

PEMANFAATAN ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY UNTUK
MENGUKUR TITER VIRUS DALAM BAWANG PUTIH

THE USE OF ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR MEASURING
VIRUS TITER IN GARLIC.

Susanto Somowiyarjo
Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Endang Mugiastuti
Fakultas Pertanian, Universitas Jenderal Soedirman
Y.M. Sugi Maryudani
Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

*Non-precoated Indirect ELISA had been developed by employing monoclonal antibodies against virus isolated from Sangga variety of garlic. The ELISA was used to measure the titer of virus in the plant. In comparison with biological assay using *Chenopodium amaranticolor*, ELISA was able to measure the virus titer faster and was more simpler. The highest titer of virus was obtained using the first leaf of garlic at age of 29-36 days after planting. Application of nitrogen at high dose and high temperature of garlic cultivation trends to increase the virus titer. The results of this experiment may be used to improve the method of sampling to detect virus in garlic tissues.*

Key words: monoclonal antibodies, garlic virus, titer

INTISARI

*Non-precoated Indirect-ELISA yang dikembangkan dengan antibodi monoklonal terhadap virus yang diisolasi dari bawang putih varietas Sangga, telah dimanfaatkan untuk mengukur titer virus dalam jaringan tanaman. Dibandingkan dengan uji hayati dengan *Chenopodium amaranticolor*, ELISA mampu mengukur titer virus dengan lebih cepat dan lebih sederhana. Untuk deteksi virus dalam bawang putih, nilai absorban ELISA tertinggi diperoleh pada antigen uji yang disiapkan dari daun pertama pada umur 29-36 hari setelah tanam. Pemupukan nitrogen pada dosis yang tinggi dan penanaman pada suhu yang tinggi cenderung meningkatkan titer virus dalam jaringan tanaman. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipakai sebagai dasar untuk menyempurnakan teknik deteksi virus bawang putih dengan memanfaatkan uji I-ELISA.*

Kata kunci: antibodi monoklonal, virus bawang putih, titer

PENGANTAR

Di Indonesia bawang putih (*Allium sativum* L.) merupakan komoditas hortikultura yang mempunyai arti penting baik sebagai penyedap makanan maupun sebagai bahan obat-obatan. Luas usaha tani bawang putih kurang lebih 18.000 ha (Van

der Meer & Permadi, 1990 *cit.* Van Dijk & Sutarya, 1992) dengan angka hasil aktual rata-rata 3 ton/ha. Angka hasil tersebut tergolong sangat rendah apabila dibandingkan dengan Jepang dan Taiwan yang dapat mencapai 20 ton/ha (Ogawa *et al.*, 1976). Rendahnya angka hasil bawang putih di Indonesia disebabkan karena

dalam budidayanya terdapat kendala yang bersifat sosio-ekonomi misalnya permodalan, tenaga kerja, dan tingkat pengetahuan petani, serta kendala yang bersifat biologi seperti mutu benih dan adanya gangguan hama maupun penyakit.

Salah satu kendala biologi yang sangat penting ialah adanya serangan berbagai jenis virus dengan tingkat infeksi 19–87% (Van Dijk & Sutarya, 1992). Upaya untuk pengendalian penyakit yang disebabkan oleh virus pada bawang putih dihadapkan pada persoalan belum terdapatnya perangkat deteksi patogen virus yang dapat dilakukan secara cepat dan tepat. Pada penelitian sebelumnya, Windarningsih *et al.* (1997) berhasil mengembangkan antibodi monoklonal terhadap virus bawang putih yang diduga termasuk kelompok *potyvirus*. Dengan antibodi monoklonal tersebut telah dikembangkan *non-precoated Indirect-ELISA* yang mampu mendeteksi virus murni sampai pada konsentrasi 0,1 µg/ml. Upaya pemanfaatan ELISA untuk deteksi virus bawang putih sering menghadapi masalah karena belum jelasnya teknik pengambilan sampel yang cocok untuk diuji. Hal ini disebabkan karena titer virus dalam tanaman dan berbagai kondisi belum diketahui secara pasti.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui titer virus pada berbagai kondisi yang diharapkan dapat menyempurnakan penerapan berbagai teknik deteksi untuk pengelolaan virus pada bawang putih.

