be detected by DAS-ELISA on Weeds. Reactivity of Monoclonal antibody to detection SSV is depending on protein antibody.

Key words: Soybean stunt virus, monoclonal antibody, DAS-ELISA

PENDAHULUAN

Penyakit kerdil kedelai yang disebabkan oleh *Soybean Stunt Virus (SSV)* merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman kedelai. Infeksi virus pada beberapa kultivar kedelai memperlihatkan variasi gejala antara lain tanaman kerdil, daun berkerut, belang dan malformasi. Penyakit kerdil kedelai ditularkan melalui biji, cairan tanaman sakit dan vektor (serangga) (Sulandari dkk., 1997; Kuswardhana & Kartaatmadja, 1995). Penyebaran virus sangat ditentukan oleh tersedianya sumber inokulum dan vektor yang menularkan virus tersebut. Selain inokulum berupa benih terinfeksi dan vektor, tumbuhan pengganggu/gulma juga dapat menjadi sumber inokulum bagi penyebaran virus kerdil kedelai sendiri. Gulma merupakan tumbuhan yang tidak dikehendaki dan mempunyai pengaruh negatif pada tanaman pertanian, antara lain memiliki daya kompetisi dan sebagai inang alternatif dari patogen tumbuhan (Triharso, 1994).

Upaya yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit virus kerdil kedelai antara lain dengan menghilangkan sumber inokulum awal dengan menanam benih yang sehat sangat dianjurkan di samping usaha untuk mengendalikan vektor virus serta mengatasi penularan tanaman inang bukan kedelai yang ada di sekitar pertanaman dan penurunan jumlah inokulum yang ada di pertanaman (Saleh, 1997).

SSV merupakan virus terbawa benih (*seed borne*) dimana ada yang bergejala tetapi ada juga yang tidak bergejala. Untuk mengatasi kendala tersebut dilakukan deteksi secara serologi yang merupakan potensial untuk mendeteksi keberadaan patogen tumbuhan.

Dewasa ini deteksi secara serologi telah banyak digunakan dan mengalami perkembangan yang cukup pesat. Teknik serologi bersifat cepat, sensitif, spesifik serta didasarkan pada reaksi antigen dan antibodi.

Serodiagnosis dapat dilakukan untuk diagnosis, identifikasi virus tumbuhan, pemantauan virus terbawa benih dan vektor virus. Benih bebas virus dapat diperoleh dengan melakukan pengujian sampel benih dan juga diketahui vektor virulifer serta inang lain misalnya gulma melalui deteksi SSV secara serologi. Salah satu metode pengujian yaitu Pengujian serologi dengan *DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay)* bersifat sensitif dan spesifik dalam membedakan/memisahkan dan mengidentifikasi virus tertentu secara kuantitatif.

Untuk melakukan deteksi secara serologis memerlukan antibodi. Antibodi merupakan imunoglobulin yang dihasilkan oleh sel limfosit -B hewan sebagai tanggapan oleh adanya stimulus antigen yang diberikan. Penelitian Sulandari dkk. (1998) menunjukkan bahwa antibodi poliklonal SSV yang dimurnikan dengan menggunakan presipitasi amonium sulfat dapat menghasilkan titer antibodi dengan pengenceran sampai 10.000×.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji reaksi antibodi monoklonal yang sudah dimurnikan terhadap SSV pada gulma dengan menggunakan metode DAS-ELISA.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Virologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

Yogyakarta dan dilakukan dengan tahapan sebagai berikut.

