

PRODUKSI ANTIBODI POLIKLONAL SUGARCANE STREAK MOSAIC VIRUS

Cahyo Artho Nugroho, Nur Basuki dan Arifin Noor Sugiharto

Program Studi Ilmu Tanaman Minat Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman
Program Pascasarjana, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya

Abstract

Sugarcane Streak Mosaic is an important disease in sugarcane caused by Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV). SCSMV attack intensity at the sample location sugarcane crop may reach 62%. The high intensity of the attack on the planting of sugar cane SCSMV make the virus should receive serious attention in order not widespread dissemination. One way to control the spread of the virus is the rapid detection. The rapid and precise mass detection to detect symptoms caused by the virus is by serologic testing. This study aims to produce polyclonal antiserum that can be used to detect SCSMV in sugarcane. Pure virus was analyzed using a spectrophotometer at a wavelength of 260 and 280 nm, a purity virus was 0.997. Pure virus particles injected into rabbits subcutaneously 3 times. Intake of rabbit blood serum performed 5 times and its IgG levels were measured by using a spectrophotometer nanodrop. The resulting antiserum is able to detect the presence of particles SCSMV on leaf tissue of sugarcane with the indication of the color change to yellow in wells ELISA Plate. Results of the process of reading absorbance at a wavelength of 405 nm by using ELISA reader machine showed a positive reaction because it shows the absorbance value is 3x greater than the negative control and the ratio between the sample is infected and a healthy sample or buffer (S/H Ratio) >2 . Thus antiserum produced can be used as a detector SCSMV.

Key words: Polyclonal antiserum, sugarcane streak mosaic virus, indirect ELISA

Pendahuluan

Mosaik adalah salah satu penyakit penting tanaman tebu. Penyebab penyakit ini adalah virus mosaik tebu atau dikenal dengan *sugarcane mosaic virus* (SCMV). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Haider *et al.* (2011) serangan virus tersebut mengakibatkan produksi gula menurun secara signifikan saat tingkat serangan virus mencapai 50%.

Hasil survei dan penelitian Putra *et al.* (2009) menunjukkan bahwa telah muncul jenis virus baru penyebab penyakit mosaik tebu. Virus tersebut banyak ditemukan menyerang

pertanaman tebu di beberapa negara penghasil gula termasuk Indonesia. Nomenklatur virus baru tersebut dikenal dengan nama *Sugarcane Streak Mosaic Virus* (SCSMV).

Penelitian tentang identifikasi SCSMV menunjukkan bahwa SCSMV berbeda dengan SCMV. Hall *et al.* (1998) melaporkan bahwa SCSMV yang menyerang pertanaman tebu di Pakistan mirip dengan kelompok genus *Tritimovirus* dan *Ipomovirus*. Berdasar penelitian terbaru yang dilakukan Li *et al.* (2011) menyimpulkan bahwa SCSMV masuk dalam genus baru dari family *potyviridae* yaitu *Poacevirus*. Serangan

SCSMV pada pertanaman tebu di beberapa negara cukup mengkhawatirkan. Di India misalnya, Hema *et al.* (2002) menyebutkan bahwa serangan SCSMV pada pertanaman tebu bisa mencapai 100%. Selain itu SCSMV juga menyerang tebu secara bersamaan dengan SCMV. Di Indonesia, berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Damayanti *et al.* (2007) intensitas serangan SCSMV di lokasi sampel pertanaman tebu berkisar 0-62 %.

Tingginya intensitas serangan SCSMV pada pertanaman tebu menjadikan virus tersebut patut mendapat perhatian serius agar tidak semakin meluas penyebarannya.

Pencegahan penyebaran SCSMV dapat dilakukan dengan deteksi dini bibit tebu sebelum didistribusikan. Deteksi massal paling tepat dan cepat untuk mendeteksi gejala yang disebabkan oleh virus adalah dengan uji serologi. Cara ini telah banyak dikembangkan untuk mendeteksi patogen-patogen dari golongan virus yang menyerang tanaman.

Dalam pelaksanaannya, uji serologi membutuhkan antiserum (antibodi) spesifik. Namun menurut Damayanti *et al.* (2012) sampai saat ini belum tersedia antiserum SCSMV komersial untuk deteksi rutin. Hal ini yang menyebabkan upaya deteksi serologi menemui kesulitan. Selain itu selama ini antiserum untuk keperluan uji serologi dalam mendeteksi beberapa gejala penyakit yang disebabkan oleh virus maupun bakteri pada tebu diperoleh dari luar negeri dengan harga yang mahal. Mengingat keragaman jenis virus di Indonesia yang sangat tinggi maka pembuatan antiserum lokal mutlak diperlukan. Pada penelitian ini akan dilakukan kajian pembuatan antiserum poliklonal untuk deteksi cepat SCSMV pada bibit tebu.

Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji metodologi efektif pembuatan

antiserum poliklonal untuk deteksi sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) pada tebu.

Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di beberapa lokasi dan laboratorium, menyesuaikan dengan ketersediaan alat dan bahan penelitian. Perbanyakan virus SCSMV pada beberapa bibit tebu dilaksanakan di rumah kaca dan laboratorium penyakit tanaman Pusat Penelitian dan Pengembangan Gula Indonesia (P3GI) Pasuruan pada bulan April 2014 sampai Agustus 2014. Pemurnian virus dengan metode *differential centrifugation* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada tanggal 25-29 September 2014. Pemeliharaan kelinci jenis New Zealand White sebagai hewan coba dilakukan di peternakan kelinci di Kecamatan Karangploso Kabupaten Malang pada tanggal 10 Oktober sampai 28 Desember 2014. Analisa kuantitatif dan kualitatif serta pengujian sensitifitas antiserum poliklonal terhadap virus SCSMV dengan metode *indirect ELISA* dilakukan di laboratorium genetika benih Balai Perbenihan dan Proteksi Tanaman Perkebunan Surabaya pada bulan Januari sampai April 2015.

Propagasi Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV)

1. Pengambilan Virus SCSMV

Pengambilan virus dilakukan di areal kebun koleksi penyakit *streak mosaic* P3GI Pasuruan. Pengambilan Virus SCSMV dilakukan untuk mendapatkan partikel virus yang menyerang tebu. Daun tanaman tebu yang menunjukkan gejala penyakit *streak mosaic* diambil sebagai sampel, kemudian dibawa ke laboratorium mikrobiologi untuk

disimpan (pada suhu -70°C) dan digunakan sebagai bahan propagasi virus.

2. *Penyiapan Tanaman Inang*

Propagasi virus diawali dengan menanam bibit tebu varietas PS 864 sebagai inang dan beberapa varietas lainnya yaitu varietas bululawang, kenthung, kidang kencana, PS 862, PS 864, PS 881, PS 882, PSBM 901 dan PSJT 941. sebagai indikator. Batang bibit tebu dipotong menjadi bagal mata dua kemudian ditanam dalam timba plastik yang berisi media tanam dan telah diaplikasi insektisida jenis karbofuran. Perawatan bibit dilakukan dengan penyiraman, pemupukan dan penyiangan gulma. Penyiraman dilakukan setiap hari sebanyak dua kali, pagi dan sore hari. Pemupukan dilakukan saat bibit berumur tiga minggu. Penyiangan gulma dilakukan jika disekitar perakaran bibit tebu tumbuh gulma. Selain penyiraman, pemupukan dan penyiangan gulma bibit juga diseleksi. Bibit yang tidak tumbuh atau terserang hama dan penyakit tidak digunakan sebagai tanaman inang.

3. *Pembuatan Larutan SAP SCSMV*

Pembuatan SAP (sumber inokulum) dilakukan dengan cara memblender 1 kg daun terinfeksi *streak mosaic* dengan 4 L buffer fosfat kemudian saring dengan kain kasa dan tampung dalam *beaker glass* kemudian simpan dalam lemari es (suhu 4°C) selama 1 jam. SAP siap digunakan untuk infeksi tanaman sehat. SAP dibawa dalam kondisi dingin sehingga dibutuhkan termos atau *ice box* selama proses infeksi.