BAHAN DAN METODE

Antibodi monoklonal dan Indirect-ELISA. Dalam penelitian ini digunakan antibodi monoklonal (Ab. 26 132) yang diproduksi secara *in vitro* dan dipakai pada pengenceran 100 × (Windarningsih *et al.*, 1997). Uji ELISA dilakukan dengan *non-*

precoated Indirect-ELISA (Koenig, 1981) pada *polystyrene microtiter plate* (*Maxisorp NUNC*). Di antara tahap-tahap inkubasi reaktan, *plate* dicuci 3 kali dengan 0,02 M *Phosphate Buffer Saline* pH 7,4 (PBS) mengandung *Tween* 0,02% masing-masing selama 3 menit. Pada garis besarnya pengujian dilakukan dengan menginkubasikan *plate* berturut-turut dengan: (a) 100 µg antigen dalam 0,05 bufer karbonat pH 9,6 selama 4 jam pada suhu 37°C; (b) 150 µl *blocking buffer* (1% *Bovine Serum Albumin*=BSA dalam PBS) selama 1 jam pada suhu 37°C; (c) 100 µl antibodi selama 18 jam pada suhu 4–6°C; (d) 100 µl konjugat *antimouse alkaline phosphatase* yang diencerkan 100 × dengan PBS selama 18 jam pada suhu 37°C; (e) 150 µl substrat (1 mg/ml *p*-nitrophenyl phosphate dalam 10% *diethanol amine* pH 9,8) selama 1 jam pada suhu ruang yang tidak terkena cahaya matahari. Nilai absorbansi ELISA diukur pada panjang gelombang 405 nm menggunakan ELISA reader.

Antigen uji. Sepuluh sampel dari lima varietas bawang putih yaitu Lumbu Putih, Lumbu Hijau, Tawangmangu Baru, Lokal Magelang, dan Lokal Temanggung ditanam pada polibag yang telah diisi tanah yang diperkaya dengan pupuk kandang. Pada masing-masing polibag ditanam dua bawang putih dan dilindungi dari gangguan hama dan penyakit. Setelah tanaman berumur lebih kurang 15 hari setelah tanam, daunnya diambil kemudian dipakai untuk menyiapkan ekstrak dengan bufer karbonat pH 9,6. Ekstrak kemudian disentrifus dengan kekuatan kurang lebih 1.500 g selama 10 menit. Supernatan selanjutnya diambil dan dipisahkan untuk keperluan pengujian.

Pengujian titer virus sebagian besar dilakukan dengan varietas Lumbu Putih dari Yogyakarta. Pada pengujian

pendahuluan ternyata hampir 100% varietas tersebut secara alami telah terinfeksi oleh virus yang secara serologi bereaksi dengan antibodi monoklonal terhadap *potyvirus* yang menginfeksi bawang putih varietas Sangga (Windarningsih *et al.* 1997).

Tanaman indikator. Untuk membandingkan kinerja *non-precoated Indirect-ELISA* maka dilakukan pengujian secara hayati dengan menggunakan *Chenopodium amaranticolor* Coste *et Reyn.* Penularan ke *C. amaranticolor* dilakukan secara mekanis dengan inokulum yang berupa sap daun bawang putih sakit dicampur dengan karborundum 600 mesh.

