

**PEMANFAATAN ANTIBODI MONOKLONAL DALAM IMMUNOASSAY  
UNTUK DETEKSI BACULOVIRUS ORYCTES**

**THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN THE IMMUNOASSAY FOR  
DETECTING BACULOVIRUS ORYCTES**

Susanto Somowiyarjo  
Fakultas Pertanian UGM

Hery Haryanto  
Fakultas Pertanian, Universitas Mataram

Sri Wening  
Fakultas Pertanian UGM

**ABSTRACT**

The application of non-precoated Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (I-ELISA) and Dot Immunobinding Assay (DIBA) employing monoclonal antibodies (MCA) against Yogyakarta isolate of Baculovirus oryctes Huger. was described. The MCA-Bv-4 having subclass of IgG2a and titer in vitro of  $10^4$ - $10^5$  proved to be useful antibody for virus detection. The great potential of I-ELISA using MCA-Bv-4 has been its specificity, being able to discriminate between healthy and virus-infected coconut beetle (*Oryctes rhinoceros* L.). The assay could also differentiate between *B. oryctes* and *Monodon baculovirus*, the pathogen of shrimp disease. The best tissue for preparing virus antigen from crude extract was found to be the midgut of the beetle. Head, thorax, abdomen, and tibia were not suitable for preparing the test antigen. The crude extract of beetle showed high endogenous enzyme activity to the substrate of DIBA, which precluded the detection of *B. oryctes* using DIBA. The MCA-Bv-4 could be used to improve the monitoring of the virus to support the program of biological control of coconut beetle using *B. oryctes*.

Key words: monoclonal antibodies, immunoassay, Baculovirus oryctes

**INTISARI**

Antibodi monoklonal terhadap *Baculovirus oryctes* Huger. isolat Yogyakarta telah diproduksi dan dievaluasi kemanfaatannya dalam non-precoated Indirect ELISA (I-ELISA) dan Dot Immunobinding Assay (DIBA) untuk deteksi virus dalam jaringan kumbang kelapa (*Oryctes rhinoceros* L.). Antibodi monoklonal nomor MCA-Bv-4 yang mempunyai titer in vitro  $10^4$ - $10^5$  dan subkelas antibodi IgG2a terbukti dapat dimanfaatkan dalam I-ELISA baik untuk deteksi virus murni maupun virus dalam ekstrak dalam jaringan kumbang kelapa. Antibodi monoklonal hanya dapat mengenali virus dalam ekstrak usus tengah (midgut) tetapi tidak dalam ekstrak kepala, dada, perut, dan tungkai kumbang. Indirect-ELISA yang dikembangkan juga mampu membedakan secara tegas antara *Baculovirus oryctes* dengan *Monodon baculovirus* yang merupakan patogen penting pada udang. Substrat dari DIBA dapat bereaksi secara kuat dengan antigen uji yang berupa ekstrak kumbang sehat dan sakit sehingga disimpulkan bahwa protokol DIBA yang diuji tidak cocok untuk deteksi *B. oryctes* dalam jaringan kumbang kelapa. Ketepatan deteksi *B. oryctes* dengan I-ELISA diharapkan dapat dimanfaatkan untuk kajian dan penyempurnaan pengendalian hayati kumbang kelapa dengan memanfaatkan *B. oryctes*.

Kata kunci: antibodi monoklonal, immunoassay, Baculovirus oryctes

## PENDAHULUAN

Baculovirus merupakan kelompok virus yang cukup besar dengan inang utamanya serangga. Istilah *Baculovirus* mengacu pada ciri mantel protein yang berbentuk tongkat (*rod-shape capsid*) dengan asam nukleat jenis DNA (Summers, 1977). Virus ini umumnya mempunyai diameter capsid 40–50 nm dan panjang 200–400 nm (O'reilly *et al.*, 1992). Salah satu anggota dari *Baculovirus* yang diketahui berpotensi sebagai agens pengendalian hayati adalah *Baculovirus oryctes* Huger. Virus ini telah lama diketahui dapat menginfeksi dan menyebabkan kematian pada kumbang kelapa (*Oryctes rhinoceros*) yang merupakan salah satu hama penting pada komoditas kelapa di Asia (Kalshoven, 1981).