4. *Penularan SCSMV Pada Tanaman Sehat*

Penularan SCSMV pada bibit tebu dilaksanakan saat satu bulan setelah

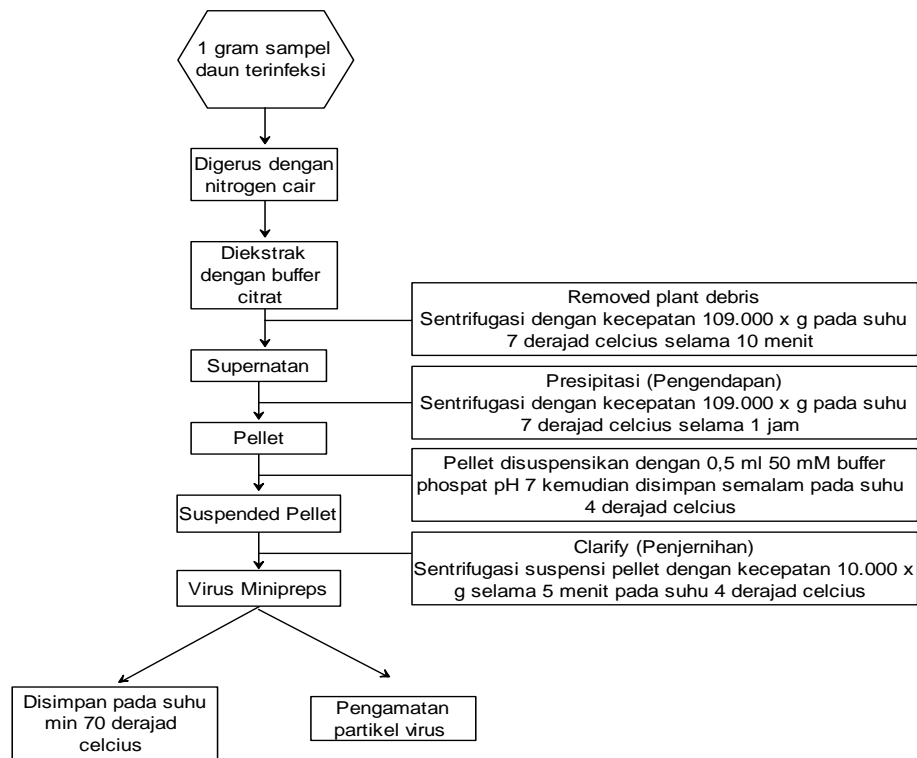
tanam. Sebelum penularan harus dipastikan bahwa bibit tebu harus memenuhi kriteria perkecambahan baik, bibit tumbuh normal serta bebas hama dan penyakit. Virus yang telah diformulasi dalam bentuk larutan SAP kemudian ditularkan pada tanaman. Metode Inokulasi virus SCSMV pada tanaman inang adalah dengan metode *abrasive pad rubbing*. Kain sabut cuci dicelupkan ke dalam larutan SAP kemudian ditekuk menjepit helaian daun muda dan daun yang masih menggulung pada bagian pangkal daun lalu ditarik sambil ditekan dari pangkal daun sampai ujung daun. Pengamatan kejadian penyakit dilakukan selama 3 bulan dengan interval pengamatan 1 bulan.

5. *Pemanenan dan Penyimpanan Daun Terinfeksi*

Daun tanaman tebu yang telah terinfeksi SCSMV dipanen dengan cara digunting dan dimasukkan ke dalam *ice box* untuk menjaga tetap segar selama transportasi, selanjutnya disimpan di dalam lemari es (suhu 4°C) selama 4 hari kemudian di dalam *freezer* suhu -70°C sebelum dilakukan pemurnian virus dan untuk penyimpanan jangka panjang.

6. *Purifikasi Virus*

Purifikasi virus dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Agidotan *et al* (2010) dalam memurnikan virus-virus yang menyerang tanaman penghasil bioenergi (*bioenergycane*) yang masih satu famili dengan tanaman tebu. Alur pemurnian yang digambarkan oleh Agidotan *et al* (2010) seperti Gambar 1 sebagai berikut:



Gambar 1. Diagram alur pemurnian SCSMV dengan metode *differential centrifugation* Agidotan *et al.* (2010)

Pemurnian virus diawali dengan menggerus 1 g sampel daun tebu yang terserang SCSMV dengan nitrogen cair sampai menjadi bubuk. Kemudian diekstrak dengan 20 ml buffer citrat (0,2 M sodium citrat pH 6,5, mengandung sodium sulfit 1% dan polivinyl pyrrolidone 2% (FW :40.000)). Ekstrak daun tersebut dimasukkan ke dalam *microtube*. Pemisahan ekstrak kasar dilakukan dengan *differential sentrifugation* pada 70.000 x g selama 10 menit dengan suhu 7°C menggunakan Rotor T-1250 Sorval WX Ultra 80 Ultracentrifuge (Thermo Scientific, Wilmington, MA, USA).

Partikel virus kemudian dipresipitasi (diendapkan) dengan cara sentrifugasi kecepatan 109.000 x g selama 1 jam dengan suhu 7°C. Pelet yang diperoleh kemudian di resuspensi dengan 500 ul 50mM *sodium posphat buffer* pH 7 dan

disimpan pada suhu 4°C selama semalam (*overnight*). Suspensi kemudian di *clarify* (dijernihkan) dengan sentrifuse dengan kecepatan 10.000 x g selama 5 menit pada suhu 4°C. Virus murni yang diperoleh kemudian di simpan pada suhu -70°C.