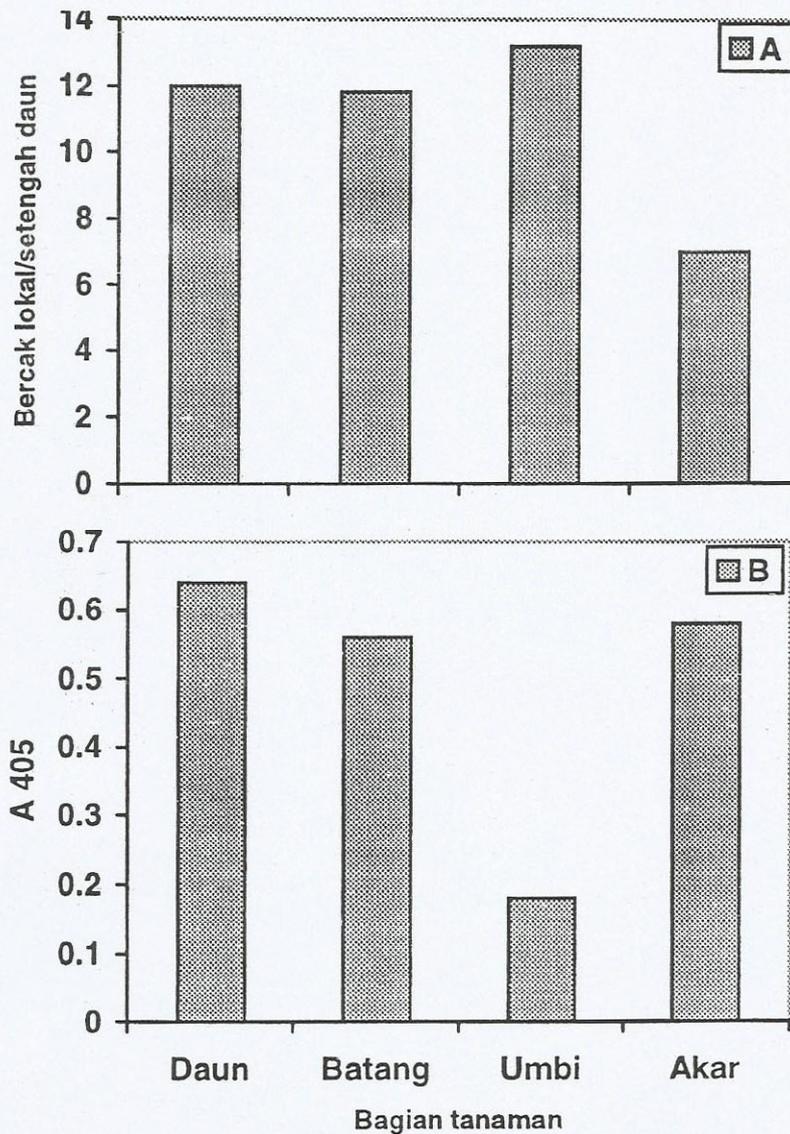
HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbandingan antara ELISA dengan hasil pengujian secara hayati dengan *C. amaranticolor*. Kajian ini sekaligus dilakukan untuk mengetahui distribusi virus dalam daun, batang, umbi, serta akar bawang putih. Masing-masing sampel dibagi menjadi dua kelompok. Kelompok pertama dipakai sebagai sumber inokulum pada pengujian dengan tanaman indikator sedangkan kelompok yang lain dipakai sebagai antigen uji pada *Indirect-ELISA*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa kedua teknik yang dibandingkan dapat mendeteksi keberadaan virus dalam akar, batang, umbi, dan daun. Meskipun virus dapat terdeteksi pada seluruh jaringan tanaman, tetapi untuk kepentingan penelitian di lapangan – khususnya untuk diagnosis dan kajian epidemi – penyiapan

antigen dari daun paling mudah dilakukan. Pada Gambar 1 terlihat adanya fenomena yang menarik, yaitu rendahnya nilai absorban ELISA yang diperoleh dengan antigen uji berupa umbi padahal sampel yang sama yang diuji dengan *C. amaranticolor* menghasilkan jumlah bercak lokal yang paling banyak. Fenomena ini mungkin disebabkan adanya substansi penghambat reaksi serologi dalam umbi bawang putih. Terdapatnya zat penghambat dalam umbi juga merupakan penyebab sulitnya pemurnian virus dari umbi bawang putih, meskipun pada uji dengan tanaman indikator organ ini menunjukkan kandungan virus yang tinggi. Dilihat dari sisi pengembangan ELISA terdapatnya zat penghambat dalam umbi dapat diatasi dengan cara pemilihan bufer pengekstraksi yang tepat (Clark & Bar-Joseph, 1984).

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa ELISA yang dikembangkan dengan antibodi monoklonal dapat diterapkan untuk mendeteksi keberadaan virus dalam hampir seluruh bagian tanaman bawang putih. Pada penelitian berikutnya titer virus diuji hanya berdasarkan uji *Indirect-ELISA*, hal ini dilakukan karena dibandingkan dengan penggunaan *C. amaranticolor*, I-ELISA mempunyai banyak keuntungan khususnya dapat dilakukan dengan cepat dan mudah dilakukan dengan jumlah sampel yang banyak. Pada penelitian sebelumnya Windarningsih *et al.* (1997) berhasil mendeteksi virus yang sama dalam ekstrak daun bawang putih yang diencerkan 10^5 – $10^6 \times$.



Gambar 1. Titer virus dalam daun, batang, umbi, dan akar bawang putih varietas Lumbu Putih diukur dengan *Chenopodium amaranticolor* yang dinyatakan dalam jumlah bercak lokal/setengah daun (A) dan dengan *Indirect-ELISA* yang dinyatakan dalam nilai absorban ELISA (B).