Sejak diketahuinya bahwa pengendalian kumbang kelapa dengan mengandalkan insektisida kimia berdampak negatif terhadap lingkungan dan meningkatkan biaya produksi, perhatian terhadap pemanfaatan *B. oryctes* sebagai agens pengendalian hayati kumbang tersebut meningkat dengan pesat. Hal ini sejalan dengan diberlakukannya konsep pengendalian hama terpadu (PHT) yang salah satu komponen pentingnya adalah memanfaatkan musuh alami (Mangoendihardjo, 1995). Pemanfaatan musuh alami dalam PHT dapat juga dianggap sebagai pelaksanaan konsep eko-efisiensi, yaitu manajemen bisnis yang mempersatukan antara efisiensi ekonomi dan ekologi (Soemarwoto, 1996).

Hambatan utama dalam pengembangan *B. oryctes* sebagai komponen pengendalian hama terpadu pada kelapa adalah belum diketahuinya strain virulen untuk masing-masing lokasi, belum dikuasainya metode pengembangbiakan virus yang mudah diterapkan di kebun serta belum tersedianya metode deteksi virus

yang diperlukan untuk kajian epidemiologi maupun kegiatan monitoring.

Kemajuan di bidang bioteknologi, khususnya penemuan teknologi hibridoma oleh George Kohler & Cesar Milstein (1975) telah membuka peluang pengembangan serodiagnosis pada berbagai jenis patogen manusia, hewan, dan tanaman (Sikora & Smedley, 1984). Pemanfaatan teknologi monoklonal antibodi pada berbagai kondisi telah terbukti dapat membantu pelaksanaan pengendalian hama terpadu dengan hasil yang memuaskan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan antibodi monoklonal terhadap *B. oryctes* dan memanfaatkannya untuk mengembangkan perangkat deteksi virus dalam rangka pengendalian hayati kumbang kelapa. Informasi mengenai teknik penularan, perbanyakan, pemurnian, elektron mikroskopi, serta karakterisasi molekuler virus yang dikaji dalam penelitian ini telah dilaporkan sebelumnya (Kobayashi & Somowiyarjo, 1995; Somowiyarjo *et al.*, 1995; Sumardiyo, 1995).

## BAHAN DAN METODE

**Penyiapan antigen.** Sebagai bahan penelitian ini digunakan isolat *B. oryctes* yang telah dicoba di lapangan dan terdapat tanda-tanda efektif untuk menekan populasi *O. rhinoceros* di Jawa Timur dan di Yogyakarta. Virus diperoleh dari Laboratorium Pengendalian Hayati Dinas Perkebunan DIY. Virus diperbanyak dan dimurnikan dengan cara yang pernah dilaporkan oleh Somowiyarjo *et al.* (1995). Virus hasil pemurnian disimpan pada temperatur  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan untuk antigen uji maupun untuk imunogen.

Pada uji reaksi silang digunakan antigen uji dari udang sakit yang diduga disebabkan oleh *Monodon baculovirus* (Murwantoko, 1997).

**Konstruksi hibridoma.** Produksi antibodi monoklonal dilakukan dengan metode yang dilaporkan oleh Kohler & Milstein (1975) dan telah diadopsi antara lain untuk pembuatan antibodi monoklonal terhadap *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) (Somowiyarjo *et al.* 1988). Pada dasarnya tahapan kegiatan yang ditempuh meliputi:

- a. **Imunisasi.** Untuk imunisasi digunakan mencit Balb/c yang berumur 5–7 minggu. Masing-masing mencit diimunisasi tiga kali secara intraperitoneal dengan dosis berturut-turut 20 µg, 40 µg, dan 60 µg dengan interval tiga minggu. Virus dicampur (1:1) dengan *Freund's complete adjuvant* pada saat imunisasi pertama dan dengan *Freund's incomplete adjuvant* pada imunisasi kedua dan ketiga. Setelah dibiarkan selama satu bulan, mencit disuntik booster dengan 100 µg virus tanpa *adjuvant* yang dilakukan secara intravena pada ekornya. Penyuntikan booster dilakukan tiga hari sebelum fusi.
- b. **Sel myeloma.** Sel myeloma yang digunakan dalam penelitian ini adalah sel myeloma yang defisiensi dalam enzim *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* (HPRT) (Schreier *et al.*, 1980). Myeloma dipelihara dengan media RPMI (*Rosewell Park Memorial Institute*) dalam *water-jacketed incubator* pada kadar CO<sub>2</sub> 5% dan suhu 37°C.
- c. **Fusi.** Fusi sel dilakukan dengan metode Galfre *et al.* (1977) dengan menggunakan *polyethylene glycol* (PEG).
- d. **Skrining dan kloning.** Skrining dilakukan dengan *Indirect-ELISA* seperti yang dilaporkan oleh Koenig (1981) dengan kondisi pengujian seperti yang dilaporkan oleh Somowiyarjo *et al.* (1985; 1986). Kloning hibridoma dilakukan dengan metode pengenceran.

**Uji serologi.** Pada penelitian ini akan dilakukan dua jenis uji serologi yaitu *non-precoated* I-ELISA menurut Koenig (1981) dan *Dot Immunobinding Assay* (Hibi &

Saito, 1985). Dalam garis besarnya *Indirect-ELISA* dilakukan dengan menginkubasikan ELISA plate (*Maxisorp Immunolon*) dengan: (1) 100 µl antigen dalam bufer karbonat pH 9,6 selama empat jam pada suhu 37°C; (2) 150 µl 0,05% *Bovine Serum Albumin* dalam PBS selama 90 menit pada suhu 37°C; (3) 100 µl antibodi monoklonal dalam PBS *Tween* selama 12 jam pada suhu 6°C; (4) 100 µl konjugat selama empat jam pada suhu 6°C; dan (5) 100 µl *p-nitrophenyl phosphate* (1 mg/ml) dalam 10% *Diethanol amine* pH 9,8. Di antara inkubasi reaktan, plate dicuci tiga kali dengan menggunakan PBS *Tween* 20. Nilai absorban ELISA diukur dengan ELISA reader pada panjang gelombang 405 nm.

Uji DIBA pada dasarnya sama dengan *Indirect-ELISA* kecuali sebagai gantinya ELISA plate digunakan kertas *nitrocellulose membrane* (*BioRad*). Pada akhir pengujian kertas membran nitroselulosa diinkubasikan dengan larutan pengembang yang disiapkan dengan mencampur *fast red TR salt* (Sigma) dan *naphthol AS-MX phosphate* (Sigma) sebagaimana direkomendasikan oleh Bantari & Goodwin (1985).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakterisasi hibridoma terhadap B. oryctes.** Setelah dilakukan fusi antara myeloma dan sel limfa mencit, fusan didistribusi ke dalam 240 sumuran pada *microplate* dengan 96 sumuran. Pada skrining pertama terdapat 96 sumuran yang ditumbuhi hibridoma. Setelah melewati tiga kali kloning, 16 klon hibridoma menghasilkan antibodi yang bereaksi positif dengan virus murni dan tidak bereaksi dengan antigen dari kumbang sehat. Dari 16 hibridoma tersebut selanjutnya dipilih tujuh hibridoma yang menunjukkan nilai absorban antara 0,43–0,51. Karakterisasi parsial antibodi

dari ketujuh hibridoma tersebut disajikan pada Tabel 1.

Berdasarkan sifat antibodi monoklonal yang disajikan pada Tabel 1 pada penelitian selanjutnya antibodi monoklonal yang diproduksi oleh hibridoma MCA-Bv-4 dimanfaatkan untuk pengembangan perangkat deteksi virus.