Pemurnian Antibodi

Antibodi yang dimurnikan adalah Mab SSV-3, Mab SSV-4, Mab SSV-5, hasil perbanyakan invitro yang merupakan koleksi Laboratorium Virologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Prosedur pemurnian seperti yang dilaporkan oleh Jordan (1992) menggunakan metode Amonium Sulfat sebagai berikut: 9 ml aquadest ditambah dengan 1 ml antibodi diaduk lalu tambahkan 10 ml amonium sulfat jenuh dan diinkubasikan selama 60 menit pada suhu kamar. Setelah itu dipindahkan pada tabung eppendorf dan disentrifugasi 8000 g selama 10 menit (suhu 4 °C). Pelet diambil dan ditambah dengan 2 ml PBS 0,02 M pH 7,4 dan diaduk sampai larut. Membran selulosa disiapkan untuk dialisis dan dipotong sesuai yang diinginkan. Membran dicelup dalam air steril lalu salah satu ujung dijepit dengan penjepit klem kemudian hasil presipitasi tadi dimasukkan dalam membran lalu ujung yang lain dijepit kuat dengan penjepit klem. Membran dicelupkan dalam *becker glass* yang mengandung 500 ml 0,01 M PBS dan dialisis selama 24 jam dimana tiap 8 jam bufer diganti. Dialisis pada suhu 4 °C sambil diputar dengan *stirer*. Larutan hasil dialisis dimasukkan dalam tabung eppendorf.

Penyiapan Konjugat

Prosedur pelabelan antibodi yang digunakan mengikuti prosedur Engvall & Perlman, 1971 *cit.* MacKenzie (1990) yaitu sebagai berikut: 100 µl antibodi SSV dengan konsentrasi 1 mg ml⁻¹ ditambah enzim alkalin fosfatase 100 µl sehingga IgG : alkalin fosfatase = 1:1 kemudian ditambahkan dengan 1% glutaraldehid lalu diinkubasikan selama 4 jam pada suhu ruang. Hasil tersebut didialisis selama 1 jam, 2 jam dan 1 malam dengan 0,02 M PBS pH 7,4. Keesokan harinya hasil dialisis dihitung volumenya dan ditambah 1% *Bovine Serum Albumin* dengan perbandingan 1:1. Hasil yang diperoleh merupakan konjugat yang baru dapat dipakai untuk uji ELISA setelah 2 hari.

Kajian Serologi

Antibodi Monoklonal SSV-3, SSV-4, SSV-5 hasil pemurnian diencerkan menjadi 10×, 100×, dan 1.000×. Gulma yang digunakan sebagai bahan antigen uji diambil dari sekitar pertanaman kedelai. Dibuat ekstraknya dengan Bufer 0,05 M Natrium Karbonat pH 9,6 (0,5 g 5 ml⁻¹), disaring dengan kasa steril dan dijadikan sample.

Deteksi SSV Secara DAS-ELISA

Pengujian serologi dilakukan dengan menggunakan teknik DAS-ELISA seperti yang dilaporkan Clark & Adam (1977). Pengujian dilakukan pada *polysterine microtiter plate (Nunc-ImmunoPlate)*. Tiga kali pencucian masing-masing selama 5 menit dilakukan pada tiap-tiap tahapan uji. Larutan pencuci adalah 0,02 M PBS mengandung 0,05% Tween-20. Prosedurnya sebagai berikut: coating mikroplate dengan 100 µl antibodi tiap sumuran (antibodi yang diencerkan dalam Bufer) dan diinkubasikan selama 4 jam pada suhu kamar atau semalam pada 4°C. Tambahkan 100 µl antigen tiap sumuran dan diinkubasi semalam pada suhu 4°C. Tambahkan konjugat antibodi 100 µl dengan pengenceran 1:100 dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Tambahkan 150 µl *p-nitrophenyl phosphate* (1 mg ml⁻¹) dalam 10 % diethanolamine pH 9,8 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30-60 menit. Nilai absorbansi diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan ELISA Reader CC 340 P.

