

**REAKTIVITAS ANTIBODI POLIKLONAL SSV
TERHADAP ANTIGEN HOMOLOG DAN HETEROLOG**

**(REACTIVITY OF POLYCLONAL ANTIBODIES AGAINST SSV TO
THEIR HOMOLOGOUS AND HETEROLOGOUS ANTIGENS)**

**Sri Sulandari dan Y.B. Sumardiyono
Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada**

**M. Roechan
Pusat Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor**

ABSTRACT

Polyclonal antibodies for Soybean Stunt Virus (SSV) were produced in white rabbit through the following procedures: approximately 100 µg of purified virions emulsified in Complete Freund's Adjuvant (CFA) were injected intramuscularly at first. In the second and third injection, 150 µg of purified virions in Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) per injection were injected intramuscularly. Finally, about 300 µg of purified virions were injected intravenously as a booster. The injections were done at 2 weeks interval. Antiserum was collected 5 days after the final injection. Antisera was purified by precipitation in saturated ammonium sulfate. Purified antibody was tested for the titer and reactivity of antibodies against the homologous and heterologous antigen. The studies were conducted with non-precoated I-ELISA test.

This research was able to obtain about 25 ml of specific crude antisera for SSV. The concentration of purified polyclonal antibodies was about 9 mg/ml. The titer of polyclonal antibodies was 10.000 in I-ELISA. Without absorption with sap of healthy plant, the antibodies could not be used to identify the infected and healthy plant samples. In the following test, the absorbed antibody was used. Using antibodies to SSV at a dilution of 1: 1000 and 1: 10.000 against sap extracts sample of healthy and infected plant at a dilution of 1: 10 by non-precoated I-ELISA test, indicated that the antibody could be used to identify the healthy and infected samples. By the same test, the antibody could be reacted to both homologous antigen (SSV) and heterologous antigen (CMV isolated from banana).

Key words: SSV, polyclonal antibodies, ELISA

INTISARI

Antibodi poliklonal terhadap Soybean Stunt Virus (SSV) dibuat dengan melakukan imunisasi kelinci menggunakan virus kerdil kedelai hasil pemurnian. Imunisasi pertama dilakukan secara intramuskular dengan 100 µg virus murni dalam *Complete Freund's Adjuvant*, imunisasi kedua dan ketiga masing-masing dengan 150 µg virus murni dalam *Incomplete Freund's Adjuvant* secara intramuskular. Imunisasi terakhir dengan 300 µg virus murni secara intravena. Interval imunisasi 2 minggu. Antiserum dipanen lima hari setelah imunisasi terakhir. Antiserum dimurnikan dengan presipitasi dalam amonium sulfat jenuh. Antibodi yang dihasilkan diuji titer dan dikaji reaktivitasnya terhadap antigen yang homolog dan heterolog dengan metode *non-precoated ELISA* tak langsung.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa titer antibodi mencapai pengenceran 10.000 kali atau setara dengan 90 ng/ml. Antibodi yang belum diserap dengan sap tanaman sehat tidak dapat membedakan tanaman sakit dan yang sehat. Bila menggunakan antibodi yang sudah diserap, pada pengenceran antibodi 1000 dan 10.000 kali dan pengenceran sap tanaman sakit dan sehat 10 kali antibodi tersebut dapat membedakan tanaman sakit dan tanaman sehat, akan tetapi tidak dapat membedakan antigen yang homolog (SSV) dan yang heterolog (CMV isolat pisang).

Kata kunci: SSV, antibodi poliklonal, ELISA

PENGANTAR

Penyakit kerdil kedelai yang disebabkan oleh *Soybean Stunt Virus* (SSV) merupakan penyakit penting pada kedelai di Indonesia. Laporan pertama tentang penyakit ini berasal dari Jepang pada tahun 1963, dan pada tahun 1975 penyakit telah ditemukan di Indonesia (Roechan *et al.*, 1975). Penyakit juga dilaporkan telah terdapat di Cina, Amerika dan Rusia (CMI, 1972). Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa penyakit kerdil kedelai dapat menyebabkan penurunan hasil panen antara 52,5 sampai 95 persen (Roechan, 1992, Sudjono *et al.*, 1985; Tamada *et al.*, 1977), yang berarti lebih besar bila dibandingkan dengan kerugian akibat penyakit mosaik kedelai yang disebabkan oleh SMV yang berkisar antara 10 - 30% (Sudjono *et al.*, 1985; Sinclair & Backman, 1993, CMI, 1972).

