

**SELEKSI, KARAKTERISASI, DAN REAKTIVITAS ANTIBODI MONOKLONAL
VIRUS KERDIL KEDELAI**

**SELECTION, CHARACTERIZATION, AND REACTIVATION OF MONOCLONAL
ANTIBODY ON SOYBEAN STUNT VIRUS**

Sri Sulandari dan Y. B. Sumardiyono
*Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*
Roechan M.
Pusat Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

ABSTRACT

Soybean Stunt Virus (SSV) is a member of Cucumber mosaic virus group that caused soybean stunt disease. The disease is the most important viral disease of soybean in Indonesia. The objective of the study was to obtain SSV monoclonal antibody for detection SSV in both infected seed and plant

Six hybridoma clones were obtained from fusion between spleen cells of BALB/c immunized with Soybean stunt virus and mouse myeloma cell lines (NS-1); they were IgG3 type antibodies, and its titres were varied between 1: 10 to 1: 100. Using non-precoated I-ELISA method, the homolog antigen (SSV) was well detected but not the heterolog antigens (CMV isolated from banana, tobacco).

Keywords: Soybean Stunt Virus, monoclonal antibody, selection

INTISARI

Virus kerdil kedelai (*Soybean Stunt Virus* SSV) merupakan penyebab penyakit kerdil kedelai, penyakit virus terpenting pada kedelai. Penelitian berikut bertujuan untuk menghasilkan antibodi monoklonal sebagai alat deteksi SSV baik yang terkandung dalam benih maupun tanaman.

Hasil fusi sel limfa yang berasal dari mencit BALB/c yang diimunisasi virus kerdil kedelai dengan sel mieloma NS-1 dihasilkan enam klon hibridoma, yang merupakan tipe IgG3, dengan titer antara 10 sampai 100. Dengan menggunakan *non-pre-coated* I-ELISA, antibodi dapat membedakan antara antigen homolog (virus kerdil kedelai/ *Soybean Stunt Virus* = SSV) dengan antigen heterolog (virus mosaik mentimun/ *Cucumber Mosaic Virus* = CMV) isolat tembakau dan pisang.

Kata kunci: virus kerdil kedelai, antibodi monoklonal, seleksi

PENDAHULUAN

Penyakit kerdil pada kedelai yang disebabkan oleh virus kerdil kedelai (*Soybean Stunt Virus* = SSV) merupakan penyakit kedelai yang merugikan dan tersebar luas di Indonesia. Virus dapat

menurunkan produksi antara 52,5 - 95% (Roechan, 1992; Sudjono *et al.*, 1985; Tamada *et al.*, 1977). Virus ditularkan lewat benih, kemudian penularan di pertanaman dengan perantaraan serangga vektor. Vektor terpenting adalah *Aphis glycines* Mats. yang menularkan SSV secara non persisten.

Tanaman dari benih yang membawa SSV akan menjadi sumber inokulum primer dan selanjutnya akan ditularkan ke tanaman di sekitarnya oleh serangga vektor. Suseno (1987) mengemukakan bahwa dalam sertifikasi benih, status kesehatan benih dilakukan; untuk mengendalikan penyakit yang terbawa biji. Cara mendeteksi virus terbawa benih yang efisien dilaksanakan dengan metode serologi (Lange, 1985).

Dalam deteksi virus terbawa benih secara serologis dapat dengan menggunakan antibodi poliklonal telah memberikan hasil yang baik. Akan tetapi antibodi tersebut mempunyai keterbatasan yang menyangkut variabilitas titer, kelas maupun spesifitasnya (Van regenmortel, 1982). Untuk mengatasi hal tersebut telah banyak dikembangkan pemanfaatan antibodi monoklonal untuk berbagai keperluan serodiagnosis baik di bidang kesehatan, pertanian, dan lainnya (Chen *et al.*, 1997; Lankow *et al.*, 1997; Qadri *et al.*, 1996; Somowiyarjo *et al.*, 1990). Penelitian pembuatan antibodi poliklonal terhadap SSV telah dilaporkan oleh Sri-Sulandari *et al.*, 1998. Tulisan ini menyajikan hasil penelitian lanjutan yang bertujuan untuk membuat antibodi monoklonal virus kerdil kedelai, dan untuk mengetahui kualitas serta reaktivitasnya terhadap antigen yang homolog dan heterolog.