**Optimasi pengenceran antibodi.** Sebagai langkah awal dalam mengembangkan I-ELISA, ditentukan pengenceran antibodi yang optimum. Pengujian dilakukan dengan antigen uji berupa virus murni dan hasil penelitian disajikan pada Gambar 1.

Meskipun antibodi monoklonal masih dapat menunjukkan reaksi sampai pada pengenceran  $10^4$  namun untuk keperluan deteksi dengan kriteria positif berupa nilai absorbansi dua kali lipat nilai absorbansi pada kontrol maka pada penelitian selanjutnya antibodi monoklonal diuji pada pengenceran  $100 \times$ . Nilai pengenceran ini dipandang relatif rendah apabila dibandingkan dengan berbagai antibodi monoklonal terhadap antigen yang lain, misalnya ZYMV yang dapat mencapai  $1000 \times$  (Somowiyarjo *et al.*, 1988). Selain titernya yang relatif rendah ELISA dengan menggunakan MCA-Bv-4 yang diproduksi secara *in vitro* juga menunjukkan nilai absorbansi yang tidak terlalu tinggi. Dua fakta ini memberikan petunjuk bahwa cara imunisasi yang dilakukan dengan isolat virus tersebut masih belum optimal dalam menstimulasi pembentukan antibodi. Untuk meningkatkan kualitas antibodi monoklonal terhadap isolat ini mungkin dapat

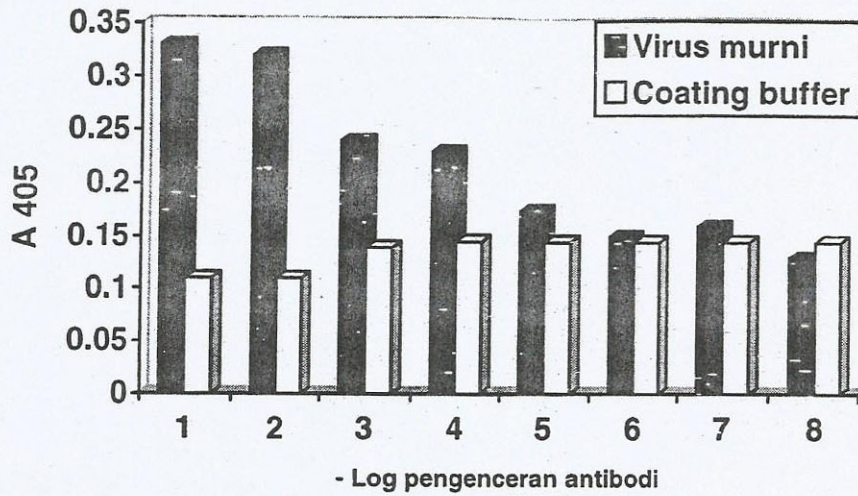
dilakukan dengan cara memperpanjang masa imunisasi maupun dengan cara memilih jenis myeloma dan mencit yang lebih sesuai. Cara lain yang dapat ditempuh ialah dengan cara memproduksi antibodi monoklonal dengan cara *in vivo*. Somowiyarjo *et al.* (1988) melaporkan bahwa antibodi monoklonal terhadap ZYMV yang diproduksi secara *in vitro* mempunyai titer  $10^4$ - $10^5$  sedangkan yang diproduksi secara *in vivo* mempunyai titer tertinggi  $10^8$ - $10^9$ .

**Sensitivitas ELISA.** Untuk mengetahui kepekaan I-ELISA dengan antibodi MCA-Bv-4 dilakukan pengujian dengan antigen uji berupa virus murni yang hasilnya disajikan pada Gambar 2.