SSV merupakan virus yang terbawa benih, sehingga penggunaan benih sehat merupakan salah satu pilihan untuk pengendalian, khususnya untuk menekan sumber inokulum primer, dan kemudian disertai cara lain seperti pengendalian vektor dan menggunakan varietas tahan (Suseno, 1987; Suseno *et al.*, 1992). Terdapat beberapa cara untuk menguji tingkat keterbawaan virus pada benih, di antaranya dengan teknik serologi atau serodiagnosis (Lange, 1985). Serologi saat ini banyak diterapkan dalam virologi tumbuhan, antara lain untuk identifikasi virus, pemantauan vektor virulifer, dan tingkat keterbawaan virus pada benih dengan cepat dan akurat (Matthews, 1992; Van Regenmortel, 1982; Lange, 1985; Mahmood *et al.*, 1997).

Uji serologi maupun serodiagnosis dapat dilaksanakan bila tersedia antibodi. Antibodi merupakan imunoglobulin yang dihasilkan oleh sel limfosit-B pada hewan sebagai tanggapan adanya stimuli antigen yang diinjeksikan. Antibodi hasil imunisasi

merupakan antibodi poliklonal, yang terdapat atas banyak klon limfosit dalam tubuh hewan. Spesifitasnya heterogen karena terbentuk dari sejumlah klon limfosit-B yang terstimulasi oleh banyak epitope dari suatu antigen (Mernaugh *et al.*, 1990). Antibodi poliklonal mudah dibuat dan banyak digunakan untuk diagnostik dalam dunia kedokteran, kemudian diterapkan untuk diagnosis penyakit-penyakit tumbuhan.

ELISA merupakan metode serologi yang banyak diterapkan dalam penyakit tumbuhan, khususnya penyakit-penyakit karena virus, baik untuk diagnosis maupun tujuan lain. Berdasarkan reaksi antara antigen dan antibodi teknik ELISA dapat dibedakan menjadi ELISA langsung (DAS-ELISA) dan yang tidak langsung (I-ELISA), baik yang *precoated* dan *non-precoated* (Clark Adams, 1977; Koenig, 1981)

Penelitian ini bertujuan untuk membuat antibodi poliklonal yang spesifik terhadap virus kerdil kedelai (SSV). Dari antibodi yang dihasilkan dapat diketahui kualitasnya sehingga dapat dimanfaatkan untuk alat deteksi keberadaan virus kerdil kedelai.

BAHAN DAN METODE

Antibodi. Antibodi poliklonal virus kerdil kedelai (SSV) diperoleh dari kelinci yang diimunisasi dengan sedian SSV. Dengan imunisasi pertama, kedua dan ketiga berturut-turut 100 µg, 150 µg, dan 150 µg dengan interval dua minggu. Setelah imunisasi ketiga kelinci *dibooster* dengan 300 µg virus murni, pada hari kelima sebelum panen antiserum.

Antibodi dipisahkan dengan presipitasi dalam amonium sulfat jenuh sebagai berikut: 1 ml antiserum diencerkan dengan 9 ml suling, kemudian ditambah 10 ml amonium sulfat jenuh. Setelah diinkubasikan selama 30 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 3000 putaran tiap menit (rpm) selama 15 me-

Presipitat yang diperoleh ditambah 2 ml 0,01M PBS pH 7,4 yang mengandung 0,01% Natrium azid (NaN₃). Selanjutnya didialisis dengan 0,01M PBS sebanyak 500 ml. Selama dialisis larutan bufer diganti 3 kali (Liddell & Cryer, 1991). Titer antibodi yang dihasilkan diuji dengan metode non-precoated I-ELISA (Koenig, 1981). Sebagai pembandingan antibodi direaksikan dengan sap tanaman sehat dan dengan bufer karbonat (*coating buffer*).

Uji ELISA. Baik untuk pengujian titer antibodi maupun uji reaktivitas antibodi terhadap antigen homolog dan heterolog digunakan metode I-ELISA tanpa praperlakuan menurut Koenig (1981), dengan memakai lempeng *polystyrene microtiter* (maxisorp, Nunc-Immuplate, InterMed).

