

PEMANFAATAN ANTIBODI MONOKLONAL DALAM I-ELISA UNTUK  
DETEKSI PENYEBAB PENYAKIT BUSUK PUCUK KELAPA (*PHYTOPHTHORA  
PALMIVORA*)

*THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN INDIRECT-ENZYME LINKED  
IMMUNOSORBENT ASSAY FOR DETECTING THE PATHOGEN OF  
COCONUT BUD ROT (PHYTOPHTHORA PALMIVORA)*

Susanto Somowiyarjo<sup>1)</sup>, Daisy Prapto Sriyanti<sup>2)</sup>, Mulyadi<sup>1)</sup>, Suryanti<sup>1)</sup>,  
Y.M.S. Maryudani<sup>1)</sup>, dan Bambang Hadisutrisno<sup>1)</sup>

1) *Fakultas Pertanian UGM*

2) *Fakultas Pertanian UPN Veteran Yogyakarta*

**ABSTRACT**

*Mice monoclonal antibodies (MCAs) against Phytophthora palmivora, Butl. (the pathogen of coconut bud rot) have been produced and tested. The selected hybridoma (Ab-PM.3) secreted monoclonal antibodies of IgM subclass and the titer in vitro of  $10^6$ - $10^7$ , was employed to develop Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay. This assay was able to differentiate coconut isolate of *P. palmivora* not only from cocoa and pepper isolate of the same species, but also from other fungus isolated from coconut bud rot diseased coconut (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., and *Thielaviopsis* sp.). This assay was able to differentiate *P. palmivora* isolate from diseased coconut with those isolated from cocoa and pepper, and other fungus isolated from diseased coconut, thereby providing specific diagnostic tool for coconut bud rot which is needed for supporting the application of the concept of integrated pest mangement on coconut.*

*Key words: Monoclonal Antibodies, Phytophthora palmivora, I-ELISA*

**INTISARI**

Untuk mendapatkan antibodi monoklonal yang spesifik terhadap patogen penyakit busuk pucuk kelapa telah dikonstruksi hibridoma melalui fusi antara sel limfa mencit *Balb/c* yang telah diimunisasi ekstrak miselium *P. palmivora* dengan sel myeloma NS2. Dari 39 sumuran yang mengandung hibridoma didapatkan 14 sumuran yang positif terhadap antigen homolog. Setelah dilakukan kloning terdapat 10 hibridoma yang empat diantaranya dikarakterisasi dan diuji dalam I-ELISA. Monoklonal antibodi dengan kode AbM-PM.3 selanjutnya dipilih untuk mengembangkan ELISA dalam rangka deteksi patogen dalam jaringan tanaman sakit. Hasil penelitian menunjukkan bahwa AbM-PM.3 yang mempunyai subkelas IgM dan titer in vitro  $10^6$ - $10^7$ , sangat cocok dipakai sebagai reaktan untuk diagnosis patogen. ELISA yang dikembangkan mempunyai kepekaan yang cukup tinggi yaitu mampu mendeteksi antigen sampai konsentrasi terendah kurang lebih 1 ng/ml serta dapat membedakan *P. palmivora* isolat kelapa dengan *P. palmivora* isolat lada, isolat kakao, serta tiga jenis jamur (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., dan *Thielaviopsis* sp.) yang diperoleh dari jaringan kelapa sakit pada saat mengisolasi *P. palmivora*. Agar antibodi monoklonal yang diperoleh segera dapat dimanfaatkan untuk mendukung pelaksanaan pengendalian hama terpadu pada kelapa, penelitian lanjutan yang meliputi uji ELISA dengan berbagai bentuk lain inokulum, antigen uji pada berbagai substrat serta penyederhanaan dan pemendekan waktu ELISA, masih sangat diperlukan.

Kata kunci: Antibodi monoklonal, *Phytophthora palmivora*, I-ELISA

## PENGANTAR

Luas perkebunan kelapa (*Cocos nucifera*, L.) di Indonesia mencapai lebih dari 3 juta hektar yang sebagian besar diusahakan oleh petani, sehingga komoditas ini mempunyai arti ekonomi dan sosial yang sangat penting (Girsang, 1990).

Produktivitas kelapa di Indonesia masih tergolong rendah, rata-rata hanya mencapai 1.049 kg ekuivalen kopra/ha/tahun. Untuk meningkatkan produktivitas kelapa, dilaksanakan program peremajaan maupun perluasan areal yang sebagian besar menggunakan hibrida PB 121. Salah satu akibat dari pengembangan jenis hibrida PB 121 adalah meningkatnya serangan *Phytophthora palmivora* (Butl.), penyebab penyakit busuk pucuk kelapa.