BAHAN DAN METODE

Antibodi. Antibodi diperoleh dengan melakukan imunisasi intraperitoneal pada mencit BALB/c umur 5 - 7 minggu dengan dosis 20, 30, 30 µg dengan interval 2 minggu. Lima hari sebelum fusi dibooster dengan 40 µg sediaan virus lewat ekor. Fusi dilakukan dengan metode Galfre *et al.*, 1977 *cit.* Somowiyarjo, 1991 sebagai berikut: sel limfa hasil imunisasi dicampur mieloma NS I : 10: 1 kemudian disentrifus 1500 rpm selama 10 menit. Pelet

ditambah tetes demi tetes 1 mL 45% PEG (Polyethylene Glycol) sambil digoyang. Campuran tersebut dihangatkan sehingga terbentuk dua lapisan. PEG diencerkan dengan menambah campuran medium DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) dan RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) hangat secara bertahap kemudian disentrifus pada 1500 rpm selama 10 menit. Pelet diresuspensi secara bertahap dengan medium (RPMI + DMEM) dan HAT (*Hypoxanthine Aminopterin Thymidine*). Suspensi sel kemudian dimasukkan ke dalam plat kultur yang berisi 96 sumuran dan tiap sumuran diisi 100 ul. Skrining dilakukan dengan I-Elisa (Koenig, 1991). Klon terpilih diklonasi 3 - 4 kali, menggunakan teknik pengenceran (*limiting dilution*). Klon yang stabil kemudian diperbanyak secara *in vitro* dan *in vivo* untuk menghasilkan antibodi monoklonal.

Pengujian klas dan sub klas antibodi. Pengujian dilakukan dengan menggunakan *Isotyping Kit* antibodi monoklonal dari Sigma (ISO-2; Sigma), sesuai dengan prosedurnya yang disertakan.

Pengujian titer antibodi. Klon hibridoma terpilih kemudian diperbanyak secara *in vitro* sehingga dihasilkan antibodi monoklonal. Untuk menentukan titer antibodi monoklonal, dibuat seri pengenceran dengan kelipatan sepuluh kali, dan kemudian dilakukan uji I-Elisa (Koenig, 1991) dengan antigen homolog.

Reaktivitas antibodi dengan antigen yang homolog dan heterolog. Antibodi monoklonal yang dihasilkan diuji reaktivitasnya dengan antigen yang homolog (virus kerdil kedelai = SSV) dan antigen yang heterolog (CMV-p dan CMV-t). Sebagai pembanding antibodi digunakan cairan tanaman sehat. Pengujian dilakukan secara I-Elisa (Koenig, 1991).