Produksi Antiserum Poliklonal SCSMV

Prosedur produksi antiserum poliklonal mengadopsi protokol yang ditulis oleh Cooper dan Paterson (2008) dan Anonymous (2007) dari Florida State University dan disesuaikan atau dimodifikasi berdasar keadaan di lapang. Berikut prosedur dan langkah produksi antiserum poliklonal:

1. Penyiapan Antigen

Antigen disiapkan dalam kondisi segar, artinya proses emulsi antigen dengan adjuvant dilakukan pada hari yang sama dengan proses imunisasi. Komposisi

antigen yang digunakan dalam imunisasi pertama (primer) adalah CFA : antigen dan imunisasi selanjutnya (booster) adalah IFA : Antigen dengan perbandingan 1:1. Emulsi antigen-adjuvan dilakukan dengan mengocok campuran tersebut dengan vortex selama 20-30 menit.

2. Imunisasi

Imunisasi kelinci untuk memproduksi antiserum poliklonal menggunakan Freund's adjuvant dilakukan secara subkutan, atau dibawah kulit pada daerah dorsal kelinci disekitar leher. Imunisasi dilakukan beberapa kali sesuai dengan jadwal yang telah dibuat. Dosis imunisasi adalah 0,4 ml antigen setiap kali injeksi

3. Pengambilan Darah (Bleeding)

Pengambilan darah atau bleeding juga dilakukan sesuai jadwal (terlampir) yang telah dibuat sebelumnya sesuai dengan prosedur atau protokol acuan.

4. Preparasi Serum dari Darah

Cairan bening diambil dengan hati-hati kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit, selanjutnya antiserum yang dihasilkan dapat dimanfaatkan untuk pengujian serologi atau disimpan. Antiserum yang dihasilkan dapat langsung digunakan untuk pengujian, dan untuk meningkatkan kualitas dilakukan penyerapan menggunakan cairan perasan tanaman indikator sehat serta dimurnikan gamma-globulinnya menggunakan sulfat amonium.

5. Penyimpanan Antiserum Poliklonal

Setelah serum berhasil dipisahkan selanjutnya antiserum poliklonal yang dihasilkan dapat dimanfaatkan untuk pengujian serologi atau disimpan pada suhu -70°C atau -20°C dengan perlakuan pemberian sodium azide 1%. Antiserum poliklonal dapat juga disimpan dalam

lemari pendingin standar namun hanya mampu bertahan selama enam bulan.

6. Pengujian Indirect ELISA

Untuk melihat reaktivitas antibodi yang dihasilkan dilakukan kajian serologi yaitu secara *Indirect Elisa* (Koenig, 1979). Langkah proses pengujian tersebut adalah sebagai berikut: sampel berupa daun tanaman tebu digerus dengan buffer ekstraksi (0,05 M *sodium carbonate buffer* pH 9,6) menggunakan *paste* dan *mortar*. Untuk mempermudah penggerusan dan meminimalisir kerusakan partikel virus maka proses penghancuran sampel daun dibantu dengan pemberian nitrogen cair. Ekstrak sampel daun tebu (*crude extract*) dimasukkan kedalam sumuran pada lempengan Elisa (*Elisa microplate 96 well*). Masing masing sumuran diisi ekstrak sampel sebanyak 200 μl . Inkubasikan ekstrak sampel dalam *Elisa plate* pada suhu 4°C selama kurang lebih 12 jam (*overnight*). Setelah waktu terpenuhi lakukan pencucian.

Proses pencucian dilakukan dengan cara membuang semua cairan sampel dalam sumuran elisa plate, kemudian masukkan larutan penyangga (Phospat buffer saline tween), lalu larutan buffer tersebut di buang seluruhnya kembali. Proses pencucian dilakukan sebanyak 3 kali. Selanjutnya dilakukan proses *blocking*, proses ini dilakukan dengan cara memasukkan *blocking buffer* (PBS+2%BSA) sebanyak 100 μl tiap sumuran. Inkubasikan pada suhu 4°C dalam waktu 12 jam (*overnight*). Lakukan proses pencucian dengan pola yang sama seperti sebelumnya. Masukkan antiserum primer pada masing-masing sumuran sebanyak 100 μl . Inkubasikan pada suhu 4°C dalam waktu 12 jam (*overnight*). Lakukan proses pencucian dengan pola yang sama seperti sebelumnya. Masukkan Antibodi sekunder (*Antirabbit IgG AP*

Conjugated) yang telah diencerkan dengan TBS. Inkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C. Lakukan proses pencucian dengan pola yang sama seperti sebelumnya sebanyak 4 kali. Masukkan 150 μ l substrat (p-nitrophenyl phosphate 1mg/ml) dalam diethanolamine 10%, pH 9,8. Inkubasikan pada suhu 37°C.