Luas serangan penyakit ini mencapai 3.622,9 ha terutama terdapat di daerah Lampung, Sulawesi Selatan, Sulawesi Utara, Aceh dan Jawa Barat, dengan kerugian sebesar Rp 2.956.768.250,00 setiap tahunnya (Anonim, 1992). Belum tersedianya perangkat deteksi dini dan pembeda strain patogen busuk tunas merupakan kendala penting dalam penerapan konsep pengendalian hama terpadu untuk penyakit ini. Oleh karena itu perlu dikembangkan teknik deteksi dini antara lain dengan memanfaatkan keunggulan teknologi hibridoma yang ditemukan oleh Kohler dan Milstein (1975), dan telah diterapkan untuk deteksi patogen tumbuhan sejak tahun delapan puluhan (Dietzgen & Sander, 1982).

Saat ini penggunaan metode serologi, khususnya dengan antibodi monoklonal, untuk deteksi penyakit karena jamur masih sangat terbatas dan memerlukan evaluasi lebih lanjut. Hal ini antara lain karena sistem antigen pada jamur belum banyak diteliti dan kemungkinan besar jauh lebih kompleks dari pada sistem antigen pada virus. Hasil yang memuaskan telah dicapai pada usaha pengembangan metode *Dipstick Immuno Assay* untuk deteksi *P. cinnamomi* dari tanah, yang terbukti

merupakan cara yang cepat dan tepat dibandingkan dengan cara-cara konvensional (Cahill dan Hardham, 1984).

Penelitian ini bertujuan mengembangkan antibodi monoklonal terhadap *P. palmivora* dan memanfaatkan antibodi yang dikembangkan untuk deteksi patogen dalam jaringan tanaman. Diharapkan hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan untuk mendukung pelaksanaan pengelolaan penyakit busuk tunas kelapa dengan cara yang akrab lingkungan.

## BAHAN DAN METODE

**Isolasi patogen dan penyiapan antigen.** *P. palmivora* diisolasi dari kelapa yang sakit di kebun Segayung Utara, PT. Pagilaran. Isolat jamur dikembangkan dalam medium *potato dextrose* cair selama satu minggu, kemudian miselium dipisahkan dari medium cair dan dikeringanginkan untuk penyiapan antigen. Penyiapan antigen dilakukan dengan ekstraksi miselium yang didialisis berdasarkan metode Cahill & Hardham (1984). Sediaan antigen selanjutnya disimpan dalam suhu  $-20^{\circ}\text{C}$  sampai digunakan sebagai imunogen pada imunisasi maupun sebagai antigen uji pada skrining hibridoma serta pengembangan uji ELISA.

**Imunisasi mencit, fusi sel, dan kultur hibridoma.** Untuk menyiapkan sel *B-Lymphocyte* yang akan difusi dengan sel myeloma yang tidak memproduksi enzim *hypoxanthine phosphoribosyl transferase* (HPRT) (Sikora & Smedley, 1984), dua ekor mencit *Balb/c* diimunisasi kurang lebih selama tiga bulan dimulai sejak umur enam minggu. Selama periode imunisasi masing-masing mencit menerima tiga kali suntikan intraperitoneal dengan interval empat minggu dan dosis imunogen pada penyuntikan pertama, kedua, dan ketiga masing-masing sejumlah 20  $\mu\text{g}$ , 40  $\mu\text{g}$ , dan 60  $\mu\text{g}$  protein dari ekstraksi miselium.

Sebelum dipakai untuk imunisasi ekstrak miselium dicampur dengan *Freund's Complete Adjuvant* dengan perbandingan 1:1 (V/V) untuk imunisasi pertama dan dengan *Freund's Incomplete Adjuvant* untuk imunisasi kedua dan ketiga. Tiga hari sebelum fusi mencit diinjeksi (*booster*) secara intravena dengan 100 µg imunogen.