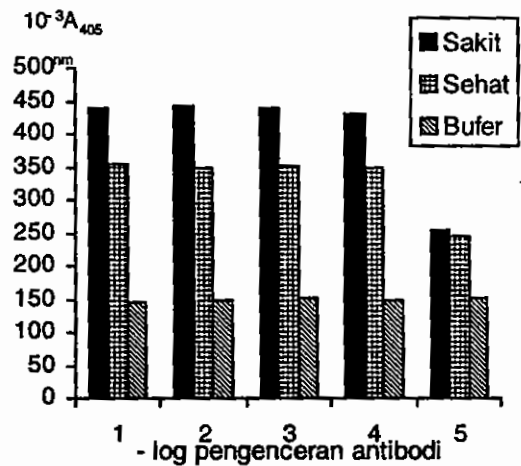
Penyerapan antibodi. Bila dalam pengujian titer antibodi poliklonal SSV terlihat adanya reaksi terhadap protein atau antigen dari tanaman sehat, dilakukan penyerapan dengan sap tanaman sehat. Penyerapan antibodi dilakukan dengan cara mencampur antibodi murni dengan sap tanaman sehat dengan perbandingan 1 : 1. Campuran kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 4 jam, dan setiap 20 menit dilakukan penggojogan. Setelah 4 jam campuran disentrifus dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Pelet dibuang dan supernatan diambil sebagai antibodi.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antibodi. Dari hasil pengambilan darah kelinci yang telah diimunisasi antigen yang berupa virus murni sebanyak 700 µg (nilai $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} = 1,55$) diperoleh antiserum kasar sekitar 25 ml. Konsentrasi antibodi setelah didialisis sekitar 9 mg/ml, yang dalam titrasi secara I-ELISA mencapai titer sampai

10^4 . Titer tersebut relatif tinggi untuk kelompok Cucumovirus. Menurut Habili & Francki (1975), virus kelompok Cucumovirus daya imunogeniknya rendah, sehingga sulit untuk mendapatkan antibodi dengan titer tinggi. Pada penelitian Marco & Cohen (1979) digunakan pengenceran γ globulin 1000 kali untuk mendeteksi CMV secara I-ELISA terhadap sampel yang berupa potongan daun segar tanpa dibuat sap lebih dahulu.

Hasil pengujian titer antibodi yang belum diserap pada pengenceran antara 10^1 sampai 10^5 disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Pengujian titer antibodi poliklonal SSV murni yang tidak diserap.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa untuk semua tingkat pengenceran antibodi, urutan nilai $A_{405\text{ nm}}$ dari yang tertinggi sampai yang terendah berturut-turut adalah reaksi antara antibodi dengan sap tanaman sakit, kemudian diikuti dengan tanaman sehat dan bufer. Dalam serodiagnosis dengan uji ELISA terdapat beberapa cara untuk menentukan ambang positif-negatif (Sutula *et al.*, 1986). Salah satu di antaranya menyatakan

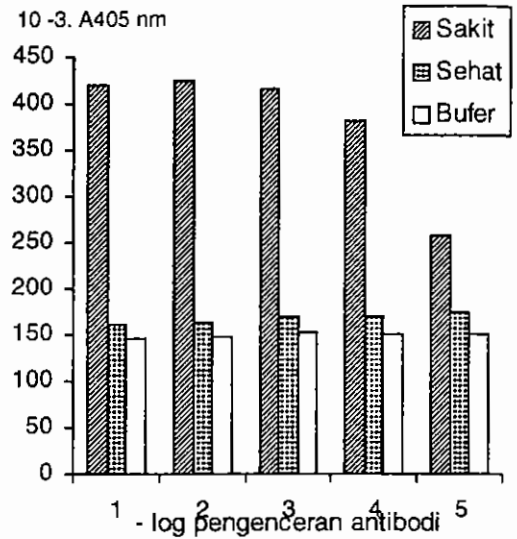
bahwa reaksi ELISA positif bila nisbah nilai $A_{405 \text{ nm}}$ sampel dua kali atau lebih besar daripada kontrol negatif. Dalam penelitian ini nilai tersebut kurang dari 2, yang berarti bahwa antibodi sangat heterogen, sehingga tidak dapat membedakan kedua jenis antigen yang diuji (sap tanaman sehat dan sap tanaman sakit).

Keadaan tersebut disebabkan oleh kualitas antibodi yang digunakan. Antibodi mengandung klon antibodi terhadap protein lain, antara lain protein tanaman propagasi virus (Lankow *et al.*, 1984). Antibodi yang homogen reaksinya spesifik, dapat diperoleh apabila antigen yang diimunitasikan pada hewan percobaan memiliki kemurnian tinggi. Dalam penelitian ini apabila virus yang diimunitasikan pada kelinci mempunyai tingkat kemurnian tinggi. Sediaan virus murni kelompok Cucumovirus memiliki nilai $A_{260}/A_{280} = 1,65$, sedangkan antigen yang diinjeksikan dalam percobaan ini mempunyai nilai $A_{260}/A_{280} = 1,55$, menunjukkan bahwa antigen mengandung protein lain.