Setelah 30 sampai 90 menit amati reaksi yang terjadi secara visual apakah timbul perubahan warna menjadi kuning pada sumuran. Setelah terjadi perubahan warna maka reaksi dapat dihentikan dengan memasukkan NaOH sebanyak 50-100 μ l. Hitung absorbansi dengan menggunakan mesin *ELISA Reader* pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi dinyatakan positif jika absorbansi 2x lebih besar dibandingkan dengan kontrol negatif.

Hasil dan Pembahasan

Propagasi Sugarcane Streak Mosaic Virus (SCSMV)

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) mampu menginfeksi hampir semua sampel (Tabel 1). Gejala *streak mosaic* ditandai dengan munculnya pola *streak mosaic* pada daun tebu seperti pada Gambar 2. Muncul pertama kali pada tebu varietas PS 864 dan PS 881 pada pengamatan pertama (P1) yaitu 18 hari setelah infeksi dengan tingkat kejadian penyakit sebesar 20% dari total sampel yang digunakan. Dengan kejadian penyakit tersebut, kedua varietas masuk dalam kategori varietas yang rentan terhadap SCSMV. Munculnya gejala *streak mosaic* pada Varietas PS 864 dan PS

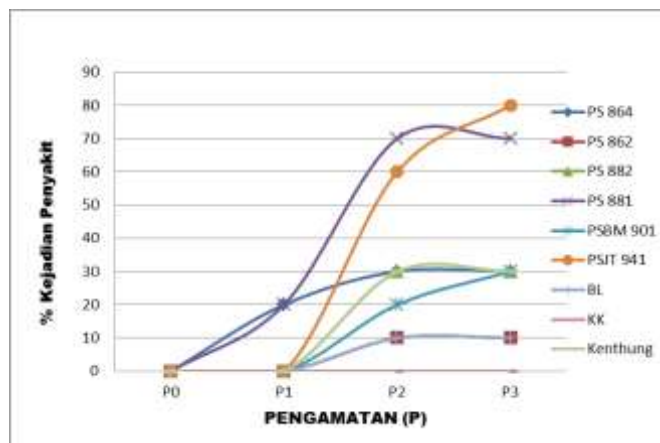
881 dalam waktu yang relatif singkat mengindikasikan kerentanan varietas tersebut pada serangan SCSMV.

Pada Gambar 3 dapat diketahui bahwa tingkat kejadian penyakit yang muncul pada sampel pada setiap pengamatan berbeda. Dari beberapa varietas tebu komersial yang dijadikan sebagai sampel dapat diperoleh informasi bahwa varietas yang mengalami peningkatan kejadian penyakit sangat tinggi yaitu varietas PS 881 dan PSJT 941. Varietas PS 881 mengalami peningkatan kejadian penyakit sebesar 50%, dimana pada pengamatan pertama (P1) menunjukkan terjadinya persentase kejadian penyakit sebesar 20% kemudian pada pengamatan kedua (P2) naik menjadi 70%. Dan Varietas PSJT mengalami peningkatan penyakit sebesar 60%, dimana pada pengamatan pertama (P1) menunjukkan terjadinya prosentase kejadian penyakit sebesar 0% kemudian pada pengamatan kedua (P2) naik menjadi 60% dan pada akhir pengamatan mencapai (P3) 80%.

Berdasarkan kategori tingkat kejadian penyakit menurut Legowo (1993) prosentase kejadian penyakit diatas 40% digolongkan sebagai varietas yang sangat rentan. Dengan demikian hasil propagasi SCSMV pada bibit tebu maka tanaman yang masuk kategori sangat rentan dan rentan (Tabel 1) dapat digunakan sebagai bahan untuk pemurnian virus dengan asumsi bahwa semakin tinggi tingkat kejadian penyakit maka semakin banyak partikel virus yang dapat dimurnikan dari jaringan daun.