Pengaruh posisi daun terhadap titer virus. Penelitian dilakukan dengan bawang putih varietas Lumbu Putih yang ditanam dalam pot plastik pada umur 40 hari. Posisi daun pertama adalah daun yang paling atas dan daun di bawahnya merupakan daun kedua, ketiga, keempat, dan kelima. Antigen uji disiapkan dengan ekstrak daun yang

diencerkan $20 \times$ dengan menggunakan 0,2 M PBS pH 7,0.

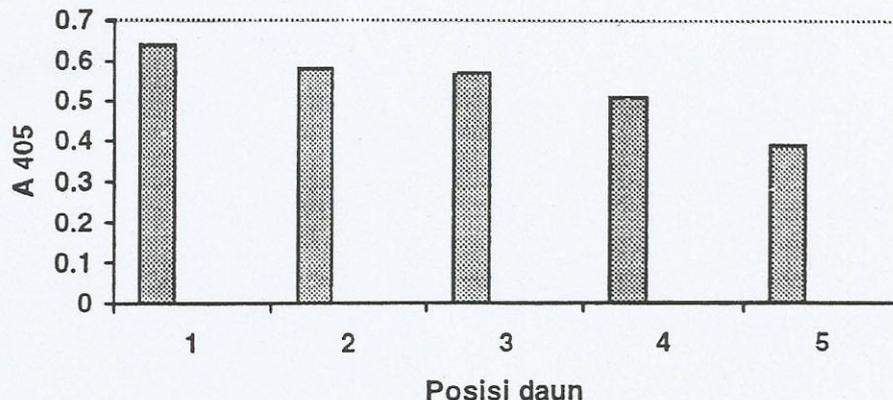
Gambar 2 menunjukkan bahwa titer virus tertinggi diperoleh pada antigen uji dari daun yang termuda (daun pertama). Hal ini dimungkinkan karena pada daun pertama tingkat aktivitas fisiologinya masih sangat aktif sehingga replikasi virus

daun tersebut berlangsung secara baik. Fenomena yang sama juga dilaporkan oleh Jensen *et al.* (1985) yang membuktikan bahwa titer tertinggi *Maize Dwarf Mosaic Virus* pada tanaman sorgum diperoleh pada daun yang sedang membuka.

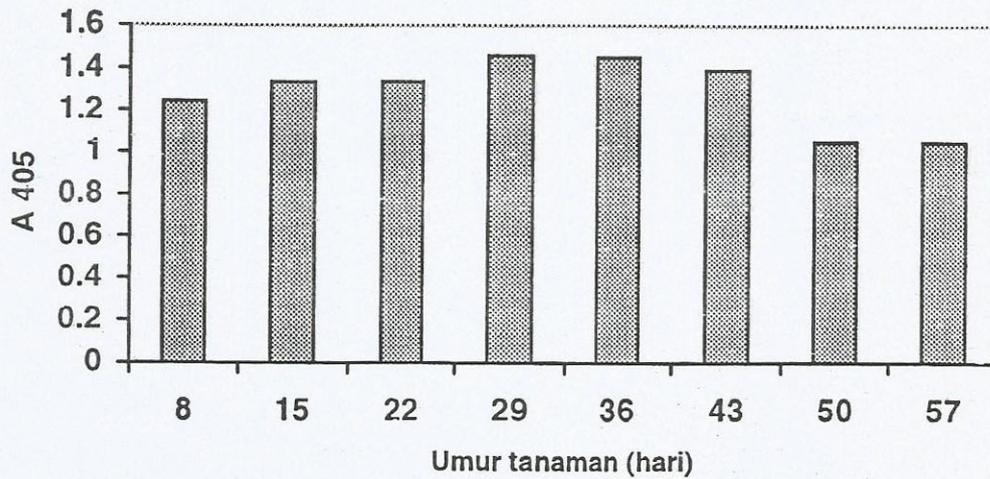
Pengaruh umur tanaman. Untuk mendapatkan informasi tentang umur bawang putih terbaik untuk keperluan ELISA, disiapkan antigen uji dari daun bawang putih yang berumur antara 8–57 hari dengan interval 7 hari. Setiap pengambilan sampel daun disimpan pada suhu -20°C dan setelah seluruh sampel terkumpul dilakukan pengujian secara serentak. Hasil pengujian menunjukkan bahwa titer tertinggi diperoleh pada umur antara 29–36 hari setelah tanam. Tampaknya setiap kombinasi virus dan inang mempunyai umur tertentu yang paling cocok untuk replikasi virus. Hal ini dibuktikan juga oleh Huang & Hseu (1985)

yang membuktikan bahwa titer tertinggi *Zucchini Yellow Mosaic Virus* dalam tanaman waluh adalah 8–10 hari setelah inokulasi, sedangkan Jensen *et al.* (1985) membuktikan bahwa titer tertinggi *Maize Dwarf Mosaic Virus* pada tanaman sorgum dicapai kurang lebih 28 hari setelah inokulasi.