Untuk mengatasi masalah di atas dilakukan penyerapan molekul antibodi terhadap komponen tanaman sehat dengan sap tanaman sehat. Cara ini berhasil menghilangkan reaksi nonspesifik pada pengujian *High Plains Virus* (HPV) dengan BM protein 32 kDa. Reaksi nonspesifik antibodi poliklonal HPV dengan tanaman sehat dapat dihilangkan dengan penyerapan antibodi menggunakan sap tanaman sehat (Seifer *et al.*, 1997).

Hasil penelitian setelah antibodinya diserap dapat dilihat pada gambar 2.

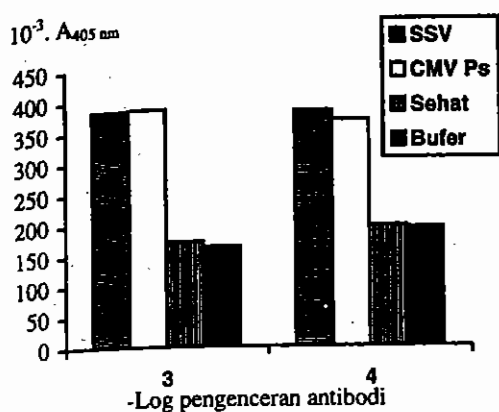
Dari gambar 2 tampak bahwa antibodi SSV yang telah diserap dengan cairan tanaman sehat mampu membedakan antigen tanaman sakit dan antigen tanaman sehat. Reaksi demikian dapat terjadi dengan antibodi dengan pengenceran 10 kali sampai 100.000 kali.



Gambar 2. Pengujian titer antibodi poliklonal SSV murni yang diserap (rata-rata dari 2 ulangan).

Pada pengenceran 10 kali sampai 10.000 kali nilai absorbansinya hampir sama, hanya pada pengenceran 10.000 mengalami sedikit penurunan. Pada pengenceran 100.000 kali nilai absorbansi antara sap tanaman sehat dan sakit nisbahnya kurang dari 2, sehingga titer antibodi yang diperoleh adalah 10^4 yang setara dengan konsentrasi imunoglobulin sebesar 900 ng/ml. Untuk pengujian selanjutnya digunakan pengenceran antibodi 10.000 kali.

Reaktivitas antibodi poliklonal terhadap antigen homolog dan heterolog. Hasil reaksi antibodi yang diencerkan 1000 dan 10.000 kali, dengan cairan tanaman tembakau yang terserang SSV, CMV isolat pisang, dan tembakau sehat yang diencerkan 10 kali disajikan pada gambar 3.



Gambar 3. Reaktivitas antibodi poliklonal SSV secara *non-precoated* I-ELISA terhadap SSV dan CMV isolat pisang serta tanaman sehat (rata-rata dari 2 ulangan).

Pada gambar 3 tampak bahwa antibodi yang diencerkan 1000 dan 10.000 kali bereaksi positif baik terhadap SSV maupun dengan CMV pada tanaman pisang, yang disebabkan keduanya termasuk dalam satu kelompok *Cucumovirus* dan sama-sama dalam satu kelompok serotip (*serotype*), yaitu serotip kelompok I (Wahyuni *et al.*, 1992). Disebutkan juga oleh Roechan (1992) bahwa virus kerdil kedelai (SSV) dapat bereaksi positif dengan antibodi CMV-Y, dan CMV isolat pisang juga bereaksi positif dengan antibodi CMV-Y (Suastika *et al.*, 1996).

Reaksi serologi menggunakan antibodi poliklonal memang tidak terlalu spesifik karena antibodi poliklonal merupakan sekumpulan klon sel limfosit penghasil antibodi yang secara bersama-sama memberikan respons terhadap sejumlah epitop dari antigen yang digunakan untuk imunisasi (Artama, 1990; Torrance, 1992).

Dari hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa imunisasi kelinci dengan sediaan virus SSV dapat mengimbas terbentuknya antibodi poliklonal, dan diperoleh sebanyak 25 ml dengan konsentrasi

imunoglobulin sekitar 9 mg/ml. Titer antibodi mencapai pengenceran 10.000 kali atau setara dengan 900 ng/ml, dan setelah diserap dengan sap tanaman sehat dapat membedakan sampel tanaman sehat dengan tanaman sakit, akan tetapi tidak dapat membedakan SSV dengan CMV isolat pisang

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, yang telah memberikan dana. Penelitian ini dibiayai melalui proyek pengkajian dan penelitian ilmu pengetahuan terapan dengan surat perjanjian pelaksanaan penelitian nomor: 41/P2PT/DPPM/97/HBV/2/V/1997.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama, W.T. 1990. *Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi dan Penerapan*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi, UGM, Yogyakarta.
- Clarck, M.F. & Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- C.M.I. 1972. *Descriptions of Plant Viruses*. No. 1.
- Habili, N. & I.B. Francki. 1975. Comparative Studies on Tomato Aspermy and Cucumber Mosaic Viruses. IV. Immunogenic and Serological Properties. *Virology* 64: 421 - 429.
- Koenig, R. 1981. Indirect-Elisa methods for the broad specificity detection of plant viruses, *J. Gen. Virol.*, 55:53-62.
- Lange, L. 1985. *Seed transmitted virus diseases. Biology, Detection and Control*. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Country.