Gambar 2. (A): gejala *streak mosaic* tebu varietas PS 864 kontras 40%, (B): gejala *streak mosaic* tebu varietas PS 864 dengan perbesaran 400 x dan dikonstraskan 40%.



Gambar 3. Grafik prosentase kejadian penyakit pada bibit tebu

Tabel 1 . Prosentase Kejadian Penyakit *streak mosaic* Pada Bibit Tebu

No	Varietas	% Kejadian penyakit	Tingkat ketahanan
1	PSJT 941	80	Sangat rentan
2	PS 881	70	Sangat rentan
3	PS 864	30	Rentan
4	PS 882	30	Rentan
5	PSBM 901	30	Rentan
6	Kenthung	30	Rentan
7	PS 862	10	Agak rentan
8	BL	10	Agak rentan
9	KK	0	Sangat tahan

Purifikasi Virus

Purifikasi SCSMV merupakan salah satu tahap penting dalam tahap kegiatan penyediaan antigen. Antigen disiapkan sebagai bahan imunisasi pada hewan coba guna memproduksi antiserum poliklonal. Purifikasi virus dilakukan berdasarkan metode yang digunakan oleh Agidotan *et al.* (2010) dalam memurnikan virus-virus yang menyerang tanaman penghasil bioenergi (*bioenergycane*).

Agidotan *et al.* (2010) memurnikan virus melalui metode *differential centrifugation* dengan kecepatan tinggi menggunakan *ultracentrifuge*. Pertimbangan untuk mengadopsi metode yang dilakukan oleh Agidotan *et al.* (2010) pertama adalah karena belum ada rujukan metode khusus pemurnian

SCSMV dari tanaman tebu. Beberapa peneliti sebelumnya mengadopsi metode pemurnian virus dari tanaman selain tebu. Putra *et al.* (2009) misalnya memurnikan SCSMV dengan mengadopsi metode pemurnian virus *wheat streak mosaic tritimovirus* (WSMT).

Pertimbangan selanjutnya adalah adanya kedekatan kekerabatan sampel tanaman yaitu tanaman penghasil bioenergi (*bioenergycane*) yang masih satu famili dengan tanaman tebu, jenis virus yaitu sama-sama merupakan virus mosaik dan proses purifikasi yang sederhana tidak melalui tahap yang panjang, buffer yang digunakan juga mudah didapatkan. Setelah melakukan pemurnian virus, hal yang harus dilakukan adalah mengukur tingkat keberhasilan pemurnian virus. Salah satu instrumen yang dapat

digunakan untuk mengukur kemurnian virus adalah uji kualitatif dan kuantitatif virus dengan cara mengukur tingkat absorbansinya terhadap sinar UV. Konsentrasi virus pada sediaan virus murni dianalisa dengan cara menghitung serapan spektrum partikel virus (nucleoprotein) pada panjang gelombang 260/280 nm. Hasil pengukuran nisbah $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ virus hasil pemurnian adalah sebesar 0,997. Jika dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Thouvenel *et al.* (1976) yang menetapkan bahwa kriteria kemurnian virus yang dimurnikan dari inang tanaman legume mempunyai nisbah $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ berkisar antara 1,20 sampai 1,24 sedangkan menurut Veerisetty *et al.* (1978) menetapkan kemurnian virus yang dimurnikan dari tanaman kentang berkisar antara 1,18 sampai 2,0. Kemungkinan virus yang

dimurnikan dari tanaman tebu pada penelitian ini masih tercampur dengan protein tanaman. Hal ini diduga karena pada sampel daun tebu kandungan serat dalam bentuk polisakarida sangat tinggi sehingga sulit untuk memisahkan virus dari jaringan yang membentuk struktur daun.

Produksi Antiserum Poliklonal SCSMV

Pengukuran konsentrasi antibodi (IgG) pada serum darah kelinci menggunakan alat nanodrop spektrophotometer. Tingkat kemurnian protein dapat diestimasi melalui nisbah $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ terhadap $\frac{A_{280}}$. Molekul protein mempunyai panjang gelombang maksimal (λ_{mak}) = 280 nm dan dianggap murni apabila mempunyai nisbah $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ kurang dari 1,0. Hasil pengukuran konsentrasi IgG serum darah kelinci disajikan pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Hasil Pengukuran Konsentrasi Antibodi (IgG) Serum Darah

Sample ID	Bleeding Ke-	Konsentrasi IgG	Unit	A280	260/280
D241114	1	38,812	mg/ml	53,172	0,64
D081214	2	34,506	mg/ml	47,273	0,67
D131214	3	35,250	mg/ml	48,292	0,62
D201214	4	38,101	mg/ml	52,198	0,62
D281214	5	36,504	mg/ml	50,01	0,62

Hasil pengamatan dari penghitungan konsentrasi IgG pada serum darah kelinci menunjukkan konsentrasi IgG tertinggi terjadi pada awal pengambilan darah yaitu 38,812 mg/ml, 8 hari setelah imunisasi sekunder I. Kemudian terjadi penurunan konsentrasi IgG selang 7–14 hari berikutnya. Konsentrasi IgG tertinggi (*peak*) terjadi pada pengambilan darah keempat, 21 hari setelah imunisasi sekunder II.