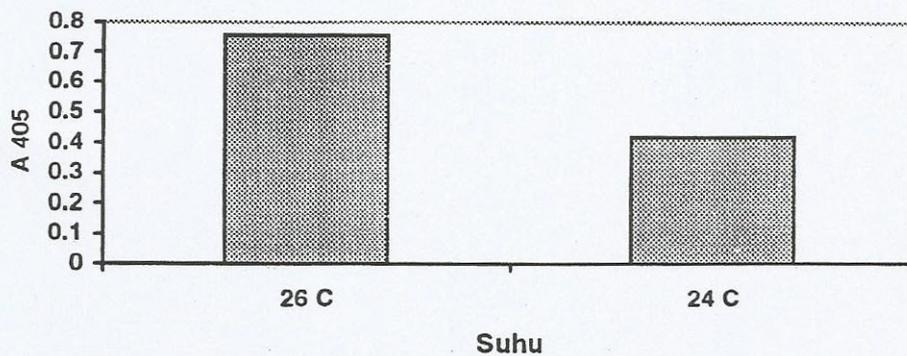
Pengaruh suhu. Untuk mengetahui pengaruh suhu terhadap konsentrasi virus, bawang putih varietas Lumbu Putih ditanam pada suhu ruangan (26°C) dan pada suhu 24°C , kemudian pada umur 14 hari setelah tanam daun bawang putih diambil dan titer virus diuji dengan I-ELISA. Gambar 3 memperlihatkan bahwa titer virus pada tanaman yang ditumbuhkan pada suhu 24°C lebih rendah daripada tanaman yang sama yang ditumbuhkan pada suhu 26°C .



Gambar 2. Pengaruh posisi daun bawang putih yang dipakai untuk menyiapkan antigen uji terhadap nilai absorbansi ELISA pada uji I-ELISA



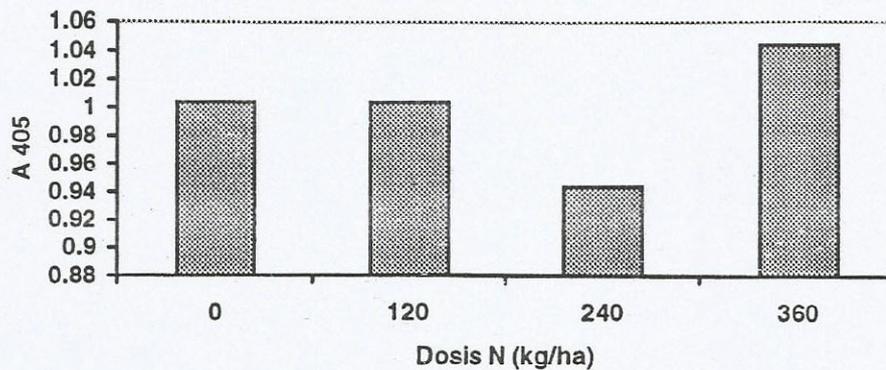
Gambar 3. Nilai absorban ELISA (A 405) yang diperoleh apabila antigen uji berupa ekstrak daun bawang putih pada umur yang berbeda. (Nilai absorban sudah dikurangi dengan absorban bufer karbonat sebesar 0,29).



Gambar 4. Pengaruh suhu terhadap konsentrasi virus bawang putih varietas Lumbu Putih berdasarkan uji ELISA (nilai absorban sudah dikurangi dengan absorban bufer karbonat sebesar 0,3).