- Lankow, R.K., S.H. Woodhead, R.J. Patterson, R. Massey & G. Schoetman. 1984. Monoclonal antibody diagnostics in plant disease management. *Plant Disease* 68: 1100-1101
- Liddell, J.E. & A. Cryer. 1991. *A practical guide to monoclonal antibodies*. John Wiley & Sons Ltd., Baffins Lane, Chister-England, 188p.
- Mahmood, T., Hein, G.L., & French, R.C. 1997. Development of serological procedures for rapid and reliable detection of Wheat streak mosaic virus in single wheat curl mite. *Plant Disease* 81: 250-253.
- Marco, S. & S. Cohen 1979. Rapid detection and titer evaluation of viruses in pepper by Enzyme-linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology* 69: 1259 - 1262.
- Matthews, REF. 1992. *Fundamental of Plant Virology*. Academic Press, New York.
- Mernaugh, R.L., G.R. Mernaugh & G.R. Kovacs. 1990. The immune response: antigen, antibodies, antigen-antibody interaction, Dalam Hampton, R., E. Ball, S. De Boer (Eds.). *Serological methods for detection and identification of viral and bacterial plant pathogens*. APS Press, St.Paul, Minnesota. USA. p:3-26.
- Roechan, M., M. Iwaki & D.M. Tantera. 1975. Virus disease of legume plants in Indonesia. Soybean stunt virus. *Contr. Centr. Res. Inst. Agric. Bogor* 15:1-16.
- Roechan, M. 1992. *Penyakit-penyakit virus pada tanaman kedelai*. Disertasi S3. Univ. Pajajaran, Bandung. (Tidak dipublikasikan).
- Seifer, D.L., Harvey, T.L., Martin, T.J., & Jensen, S.G. 1997. Identification of the wheat curl mite as the vector of the High Plains virus of corn and wheat. *Plant Disease* 81: 1161 - 1166.
- Sinclair, J.B & P.A. Backman. 1993. *Compendium of Soybean Diseases*. 2nd Ed. APS Press. St. Paul, Minnesota. 106 p.
- Suastika, G., K. Tomaru, J. Kurihara & K. Natsuaki. 1996. A cucumber mosaic Cucumovirus isolate from banana mosaic disease in Indonesia. Biological control in sustainable tropical agriculture. *Nodai Center for International Programs, Tokyo University Agriculture*. JSPS- DGHE Program p: 60 -71
- Sudjono, M. Amir & R. Martoatmodjo. 198. Penyakit kedelai dan penanggulangannya Dalam Somaatmadja, S. (Ed.). *Kedelai*. Balai Penelitian Tanaman Pangan. Bogor. 3.
- Suseno, R. 1987. Virus terbawa ben tanaman pangan serta hubungannya dengan sertifikasi dan pengawasan mutu benih. *Lokakarya Patogen Terbak Benih, Pengembangan Pengawasan Mutu dan Sertifikasi Benih*, Bogor, 8-9 Desember 1987.
- Suseno, R., G. Suastika, & Y.M. Kusuma 1992. Studi beberapa aspek pengendalian virus terbawa benih kedelai yang ditularkan kutu daun (SSV dan SMV), *Seminar dan penelitian Pendukung Pengendalian Hama Terpadu*, Cisarua, 7-8 September 1992.
- Sutula, C.L., J.M. Gillett, S.M. Morrissey D.C. Ramsdell. 1986. Interpreting ELISA Data and Establishing the Positive-Negative Threshold. *Plant Disease* 70: 722 - 726.
- Tamada, T., T. Goto., I. Chiba & T. Suv 1970. Soybean dwarf, a new virus disease. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35:282-285.
- Torrance, L. 1992. Serological methods detect plant viruses: production and use monoclonal antibodies. Dalam Duncan, J. & L. Torrance (Eds.). *Technique for the rapid detection of plant pathogens*. Blackwell Scientific. Publ.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1981. *Serology Plant Viruses*. Acad. Press., New York.
- Wahyuni, W.S., R.G. Dietzgen, K. Hanada R.I.B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of Cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 282-297.