Untuk keperluan fusi mencit dibunuh kemudian limfanya diambil secara aseptis. Sel *B-Lymphocyte* dari limfa kemudian difusi dengan sel myeloma NS2 dengan prosedur yang dideskripsi oleh Kohler & Milstein (1975). Kurang lebih 10 hari setelah fusi supernatan dari media tempat penumbuhan hibridoma diambil dan diuji keberadaan antibodinya dengan metode *Indirect-ELISA* (Koenig, 1981) pada kondisi pengujian yang dilaporkan oleh Somowiyarjo *et al.* (1985). Pengujian ini menggunakan *microtiter plate (Maxisorp NUNC)* yang dilapis dengan 1 µg/ml antigen uji. Klon yang menunjukkan reaksi positif kemudian dikloning dengan teknik pengenceran terbatas (*condition of limiting dilution*) dengan menggunakan *feeder cells* dari mencit Balb/c (Schreier *et al.*, 1980). Untuk mencapai monoklonalitas yang diharapkan, kloning dilakukan dua sampai tiga kali dan hibridoma terpilih yang tidak sedang diperbanyak, disimpan dalam nitrogen cair pada medium yang terdiri dari 90% *Fetal Calf Serum* dan 10% *Dimethyl Sulphoxide* (DMSO).

**Produksi dan penentuan subkelas antibodi monoklonal.** Antibodi monoklonal diproduksi secara *in vitro* dengan medium dalam botol kultur/*flask* maupun secara *in vivo* dalam rongga perut mencit Balb/c. Dua minggu sebelum digunakan untuk menumbuhkan hibridoma, ke dalam rongga perut mencit diinjeksikan *pristane* (1,6,14-tetramethyl pentadecane) (Clark & Adam, 1977).

**ELISA.** Pengujian ini dilakukan dengan *Indirect-ELISA* (Koenig, 1981) pada *microtiter plate (Maxisorp NUNC)* dengan tiga kali pencucian diantara setiap langkah pengujian. Larutan pencuci terdiri dari 0,02 M PBS, pH 7,4 mengandung 0,05% *Tween 20*, dan 0,5% *Polyvinyl Pyrrolidone 40.000* (PBS-TPO). Pengujian ELISA dilaksanakan dengan cara menginkubasikan ELISA *plate* berturut-turut dengan: (1) 100 µl antigen uji yang dilarutkan dalam bufer karbonat 0,05 M, pH 9,6 selama 4 jam pada suhu 37 °C; (2) 150 µl larutan pengeblok (0,5% *Bovine Serum albumine* yang diproduksi *in vitro* diencerkan dengan PBS) selama 90 menit pada suhu 37 °C; (3) 100 µl antibodi monoklonal dalam PBS-TPO selama 18 jam pada suhu 6 °C; (4) 100 µl *Conjugate (Alcaline Phosphatase-labelled Affinity-Purified Immunoglobuline from Rabbit, Sigma)*, diencerkan 2000-3000 kali dengan PBS selama 4 jam pada suhu 37 °C. Setelah semua sisa reaktan dicuci bersih, ke dalam sumuran *microtiter plate* diinkubasikan 200 µl substrat (1 mg/ml *p-nitrophenyl phosphate* dalam 10% diethanol amine pH 9,8) selama 90 menit pada suhu 25 °C. Kemudian perubahan warna yang terjadi diukur dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakterisasi hibridoma.** Hasil fusi sel limfa dari dua mencit dengan sel myeloma didistribusikan dan ditumbuhkan dalam 420 lubang (sumuran) pada *microtiter plate* steril. Pada seleksi awal diperoleh 39 sumuran yang mempunyai harapan untuk ditumbuhi hibridoma penghasil antibodi terhadap *P. palmivora*, tetapi pada seleksi berikutnya jumlah sumuran yang mengandung hibridoma harapan tersebut

turun menjadi 14. Setelah mengalami dua kali kloning dihasilkan 10 hibridoma yang empat diantaranya dipilih untuk dikarakterisasi dan selanjutnya dimanfaatkan untuk pengembangan perangkat deteksi *P. palmivora* dengan teknik I-ELISA. Karakterisasi parsial dari hibridoma penghasil antibodi monoklonal terhadap *P. palmivora* disajikan pada tabel 1.