Pengamatan

Pengamatan untuk pengujian *DAS-ELISA* didasarkan pada perbandingan nilai absorbansi sampel sakit dengan nilai absorbansi sampel sehat. Reaksi dianggap positif jika nilai perbandingan lebih atau sama dengan dua.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Gulma

Sumber antigen yang diuji yaitu gulma yang diambil dari sekitar lokasi pertanaman kedelai. Kemudian dideteksi dengan melihat reaktivitasnya terhadap antibodi monoklonal SSV menggunakan metode serologi DAS-ELISA. Gulma yang diperoleh dari sekitar pertanaman kedelai ada berbagai macam baik dari golongan rerumputan hingga gulma berdaun lebar. Setelah diidentifikasi diperoleh antara lain: *Hiptis brevipes* (boborongan/godong puser), *Bidens biternata* (ambong-ambong/ketul), *Bromus secalinus*, *Digitaria sanguinalis* (genjoran), *Portulaca oleracea* (krokot), *Galinsoga parviflora* (mondreng), *Cyperus rotundus* (rumpuk teki), *Brachiaria mutica* (malela), *Cynodon dactylon* (juket kakawatan/grinting), *Panicum repens* (lempuyangan) (Mangunsoekarjo, 1983).

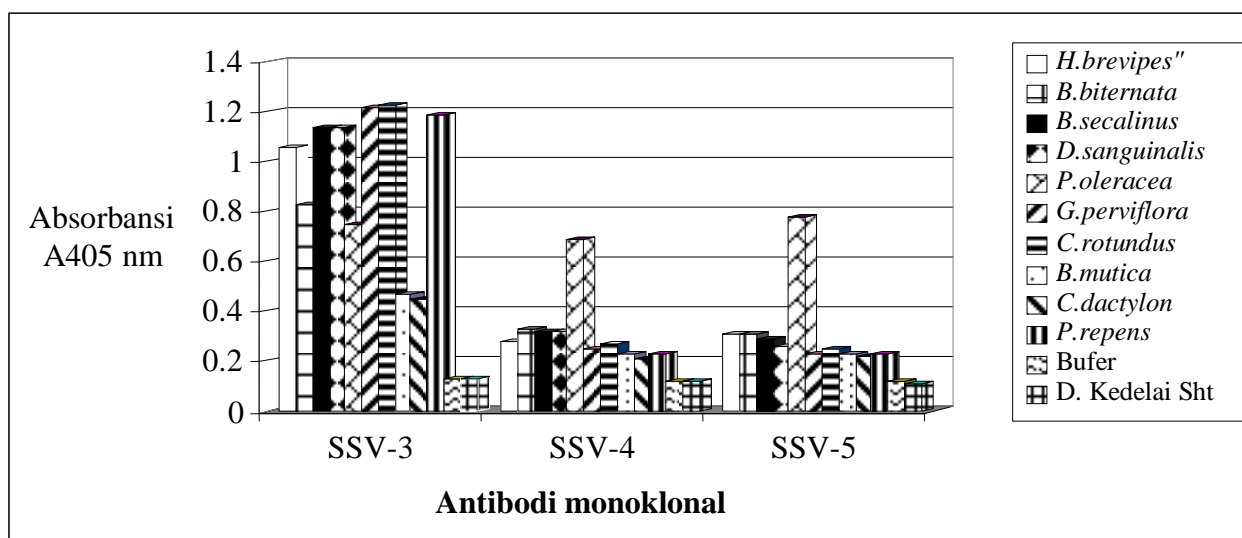
Tabel 1. Konsentrasi Protein Antibodi Monoklonal

No	Klon Hibridoma	Nilai Absorbansi (A _{280 nm})	Kandungan Protein (mg ml ⁻¹)
1.	Mab SSV-3	0,199	0,137
2.	Mab SSV-4	0,776	0,535
3.	Mab SSV-5	0,104	0,072