Perbandingan antara hasil pengamatan konsentrasi IgG kelinci dengan pendapat dari Cooper dan Paterson (2008), yang menyebutkan puncak produksi antibodi pada hewan

coba akan terjadi pada hari ke tujuh sampai hari ke empat belas setelah imunisasi sekunder (*boosting*) dan konsentrasi antibodi (*titer*) akan meningkat dan mencapai puncaknya (*peak*) selama 12 hari kemudian setelah itu menurun kembali maka pada penelitian ini membutuhkan waktu yang lebih lama untuk mencapai konsentrasi tertinggi.

Pengujian Reaktivitas Antiserum Poliklonal dengan Indirect ELISA

Keberhasilan produksi antiserum poliklonal diketahui dari adanya reaksi antara antiserum poliklonal dengan

antigennya yaitu SCSMV murni. Reaktivitas antiserum poliklonal yang dihasilkan dapat dilihat dengan melakukan kajian serologi yaitu uji *ELISA*. Uji *ELISA* yang digunakan adalah *indirect ELISA*.

Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui apakah antiserum yang dihasilkan sudah dapat digunakan sebagai detektor adanya SCSMV pada bibit tebu. Dalam pengujian *ELISA* dilakukan beberapa modifikasi prosedur sebagai langkah optimasi. Beberapa modifikasi tersebut adalah: proses ekstraksi sampel daun tebu digunakan nitrogen cair untuk mempermudah proses penghancuran karena karakter daun tebu yang agak sulit dihancurkan dengan hanya menggunakan *mortar* dan *paste*. Kemudian dilakukan penambahan waktu inkubasi pada proses *coating*, *blocking* dan inkubasi antiserum primer (antiserum yang dihasilkan dari penelitian ini) masing-masing proses dilakukan inkubasi selama 12 jam (*overnight*).

Pada uji *indirect ELISA*, reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna pada sumuran *ELISA plate* akibat adanya reaksi antara enzim label pada antibodi sekunder dengan substrat. Pada penelitian ini digunakan antibodi sekunder yaitu *Goat Antirabbit* (IgG) yang dilabel dengan enzim Alkaline

Phosphatase dan substrat yang digunakan adalah p-nitrophenyl phosphate.

Perubahan warna yang terjadi akibat reaksi enzim label dengan substrat adalah kuning. Dengan demikian apabila terjadi perubahan warna dari tidak berwarna menjadi berwarna kuning pada sumuran *ELISA plate* maka dapat diduga sampel tersebut terinfeksi SCSMV. Kemudian dilanjutkan proses pembacaan absorbansi pada panjang gelombang 405 nm dengan menggunakan mesin *ELISA Reader*. Reaksi dinyatakan positif jika absorbansi 3x lebih besar dibandingkan dengan kontrol negatif (Ratti *et al.* 2004) atau rasio antara sampel terinfeksi dengan sampel sehat atau buffer (S/H Ratio) >2 (Sakhuja *et al.*, 2009).

Dari hasil pembacaan menggunakan mesin *ELISA Reader*, sampel bibit tebu dari beberapa varietas menunjukkan gejala positif terinfeksi SCSMV setelah dilakukan uji serologi dengan *indirect ELISA* menunjukkan reaksi positif dengan antiserum yang telah dihasilkan pada penelitian ini. Dengan demikian antiserum poliklonal yang telah dihasilkan telah dapat digunakan untuk mendeteksi adanya partikel SCSMV pada daun bibit tebu. Namun untuk menambah sensitifitasnya perlu dilakukan pemurnian antiserum poliklonal.