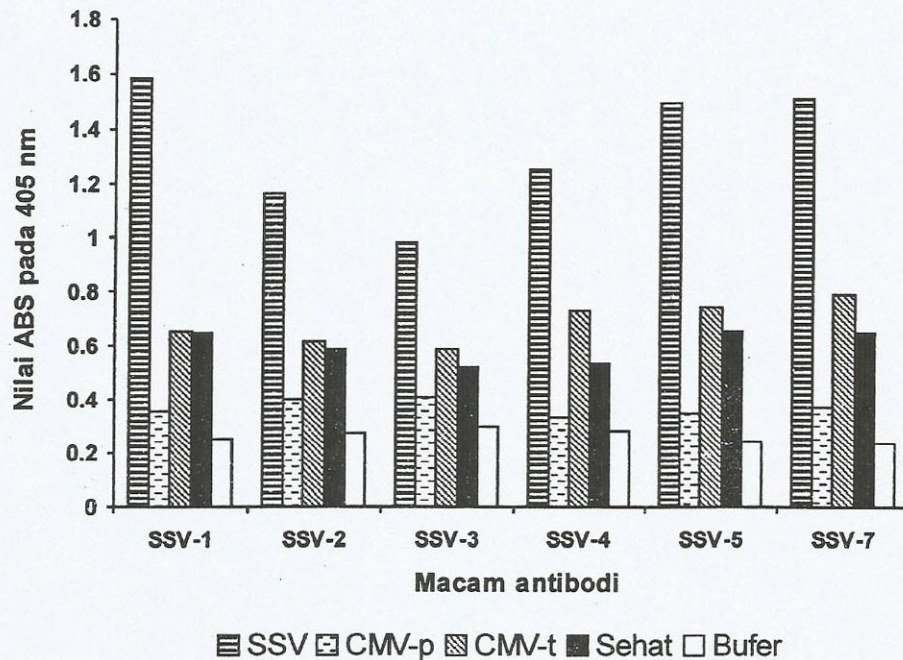
HASIL DAN PEMBAHASAN

Antibodi. Hasil fusi diperoleh 72 hibridoma (30 persen) yang tersebar ke dalam 4 plat kultur. Skrining dilakukan terhadap 30 klon yang pertumbuhan selnya bagus, bersih, dan medianya berwarna kuning merata yang dilakukan secara acak. Pemilihan juga didasarkan pada tiap sumuran yang mempunyai koloni antara 1 sampai 3. Setelah 4 kali kloning dihasilkan 13 klon hibridoma yang dapat menghasilkan reaksi yang spesifik terhadap virus kerdil kedelai. Dari 13 klon hibridoma setelah diperbanyak secara *in vitro* yang pertumbuhan selnya bagus ada tujuh. Namun antibodi yang dapat diuji hanya enam yaitu kode SSV-1.1; SSV-1.2; SSV-1.3; SSV-1.4; SSV-1.5; dan SSV-1.7. Keberhasilan fusi tersebut masih relatif rendah (30 persen) karena pada saat fusi kondisinya kurang optimal, misalnya saat penambahan PEG terlalu cepat sehingga mengganggu proses fusi atau pada saat pencucian PEG penambahan media juga terlalu cepat sehingga sel-sel yang sudah mengalami fusi akan terpisah kembali. Faktor lain yang menyebabkan adalah banyaknya fusan yang berasal dari sel mieloma dengan sel mieloma atau antara sel limfa dengan sel limfa sehingga tidak tumbuh pada medium yang mengandung HAT. Oleh Artama (1990) disebutkan bahwa hibridoma yang mampu bertahan dan berkembang dalam medium yang mengandung HAT adalah sel-sel fusan antara sel mieloma dengan sel limfa.

Pengujian klas dan sub klas antibodi. Hasil pengujian kelas imunoglobulin fusan menunjukkan bahwa ke enam antibodi yang diperoleh dari golongan IgG3.

Pengujian titer antibodi. Titer antibodi monoklonal untuk masing-masing klon hibridoma berkisar antara 10 sampai 100 kali, walaupun pada pengenceran 1000 kali juga masih ada kecenderungan bereaksi positif. Rendahnya titer tersebut karena sel yang tumbuh belum secara optimal mensekresi antibodi, atau disebabkan faktor pengujiannya misalnya: terjadinya ekkses antigen ataupun antibodi. Pada pengujian ini antigen yang digunakan adalah sap tanaman sakit yang diencerkan 100 sampai 1000 kali. Pada banyak kasus disebutkan bahwa pada umumnya antibodi monoklonal yang diproduksi secara *in vitro* titernya jauh lebih rendah dibandingkan dengan yang dihasilkan secara *in vivo*. Antibodi monoklonal virus kerdil pisang yang diproduksi secara *in vivo* titernya 40 sampai 62 kali lipat dibandingkan yang dihasilkan secara *in vitro* (Su & Wu, 1989).