Tabel 1. Karakterisasi hibridoma terpilih penghasil antibodi monoklonal terhadap *Phytophthora palmivora* isolat kelapa

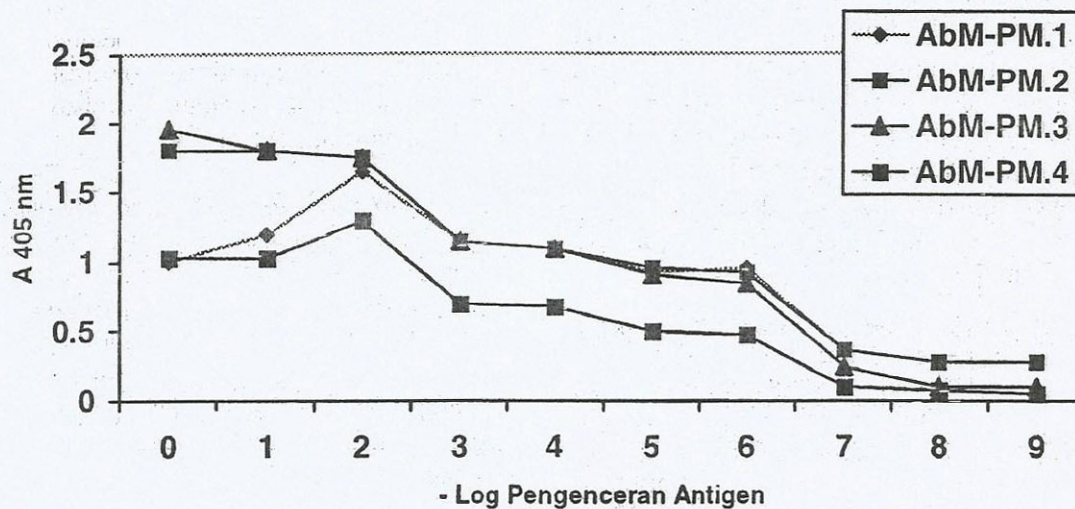
No.	Kode Klon	Titer AbM <i>in vitro</i>	Subkelas Antibodi
1.	1.1.2	$10^3-10^4$	IgM
2.	1.1.3	$10^3-10^4$	IgM
3.	1.1.4	$10^3-10^4$	IgM
4.	4.1.1	$10^2-10^3$	IgM
5.	4.1.2	$10^3-10^4$	IgM
6.	6.1.1	$10^1-10^2$	IgM
7.	6.1.2	$10^1-10^2$	IgM
8.	6.1.3	$10^3-10^4$	IgM
9.	7.1.1	$10^2-10^3$	IgM
10.	7.1.2.	$10^1-10^2$	IgM

Karena pertumbuhannya yang baik, klon 1.1.2, 1.1.4, 4.1.2, dan 6.1.3 dikembangkan lebih lanjut dan masing-masing diberi kode AbM-PM.1, AbM-PM.2, AbM-PM.3, dan AbM-PM.4. Yang menarik dari hasil penelitian ini adalah kenyataan bahwa antibodi monoklonal yang diperoleh menunjukkan subkelas IgM. Fenomena ini kurang lazim dijumpai pada produksi antibodi monoklonal dengan imunisasi intraperitoneal secara *in vivo*. Terjadinya subkelas IgM tersebut diduga karena lambatnya kontak antara epitop pada imunogen dengan reseptor pada sel limfa sehingga belum terdapat cukup waktu untuk terjadi interaksi antara epitop dengan sistem keimunan dalam tubuh mencit.

Timbulnya antibodi dengan subkelas IgM ini umum dijumpai pada pembuatan antibodi dengan imunisasi intrasplenik (Spitz *et al.*, 1984) maupun imunisasi *in vitro* (Luben *et al.*, 1982).

*Uji sensitivitas antibodi monoklonal.* ELISA dikembangkan dengan antibodi monoklonal yang diproduksi secara *in vitro* dalam flask. Setelah seluruh permukaan flask dipenuhi hibridoma, antibodi dipanen dengan cara mengumpulkan supernatan dan langsung digunakan untuk pengujian. Digunakannya secara langsung media tersebut berdasarkan pertimbangan bahwa cara ini lebih sederhana karena tidak memerlukan pemrosesan lebih lanjut. Penggunaan antibodi dalam media tersebut juga pernah dilakukan oleh Thomas *et al.* (1986) yang bekerja dengan *African Cassava Mosaic Virus*.