Tabel 3. Nilai Absorbansi Reaksi Indirect *ELISA* Pada Panjang Gelombang 405 nm Diukur Menggunakan Mesin *ELISA Reader*

Sampel	Nilai absorbansi pada panjang gelombang 405 nm	S/H ratio*	> 3 x Kontrol negatif**	+/-
PS 864	1,001	12,207	Ya	+
PSJT 941	1,196	14,585	Ya	+
PSBM 901	0,902	11,000	Ya	+
PS 862	0,986	12,024	Ya	+
Kontrol Negatif (carbonate buffer pH 9,6)	0,082			
Kontrol Positif	1,161	14,158		

Kesimpulan

Antiserum poliklonal yang dihasilkan pada penelitian ini telah dapat digunakan sebagai pendeteksi virus mosaik bergaris pada tebu (SCSMV). Berdasarkan pengujian *indirect ELISA* antiserum poliklonal yang dihasilkan mampu bereaksi dengan partikel SCSMV yang ditandai dengan adanya perubahan warna pada sumuran *ELISA plate*

Daftar Pustaka

- Agindotan, O., Ahonsi, M.O., Domier L.L., Gray, M.E., and Bradley, C.A. 2010. Protocols application of sequence-independent amplification (SIA) for the identification of RNA viruses in bioenergy crops, *Journal of Virological Methods* (169): 119–128.
- Cooper, H.M and Paterson, Y. 2008. Preparation of polyclonal antisera, production of polyclonal antisera. *Current Protocol in Molecular Biology*. Immunology. 11.12.1-11.12.10. www.interscience.wiley.com. Published online January 2008.
- Damayanti Asmira.,T., Putra .K., dan Juliadi D. 2007. Kajian Sifat bio-ekologi dan biomolekuler virus mosaik bergaris pada tebu di Indonesia. Abstrak Penelitian dan Pengembangan Institut pertanian Bogor. Darmaga Bogor. Abstrak penelitian Litbang. ([http://weservebetter.wordpress.com/2008/06/04/Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat Institut Pertanian Bogor/](http://weservebetter.wordpress.com/2008/06/04/Lembaga-Penelitian-Dan-Pengabdian-Masyarakat-Institut-Pertanian-Bogor/)). Di akses tanggal 06 April 2009.
- Damayanti Asmira.T., dan Putra L.K. 2012. Preparasi RNA virus mosaik bergaris dari tanaman tebu menggunakan metode tabung PCR. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* (8) 1:22-27.
- Haider, S.M., Afgan S., Riaz H., Tahrir M., Javed A.M., Rashid N., and Iqbal J. 2011. Identification of two *sugarcane mosaic virus* (scmv) variants from naturally infected sugarcane crop in pakistan. *Pak.J.Bot* 43(2): 1157-1162,
- Hall, J.S., Adams B., Parsons T.J., French R., Lane L.C, and Jensen S.G. 1998. Molecular cloning, sequencing and phylogenetic relationships of a new potyvirus: sugarcane streak mosaic virus, and a reevaluation of the classification of the Potyviridae. *Mol Phylogenet Evol.* (10):323–332
- Hema, M., Sreenivasulu P., and Savithri H.S. 2002. Taxonomic position of sugarcane streak mosaic virus in the family Potyviridae. *Arch Virol.* (147)
- Koenig, R., Fribourg C.E. and. Jones R.A.C. 1979. Symptomological, serological, and electrophoretic diversity of isolates of Andean potato latent virus from different regions of the Andes. *Phyton* (69): 748–752.
- Li W, He Z., Li S., Huang Y., Zhang Z., Jiang D., Wang X., and Luo Z. 2011. Molecular characterization of a new strain of sugarcane streak mosaic virus (SCSMV). *Arch Virol.* Springer-Verlag 2011. Published Online 17 Sept 2011.
- Putra, L.K., dan Damayanti A.T. 2009. Penyakit mosaik pada tebu di Indonesia: survey lapang, deteksi virus, uji penularan, kisaran inang dan ketahanan varietas. *Majalah Penelitian Gula* 45 (1): 21-38
- Ratti C., Budge G., Ward L., Clover G., Autonell C.R., and Henry C. 2004. Detection and relative quantitation of *soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheatusing real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* (122) : 95–103.
- Sakhuja, A. G., Sears J.L., Alberto Nuñez., and Liu H. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium Zonate Spot Virus* Coat Protein expressed in *escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* (160) : 29–37.
- Thouvenel, J. C., Givord L., and Pfeiffer P. 1976. Guinea grass mosaic virus, a new member of the potato virus Y group. *J Phytopathology* 66 : 954-957
- Veerisetty, V and Myron K. B. 1978. Purification of Some Legume Carlaviruses. *J Phytopathology* 68 : 59-64.