Reaktivitas antibodi monoklonal dengan antigen homolog dan heterolog. Hasil pengujian ke enam antibodi monoklonal yang dihasilkan (SSV-1.1; SSV-1.2; SSV-1.3; SSV-1.4; SSV-1.5; dan SSV-1.7) terhadap antigen dari sampel tanaman sehat, tanaman yang terserang virus kerdil kedelai serta dua isolat *Cucumber Mosaic Virus* (CMV) yaitu dari tembakau dan pisang dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Reaktivitas antibodi monoklonal SSV terhadap antigen homolog dan heterolog

Gambar 1 menunjukkan bahwa semua antibodi yang diperoleh dalam penelitian ini mampu membedakan antara sampel tanaman sakit (SSV) dengan yang sehat (Sehat) serta bufer. Selain itu juga dapat membedakan antara virus kerdil kedelai (SSV) dengan isolat-isolat CMV yang berasal dari tembakau (CMV t) dan CMV pisang (CMV p) yang sama-sama termasuk dalam satu kelompok *Cucumovirus*. Berdasarkan sifat *serotype*, SSV, dan CMV isolat pisang termasuk dalam sub kelompok I (Wahyuni *et al.*, 1992), dan keduanya bereaksi positif dengan antibodi CMV-Y (Roechan *et al.*, 1975; Suastika *et al.*, 1996). Antibodi poliklonal terhadap SSV yang diperoleh dalam penelitian lain tidak dapat dibedakan.

Kemampuan keenam antibodi monoklonal untuk membedakan SSV dengan CMV yang keduanya anggota *Cucumovirus*, karena berasal dari satu klon sel hibridoma, sehingga menjadi sangat spesifik (Mernaugh

et al., 1990; Torrance, 1992). SSV dan CMV walaupun keduanya mempunyai hubungan kekeluargaan yang sangat dekat tetapi keduanya mempunyai perbedaan tipe maupun jumlah epitopnya. Epitop spesifik pada SSV yang menginduksi satu sel limfosit B sehingga antibodi hanya bereaksi dengan antibodi SSV. Epitop tersebut mungkin tidak dijumpai pada isolat-isolat lain dari CMV yang diuji. Kasus lain terjadi misalnya pada *Abaca Mosaic Virus* dan *Banana Bract Mosaic*, keduanya termasuk Potyvirus yang menyerang pisang dengan gejala yang mirip dapat dibedakan menggunakan antibodi monoklonal (Thomas *et al.*, 1997). Isolat-isolat *Wheat Mosaic Virus* dapat dibedakan adanya perbedaan asam amino tunggal yang menyusun mantel protein dengan menggunakan monoklonal antibodi (Chen *et al.*, 1997). Pada *Citrus Tristeza Virus*, dengan *western blotting* menggunakan 30 macam antibodi dapat dibedakan menjadi 5

kelompok berdasar epitopnya (Nikolaeva *et al.*, 1996).

KESIMPULAN

1. Hasil fusi antara mieloma dengan hibridoma dalam penelitian ini menghasilkan enam klon hibridoma (SSV-1.1; SSV-1.2; SSV-1.3; SSV-1.4; SSV-1.5; dan SSV-1.7) dengan titer rata-rata antara 10 sampai 100 kali; semua klon antibodi tergolong dalam isotipe IgG3.
2. Antibodi yang dihasilkan bereaksi dengan antigen homolog (SSV) dan tidak bereaksi dengan antigen heterolog (CMV-p, CMV-t) serta cairan tanaman kedelai sehat.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih 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 penelitiannomor:16/P2PT/DPPM/98/HBV/3/V/1998.