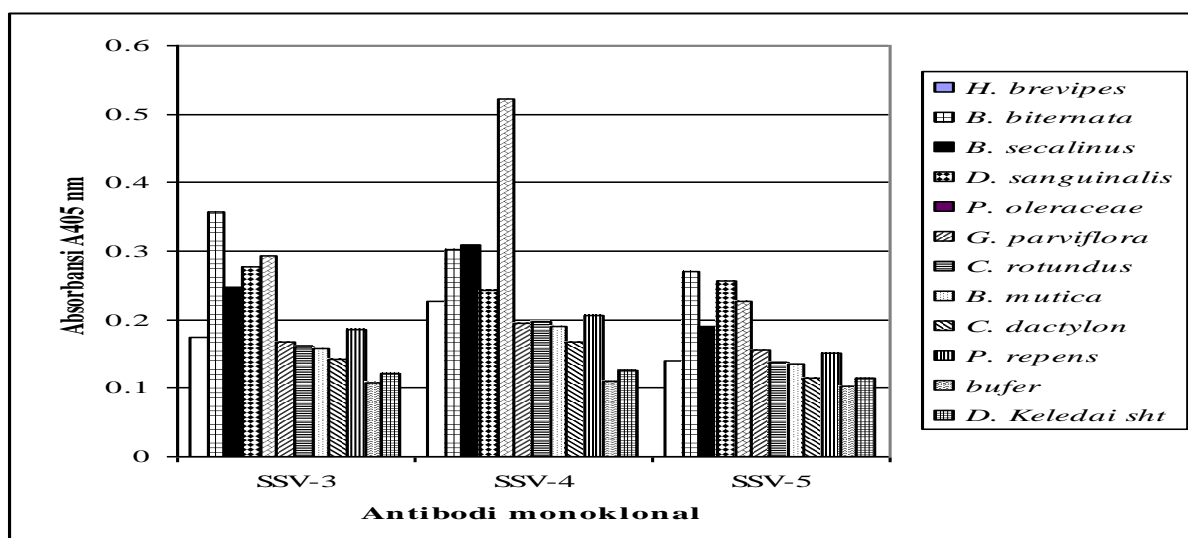
Tabel 2. Nisbah Nilai absorbansi Reaktivitas Mab SSV terhadap antigen Gulma dengan DAS-ELISA

Macam Antigen (Gulma)	Macam Antibodi Monoklonal					
	Mab SSV-3		Mab SSV-4		Mab SSV-5	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²
1. <i>Hiptis brevipes</i>	8,333	1,3888	2,2377	1,8016	2,7477	1,2193
2. <i>Bidens biternata</i>	6,5635	2,8333	2,6475	2,3968	2,7658	2,3772
3. <i>Bromus secalinus</i>	9,0079	1,9603	2,5902	2,4603	2,5946	1,6754
4. <i>Digitaria sanguinalis</i>	8,9921	2,1984	2,5902	1,9206	2,3513	2,2544
5. <i>Portulaca oleraceae</i>	5,9286	2,3175	5,6065	4,1349	6,9459	1,9912
6. <i>Galinsoga parviflora</i>	9,5952	1,3254	1,9682	1,5476	2,0811	1,3596
7. <i>Cyperus rotundus</i>	9,6905	1,2778	2,0794	1,5555	2,2342	1,2017
8. <i>Brachiaria mutica</i>	3,6825	1,2537	1,8770	1,5	2,0540	1,1929
9. <i>Cynodon dactylon</i>	3,5317	1,1190	1,6803	1,3333	1,9369	1,0087
10. <i>Panicum repens</i>	9,4048	1,4762	1,8524	1,6428	2,0450	1,3246

Keterangan: Mab = Monoklonal antibodi.



Gambar 1. Deteksi SSV dengan DAS-ELISA Menggunakan Antigen Gulma Pengenceran 10⁻¹



Gambar 2 Deteksi SSV dengan DAS-ELISA Standar dengan Menggunakan Antigen Gulma Pengenceran 10⁻²

Pemurnian Antibodi

Antibodi yang digunakan untuk pengujian adalah antibodi monoclonal SSV-3, Mab SSV-4 dan Mab SSV-5 dimurnikan dengan menggunakan metode presipitasi amonium sulfat. Antibodi hasil pemurnian diukur absorbansi pada panjang gelombang 280 nm dengan spektrofotometer. Pemurnian ini diharapkan perolehan protein yang berperan dalam deteksi keberadaan virus pada antigen uji.