Pengaruh pemupukan. Bawang putih ditanam dalam pot plastik diisi dengan tanah seberat 1 kg. Tanaman dipupuk Nitrogen dengan dosis ekuivalen 120 kg N/ha, 240 kg/ha dan 360 kg/ha. Dua minggu setelah tanam daun diambil dan ditentukan titer virusnya. Gambar 4 menunjukkan bahwa pemberian Nitrogen pada dosis 360 kg/ha cenderung meningkatkan titer virus dalam jaringan

tanaman. Secara umum telah diketahui bahwa tingginya nutrisi pada jaringan tanaman akan meningkatkan kerentanan tanaman terhadap infeksi virus. Peningkatan kerentanan virus telah dilaporkan terjadi pada *Tobacco Mosaic Virus* maupun *Tobacco Necrosis Virus* (Walkey & Antill, 1989; Goodman *et al.*, 1986).



Gambar 5. Pengaruh pemupukan N terhadap konsentrasi virus bawang putih varietas Lumbu Putih berdasarkan uji ELISA (nilai absorbansi sudah dikurangi dengan absorbansi bufer karbonat sebesar 0,3)

Tabel 1. Infeksi virus pada lima varietas bawang putih pada umur 15 hari berdasarkan kenampakan gejala dan hasil uji ELISA

Varietas	Jumlah Sampel		Terdeteksi berdasarkan ELISA
	Diuji	Gejala	
Lumbu Putih	10	10	10 (0,79) *
Lumbu Hijau	10	6	10 (0,93)
Tawangmangu Baru.	10	9	10 (1,00)
Lokal Temanggung	10	10	10 (0,87)
Lokal Magelang	10	10	10 (1,16)

Keterangan *) Nilai rata-rata A 405 yang sudah dikurangi dengan absorbansi bufer karbonat sebesar 0,23.

Deteksi virus dalam lima varietas bawang putih. Untuk mengetahui agihan virus pada lima varietas bawang putih dilakukan uji ELISA masing-masing dengan 10 sampel. Bawang putih ditanam, kemudian diamati timbulnya gejala dan daunnya dipakai untuk penyediaan antigen uji pada I-ELISA. Tabel 1 menggambarkan bahwa tingkat infeksi virus pada kelima varietas yang diuji cukup tinggi. Tingginya tingkat infeksi virus ini mendukung pendapat Van Dijk & Sutarya (1992) yang melaporkan tingkat infeksi virus di Indonesia dapat mencapai 85%.

Keseluruhan dari informasi yang

diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa titer virus bawang putih dapat ditentukan dengan metode ELISA dan memanfaatkan antibodi monoklonal. Untuk memperoleh nilai absorbansi ELISA yang tinggi sebaiknya dipilih daun pada tanaman yang berumur 29–36 hari. Titer virus cenderung meningkat apabila tanaman dipupuk dengan nitrogen dan ditanam pada suhu yang relatif tinggi. Hasil ini diharapkan mampu mendukung upaya pengendalian penyakit virus pada bawang putih dengan meningkatkan kualitas monitoringnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark, M.F. & Bar-Joseph. 1984. Enzyme Immunosorbent Assay in Plant Virology, p. 51- 85. In Maramorosch, K. and H. Kaprowski, *Methods in Virology*. Acad. Press, Orlando.
- Dijk, P. van & R. Sutarya. 1992. Virus Survey of Garlic, Shallot and Welsh Onion in Java, Indonesia. *Int. Comm. of the DLO Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO)*, Wageningen, the Netherlands. 34 p.
- Huang, C.H. & S.H. Hseu. 1985. Zucchini Yellow Mosaic Virus Isolate from Cucumber, *Cucumis sativus*: Purification and Serology. In Virus Diseases of Horticultural Crops in the Tropics and Subtropics, *FFTC Book Series No. 33*. FFTC for the Asian and Pasific Region, Taipei, Taiwan, ROC.
- Jensen, S.G., M.K. Palomar, E.M. Ball & R. Samson. 1985. Factors Influencing Virus Titer in Maize Dwarf Mosaic Virus-Infected Sorghum. *Phytopathology* 75: 1132-1136.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62.
- Ogawa, T., N. Matsubara & N. Mori. 1976. Cultivation of Virus-free Garlic. *J. Vegetable and Horticulture* 51: 551-554.
- Walkey, D.G.A. & D.N. Antill. 1989. Agronomic Evaluation of Virus-free and Virus-infected Garlic (*Allium sativum* L.). *Agric. Sci.* 64: 53-60.
- Windarningsih, M., S. Somowiyarjo & Mulyadi. 1997. Deteksi Virus Bawang Putih dengan Antibodi Monoklonal, P. 391-395. *Prosiding Kongres Nasional XIV dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*, Palembang, 27-29 Oktober 1997.