DAFTAR PUSTAKA

- Artama, W.T. 1990. *Antibodi Monoklonal, Teori, Produksi, Karakterisasi, dan Penerapan*. Pusat Antar Universitas-Bioteknologi, UGM, Yogyakarta. 194p.
- Chen, J., L. Torrance, G.H. Cowan, S.A. MacFarlane, G. Stubbs, & Wilson, T.M.A. 1997. Monoclonal Antibodies Detect a Single Amino Acid Difference Between the Coat Proteins of Soilborne Wheat Mosaic Virus Isolates: Implications for Virus Structure. *Phytopathology* 87: 295 - 301.
- Koenig, R. 1991. 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 Inst. 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.
- 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.
- Matthews, R.E.F. 1992. *Fundamental of Plant Virology*. Academic Press.
- 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.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Powell, C.A., Gumpf, D.J., Garnsey, S.M., & Lee, R.F. 1996. Mapping of Epitopes for Citrus Tristeza Virus Specific Monoclonal Antibodies Using Bacterially Expressed Coat Protein Coat Protein Fragments. *Phytopathology* 86: 974 - 979.
- Qadri, F., Mohi, M.G., Chowdhury, A., Alam, K., Azim, T., Sears, C., Sack, R.B., & Albert, M.J. 1996. Monoclonal Antibodies to the Anterotoxin of *Bacteroides fragilis*: Production, Characterization, and Immunodiagnostic Application. *American Soc. for Microbiology*. 3: 608 - 610.
- Roechan, M. 1992. *Penyakit-Penyakit Virus pada Tanaman Kedelai*. Disertasi S3. Univ. Padjajaran, Bandung. (tidak dipublikasikan).
- Sudjono, M. Amir, & R. Martoatmodjo. 1985. Penyakit Kedelai dan Penanggulangannya. *Dalam*: Somaatmadja, S. (Ed.). *Kedelai*. Balai

- Sulandari, S., Y.B. Sumardiyono, & M. Roechan. 1998. Reaktivitas Antibodi Poliklonal SSV terhadap Antigen yang Homolog dan Heterolog. *J. Perlind. Tan. Indon.* 4: 51 - 56.
- Somowiyarjo, S., N. Sako, & F. Nonaka. 1988. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies to Watermelon Mosaic Virus 2. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 541 - 548.
- Somowiyarjo, S. 1991. *Seleksi, Karakterisasi, Produksi, dan Purifikasi Antibodi Monoklonal*. Laboratorium Virologi, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta.
- Su, H.J. & R.Y. Wu. 1989. Characterization and Monoclonal Antibodies of Virus Causing Banana Bunchy Top. *Technical Bulletin* No. 115, National Taiwan University, Taiwan, RRC.
- Suastika, G., K. Tomaru, J. Kurihara, & K.T. 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 of Agriculture. JSPS-DGHE Program p: 60 - 71.
- Suseno, R. 1987. Virus Terbawa Benih Tanaman Pangan serta Hubungannya dengan Sertifikasi dan Pengawasan Mutu Benih. *Lokakarya Patogen Terbawa Benih dalam Rangka Pengembangan Pengawasan Mutu dan Sertifikasi Benih*, Bogor, 8 - 9 Desember 1987.
- Tamada, T., T. Goto., I. Chiba, & T. Suwa. 1970. Soybean Dwarf, a New Virus Diseases. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 35: 282 - 285.
- Thomas, J.E., Geering, A.D.W., Gambley, C.F., Kessling, A.F., & White, M. 1997. Purification, Properties, and Diagnosis of Banana Bract Mosaic Potyvirus and Its Distinction from Abaca Mosaic Potyvirus. *Phytopathology* 87: 123 - 131.
- Torrance, L. 1992. Serological Methods to Detect Plant Viruses: Production and Use of Monoclonal Antibodies. *Dalam* Duncan, J. M. & L. Torrance (Eds.). *Technique for the Rapid Detection of Plant Pathogens*. Blackwell Scientific Publ.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1981. *Serology of 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.