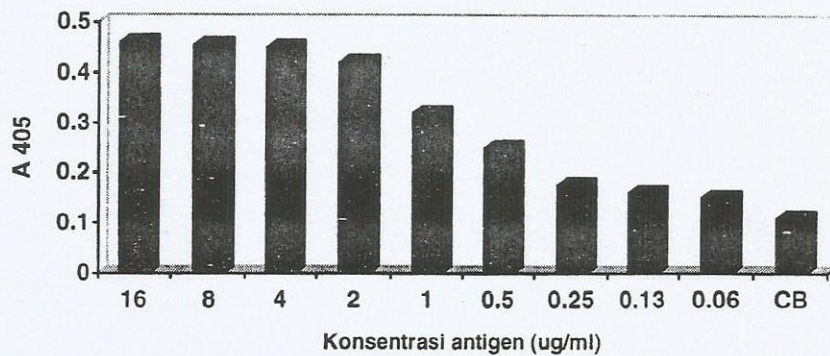
Pada uji ELISA dengan antigen uji berupa ekstrak usus tengah, diketahui bahwa *Indirect-ELISA* mampu mendeteksi keberadaan virus dalam ekstrak tersebut sampai pengenceran  $10^5$  (Gambar 3). Dibanding dengan uji serologi pada berbagai kombinasi antibodi dan virus, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ELISA yang dikembangkan pada penelitian ini relatif kurang sensitif. Pada penelitian sebelumnya ELISA mampu mendeteksi keberadaan ZYMV dalam ekstrak tanaman sampai pengenceran  $10^7$ . Rendahnya tingkat sensitivitas pengujian ini mungkin disebabkan oleh adanya berbagai zat penghambat reaksi serologi dalam jaringan serangga. Untuk meningkatkan sensitivitas suatu protokol ELISA antara lain disarankan dengan cara memilih bufer untuk ekstraksi antigen uji (Clark & Bar-Joseph, 1984).

Tabel 1. Karakterisasi antibodi monoklonal terhadap *B. oryctes*

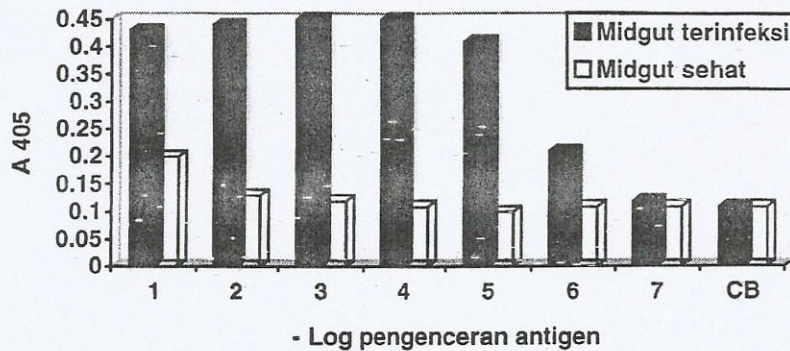
No.	Nomor klon	Titer <i>in vitro</i>	Subkelas	Nilai A405 dengan antigen uji	
				Virus murni	Ekst. sehat
1.	MCA-Bv-1	$10^2$ - $10^3$	Tidak dites (td)	0,435	0,095
2.	MCA-Bv-2	$10^3$ - $10^4$	td	0,516	0,145
3.	MCA-Bv-3	$10^2$ - $10^3$	td	0,516	0,112
4.	MCA-Bv-4	$10^4$ - $10^5$	IgG2a	0,501	0,173
5.	MCA-Bv-5	$10^2$ - $10^3$	td	0,490	0,117
6.	MCA-Bv-6	$10^1$ - $10^2$	td	0,483	0,138
7.	MCA-Bv-7	$10^1$ - $10^2$	td	0,475	0,153



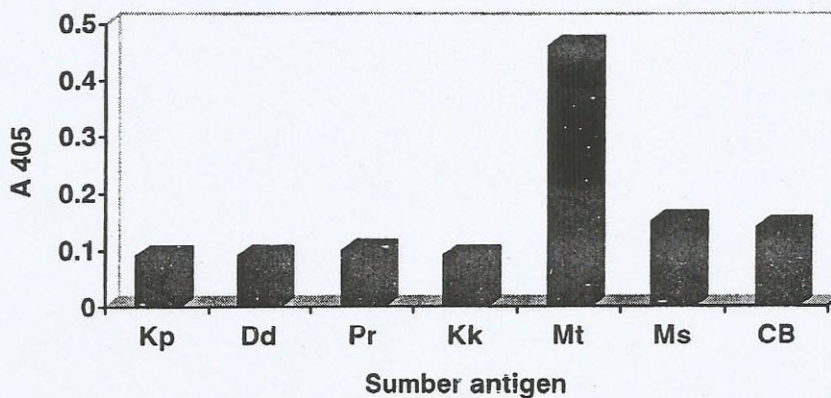
Gambar 1. Pengaruh pengenceran antibodi monoklonal (MCA-Bv-4) terhadap nilai absorbansi ELISA (A405) pada *non-precoated Indirect-ELISA* dengan antigen uji *B. oryctes* murni pada konsentrasi 5  $\mu\text{g/ml}$ .