Berdasarkan hasil spektrofotometer diperoleh bahwa pada panjang gelombang 280 nm, nilai absorbansi yang didapat yaitu untuk Mab SSV-3, Mab SSV-4 dan Mab SSV-5 berturut-turut 0,199, 0,776, dan 0,104. Dari hasil spektro tersebut dihitung kandungan protein masing-masing klon antibodi yang digunakan. Perhitungan protein antibodi didasarkan pada metode Liddle & Cryer (1981), menunjukkan bahwa pada $A_{280} \text{ nm} = 1$, konsentrasi protein = $0,69 \text{ mg ml}^{-1}$. Perhitungan konsentrasi protein antibodi dapat dilihat pada Tabel 1.

Deteksi SSV pada Gulma dengan DAS-ELISA

Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode DAS-ELISA standar seperti yang dikemukakan oleh Clark & Adam (1977). Untuk lebih jelasnya reaktivitas antibodi yang telah dimurnikan terhadap gulma dengan DAS-ELISA dapat dilihat pada Tabel 2 dan Gambar 1 dan 2.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa gulma yang diperoleh di sekitar pertanaman kedelai bermacam-macam yang digolongkan dalam kelompok gulma berdaun lebar seperti *H. brevipes*, *B. biternata*, *P. oleraceae* dan *G. parviflora*; gulma rumput seperti *D. sanguinalis*, *B. mutica*, *C. dactylon*, *P. repens* dan *C. rotundus*.

Berdasarkan hasil pengujian ternyata reaktivitas Mab-SSV terhadap antigen gulma menunjukkan adanya perbedaan untuk golongan gulma berdaun lebar dan gulma golongan rerumputan. Terlihat bahwa untuk gulma berdaun lebar seperti *H. brevipes*, *B. biternata*, *P. oleraceae* dan *G. parviflora*; reaktivitasnya lebih tinggi bila dibandingkan dengan gulma golongan rerumputan seperti *C. dactylon*, *P. repens*. Hal ini dimungkinkan karena gulma golongan daun lebar merupakan tumbuhan yang memiliki morfologi (bentuk dan ukuran) daun yang lebih besar sehingga pada saat penyebaran virus oleh serangga penyebar (aphis) virulifer akan lebih mudah dan cepat untuk menyebar secara sistemik. Sedangkan Gulma golongan rerumputan cenderung memiliki morfologi daun yang kecil/memanjang seperti pita serta daunnya lebih keras dibanding gulma berdaun lebar. Ini berkaitan dengan preferensi serangga (aphis) yang lebih menyukai struktur daun yang lunak. Kenyataan menunjukkan bahwa virus SSV yang menyerang suatu tanaman bersifat sistemik, dimana virus akan menyebar ke seluruh bagian tanaman (Roechan dkk., 1975). Penyebaran virus dalam tanaman dapat melalui dua

cara yaitu penyebaran secara aktif dari sel ke sel melalui plasmodesmata dan pergerakan cepat melalui jaringan pengangkutan biasanya melalui floem dan akan menyebar secara pasif ke bagian tumbuhan yang menggunakan asimilat seperti akar, bagian tumbuhan muda dan buah.

Dari hasil pengujian tampak bahwa rata-rata nisbah nilai absorbansi Reaktivitas Mab SSV terhadap Antigen gulma bereaksi positif hanya pada tingkat pengenceran antibodi 10x untuk Mab SSV-3 dan Mab SSV-5 sedangkan untuk tingkat pengenceran 100x tidak, hanya ada beberapa yaitu pada Mab SSV-4 masih bereaksi positif pada tingkat pengenceran 100x. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi masih reaktif terhadap antigen uji. Faktor yang berpengaruh yaitu kandungan protein pada antibody, karena bila dibandingkan dengan Mab SSV-3 dan Mab SSV-5, maka nilai spektro serta kandungan protein antibodi untuk Mab SSV-4 masih lebih tinggi sehingga antibodi masih mengenali antigen meskipun dilakukan pengenceran. Akan tetapi reaktivitas antibodi terhadap antigen cenderung menurun dengan semakin tingginya pengenceran antibodi. Hal ini berkaitan dengan semakin tinggi pengenceran maka semakin kecil peluang untuk mengenali protein virus dalam antigen. Terlihat ada beda antara reaktivitas Mab SSV-3, Mab SSV-4 dan Mab SSV-5 dalam mengenali antigen uji gulma. Selain dikarenakan perbedaan konsentrasi antibodi (sesuai hasil spektro) yang bisa mengenali protein virus, juga pengaruh konsentrasi (kandungan) virus sendiri dalam antigen yang digunakan.