Gambar 2. Pengaruh konsentrasi antigen uji yang berupa *B. oryctes* murni terhadap nilai absorbansi ELISA (A 405) yang diperoleh pada *non-precoated Indirect ELISA* dengan antibodi monoklonal MCA-Bv-4. CB = *Coating Buffer*.



Gambar 3. Pengaruh pengenceran antigen uji yang berupa ekstrak usus tengah kumbang kelapa terhadap nilai absorbansi ELISA (A405) yang diperoleh pada *non-precoated* ELISA dengan antibodi monoklonal terhadap *B. oryctes* (MCA-Bv-4). CB = *Coating Buffer*.



Gambar 4. Nilai absorbansi ELISA (A405) yang diperoleh pada *non-precoated Indirect-ELISA* memanfaatkan antibodi monoklonal terhadap *B. oryctes* (MCA-Bv-4) menggunakan antigen uji berupa ekstrak kepala (Kp), Dada (Dd), Perut (Pr), Kaki (Kk), dan usus tengah (Mt) dari *O. rhinoceros* yang terinfeksi virus, serta usus tengah (Ms) dari *O. rhinoceros* sehat. CB = *Coating Buffer*.

**Agihan *B. oryctes* dalam tubuh kumbang kelapa.** Mengingat pentingnya hasil monitoring dalam pengendalian hayati kumbang kelapa maka diperlukan pengambilan sampel yang tepat. Informasi ini diperoleh dengan pengujian *non-precoated Indirect ELISA* menggunakan antigen uji yang disiapkan dari kepala (*head*), dada (*thorax*), perut (*abdomen*),

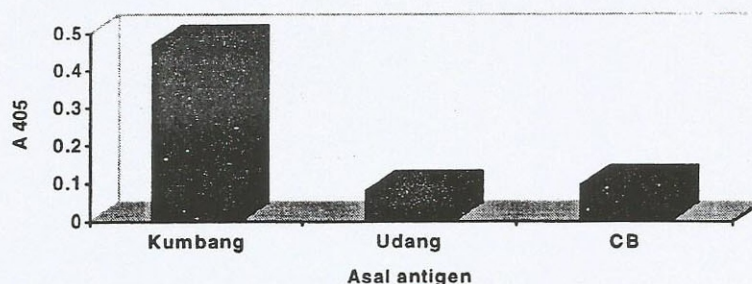
tungkai (*legs*), dan usus tengah (*midgut*). Dari gambar 4 dapat disimpulkan bahwa *B. oryctes* hanya terdeteksi secara baik pada *midgut* kumbang sakit. Tidak terdeteksinya virus dalam bagian tubuh selain *midgut* mungkin disebabkan karena titer virus di bagian tersebut memang sangat rendah. Meskipun secara teoritis virus terdistribusi secara sistemik ke seluruh tubuh terutama

melalui *hemolymph* tetapi terjadinya replikasi virus memang terutama terjadi pada midgut (O'reilly *et al.*, 1992; Summers, 1977).

**Spesifisitas Indirect-ELISA.** Di Indonesia budidaya kelapa banyak terdapat di pantai yang berdekatan dengan tambak tempat pemeliharaan udang. Oleh karena itu dalam suatu ekosistem dapat secara mudah ditemukan dua jenis anggota *Baculovirus*, yaitu *B. oryctes* yang dimanfaatkan sebagai agens pengendali hayati kumbang kelapa dan *M. baculovirus* yang banyak menimbulkan penyakit pada udang. Untuk mengetahui hubungan serologi kedua jenis virus tersebut dilakukan uji serologi dengan *non-precoated* I-ELISA yang hasilnya disajikan pada Gambar 5. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kedua jenis virus tersebut tidak mempunyai hubungan serologis sehingga memperkuat pendapat bahwa kedua jenis virus tersebut juga mempunyai inang yang berbeda. Tidak terdapatnya hubungan serologi di antara anggota *Baculovirus* juga telah dilaporkan, antara lain *Pieris brassicae granulosis virus* (Pbgv), *Agrotis segetum granulosis virus* (Asgv), serta *Spodoptera littoralis Nuclear Polyhedrosis Virus* (SINPV) (Crook & Payne, 1980).

**Pengujian dengan DIBA.** Pengujian DIBA dengan menggunakan ekstrak usus tengah kumbang kelapa menunjukkan bahwa uji ini tidak dapat membedakan antara kumbang sehat dan sakit. Perbaikan kondisi DIBA dengan menambah kepekatan *blocking solution* (*Bovine Serum Albumin*) dan pengenceran antibodi ternyata tidak dapat memperbaiki kinerja DIBA dalam membedakan jaringan sehat dan sakit.

Untuk mengetahui penyebab ketidakmampuan DIBA dalam membedakan jaringan sehat dan sakit tersebut dilakukan pengujian DIBA yang tanpa diberikan reaktan yang berupa konjugat. Setelah direaksikan dengan substrat, ternyata meskipun tanpa konjugat semua jaringan yang diuji menunjukkan reaksi positif dengan antibodi monoklonal. Data ini membuktikan bahwa baik pada jaringan sakit maupun sehat dari kumbang kelapa mengandung enzim endogen yang dapat bereaksi dengan substrat DIBA, yaitu campuran dari *fast red TR salt* (Sigma) dan *naphthol AS-MX phosphate* (Sigma) sebagaimana dianjurkan oleh Bantari & Goodwin (1985).



Gambar 5. Nilai absorban ELISA (A405) yang diperoleh dari *non-precoated Indirect-ELISA* dengan antibodi monoklonal terhadap *B. oryctes* (MCA-Bv-4) dengan antigen uji berupa *B. oryctes* murni (antigen homolog) dan ekstrak udang yang terinfeksi *M. baculovirus*. CB = *Coating Buffer*.