Mengacu pada hasil pengujian yang telah dipaparkan maka dapat dikatakan bahwa DAS-ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi virus tumbuhan dalam hal ini SSV dengan pelacak antibodi monoklonal yang telah dimurnikan. Walaupun terlihat bahwa nilai absorbansi spektro antibodi monoklonal yang sudah dimurnikan sangat kecil tetapi masih mampu mengenali antigen uji, yakni gulma yang bisa merupakan inang alternatif bagi penyebaran SSV. Sehingga mempermudah untuk mengantisipasinya dengan menghilangkan sumber inokulum awal dengan cara mengatasi penularan tanaman inang bukan kedelai yang ada di sekitar pertanaman.

KESIMPULAN

Virus kerdil kedelai pada gulma dapat dideteksi dengan antibodi monoklonal SSV yang telah dimurnikan dengan metode DAS-ELISA. Reaktivitas Antibodi monoclonal SSV dalam mengenali antigen dipengaruhi oleh kandungan protein antibody dan konsentrasi virus antigen ditandai dengan semakin rendah kandungan protein maka reaktivitasnya semakin berkurang.

DAFTAR PUSTAKA

Clark, M.F & N.N. Adam. 1977. Characteristic of The Microplate Method of Enzyme Linked

- Immunosorbent Assay for The Defection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Jordan, R.L. 1992. Strategy and Techniques for the Production of Monoclonal Antibodies; Monoclonal Antibody Application for Viruses. *In: Hampton, P., E. Ball & S. de Boer (Eds). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Manual Laboratory, APS Press. Minnesota. USA.*
- Kuswardhana, D. & S. Kartaatmadja. 1995. Pengaruh Keberadaan Soybean Stunt Virus dan Vektor Terhadap Jumlah Tanaman Terinfeksi dan Hasil. Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah PFI di Yogyakarta, 6-8 September 1993.
- Liddle, J.E. & A. Cryer. 1991. A Practical Guide to Monoclonal Antibodies. Departement of Biochemistry, University of Wales College of Cardiff. UK. John Willey and Sons.
- MacKenzie, 1990. Preparation of Antibodi Enzyme Conjugates. *In: Hampton, P., E. Ball & S. de Boer (Eds). Serological Methods for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. A Manual Laboratory, APS Press. Minnesota. USA.*
- Mangunsoekardjo, S. 1983. Gulma dan Cara Pengendalian pada Budidaya Perkebunan. Direktorat Jenderal Perkebunan.
- Roechan, M., M. Iwaki & D.M. Tantera. 1975. Virus Diseases of Legume Plants in Indonesia : 2. *Soybean Stunt Virus. Contr. Centr. Res. Inst. Agric. No. 15. 16pp.*
- Saleh, N. 1997. Pengaruh Biji Belang dan Pengendalian Vektor Terhadap Intensitas Serangan *Soybean Stunt Virus* dan Hasil Kedelai. *Edisi Khusus Balitkabi* 9:82-89.
- Sulandari, S., Y.B. Sumardiyono & Roechan. 1997. Isolasi, Pemurnian dan Karakterisasi Parsial Soybean Stunt Virus. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 3(1): 6-11.
- Sulandari, S., Y.B. Sumardiyono & Roechan. 1998. Reaktivitas Antibodi Poliklonal SSV terhadap Antigen Homolog dan Heterelog. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 4(1): 51-56.
- Triharso. 1994. Dasar-dasar Perlindungan Tanaman. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 362p.