Ketidakmampuan satu protokol *immunoassay* untuk membedakan antara jaringan sehat dan sakit bukanlah fenomena yang langka. Mink *et al.* (1985) yang bekerja dengan *Tomato Ringspot Virus* (TmRSV) melaporkan bahwa ELISA yang dikembangkan selain bereaksi dengan antigen homolog dalam bentuk virus murni atau virus dalam ekstrak tanaman, juga bereaksi dengan ujung tanaman apel yang sehat, diduga dalam ujung apel yang sehat terdapat senyawa yang mempunyai antigenisitas mirip dengan TmRSV. Hasil ELISA dengan positif palsu (*false positive*) juga pernah ditemui oleh Somowiyarjo *et al.* (1985) pada saat mendeteksi ZYMV dalam jaringan tanaman labu-labuan menggunakan *Indirect-ELISA* dengan *conjugate peroxidase*. Reaksi positif palsu ini berasal dari peroksidase endogen yang terdapat dalam jaringan tanaman khususnya setelah memperoleh cekaman lingkungan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Tim Peneliti mengucapkan terima kasih kepada Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan atas pembiayaan penelitian melalui Proyek Pengkajian dan Penelitian Ilmu Pengetahuan Terapan, Nomor: 15/ P2IPT/ DPPM/ 96/ PHB II/ 4/ V/ 1996 tanggal 6 Mei 1996.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Banttari, E.E. & P.H. Goodwin. 1985. Detection of Potato Viruses S, X, and Y by Enzyme-Linked Immunosorbent assay on Nitrocellulose Membranes (Dot-ELISA). *Plant Dis.* 69: 202-205.
- Crook, E.N. & C.C. Payne. 1980. Comparison of three Methods of ELISA for Baculoviruses. *J. gen. Virol.* 46: 29-37.
- Galfre, G., S.C. Howe, C. Milstein G.W. Butcher & J.C. Howard. 1977. Antibodies to Major Histocompatibility Antigens Produced by Hybrid Cell Lines. *Nature* 266: 550-552.
- Hibi, T. & Y. Saito. 1985. A Dot-Immunobinding Assay for the Detection of Tobacco Mosaic Virus in Infected Tissues. *J. gen. Virol.* 66: 1191-1194.
- Kalshoven, L.G.E. 1981. *The Pest of Crops in Indonesia*. P.T. Ichtiar Baru-Van Hoeve, Jakarta. 701 p.
- Kobayashi, J. & S. Somowiyarjo. 1995. Properties of *Baculovirus oryctes* Isolated in Indonesia. *Indon. J. Plant Prot.* 1: 41-45.
- Kohler, G. & C. Milstein. 1975. Continuous Culture of Fused Cells Screening Antibodies of Predefined Specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Koenig, R. 1981. Indirect-ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant viruses. *J. gen. Virol.* 67: 53-62.
- Mangoendihardjo, S. 1995. *Pengendalian Hayati Komponen Utama Pengelolaan Jasad Pengganggu*. Pidato Pengukuhan Jabatan guru Besar dalam Ilmu Hama Tumbuhan pada Fakultas Pertanian tanggal 22 Maret 1995, Yogyakarta. 26 hlm.
- Mink, G.I, W.E. Howell & P.R. Fridlund. 1985. Apple tip Leaf antigens That Cause Spurious Reactions with Tomato Ringspot Virus Antisera in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Phytopathology* 75: 325-329.
- Murwantoko. 1997. *Isolasi dan Karakterisasi Parsial Biomolekul Beberapa Virus Penyebab Penyakit Udang*. Tesis S2 UGM, Yogyakarta (Tidak dipublikasikan). 64 hlm.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller & V.A. Luckow. 1992. *Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual*. W.H. Freeman and Company, New York. 347 p.



- Schreier, M., G. Kohler, H. Hengartner, C. Berek, M. Trucco, L. Forni, T. Staehelin, J. Stocker & B. Takaes. 1980. *Hybridoma Techniques*. Cold Spring Harbor, New York. 65 p.
- Sikora, K. & H.M. Smedley. 1984. *Monoclonal Antibodies*. Blackwell Scientific Publications, London. 132 p.
- Soemarwoto, O. 1996. Pembangunan Pertanian Berkelanjutan. *Orasi Ilmiah pada Peringatan Setengah Abad Fakultas Pertanian UGM* tanggal 27 September 1996. 18 hlm.
- Somowiyarjo, S., N. Sako & F. Nonaka. 1985. Application of Non-Precoated Indirect ELISA for Detecting Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 569-575.
- Somowiyarjo, S., N. Sako & F. Nonaka. 1986. Comparison of Two Indirect ELISA Procedures for Detecting Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 653-659.
- Somowiyarjo, S., N. Sako & F. Nonaka. 1988. The Use of Monoclonal Antibody for Detecting Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 54: 436-433.
- Somowiyarjo, S., Y.B. Sumardiyono, S. Hartono, Triharso & J. Kobayashi. 1995. Propagation and Purification of *Baculovirus oryctes* Huger. *Indon. J. Plant. Prot.* 1: 38-40.
- Sumardiyono, Y.B. 1995. Elektron Mikroskopi dan Immunogenisitas Baculovirus Isolat Yogyakarta. *Indon. J. Plant Prot.* 1: 46-49.
- Summers, M.D. 1977. Baculoviruses (Baculoviridae), p. 3-9. In Maramorosch, K. (ed.) *The Atlas of Insect and Plant Viruses*,. Acad. Press, New York.