Pada penelitian pendahuluan diketahui bahwa pengenceran optimal antibodi monoklonal adalah 100 kali. Untuk mengetahui kepekaan ELISA yang dikembangkan dengan antibodi monoklonal dari empat klon hibridoma, dilakukan uji ELISA dengan antigen yang diencerkan. Gambar 1 menunjukkan bahwa keempat antibodi tersebut dapat dipakai untuk mengembangkan I-ELISA dengan sensitivitas yang cukup tinggi. Pada pengenceran antigen  $10^{-3}$  (setara dengan konsentrasi protein 1 ng/ml) nilai A 405 masih diatas 0,5 dengan nilai kontrol (bufer) kurang lebih 0,2. Berhubung AbM-PM.3 cenderung memberikan nilai absorban ELISA yang tinggi dengan antigen uji dan A 405 yang rendah pada kontrol (bufer), maka AbM-PM.3 dikembangkan lebih lanjut untuk pengujian.

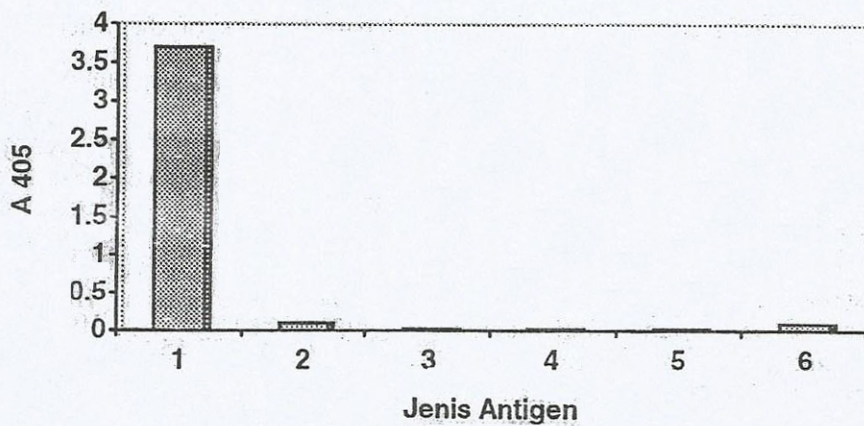


Gambar 1. Pengaruh konsentrasi antigen uji (ekstraks miselium *P. palmivora*) terhadap nilai absorbansi ELISA yang diperoleh pada *Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* dengan antibodi monoklonal terhadap *P. palmivora* dari empat klon hibridoma yang diencerkan 100 x. Konsentrasi awal antigen adalah 0,135 ug/ml.

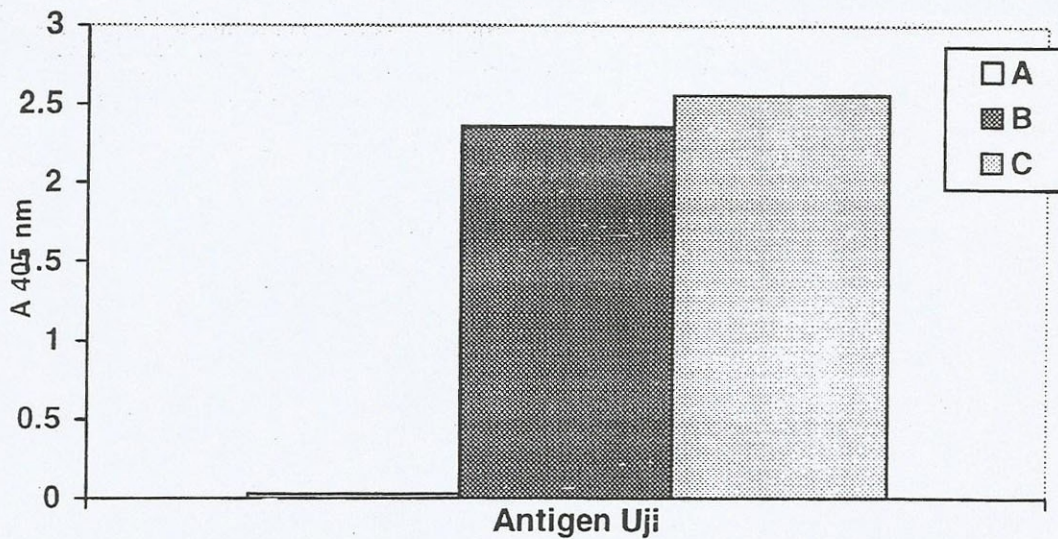
**Uji silang dengan antigen lain.** Pada jaringan yang busuk akibat *P. palmivora* sering juga ditumbuhi oleh berbagai jenis jamur. Untuk mengetahui kemampuan ELISA yang dikembangkan pada penelitian ini dalam membedakan jamur patogen dengan jamur yang lain, antibodi monoklonal direaksikan dengan antigen homolog, *P. palmivora* isolat kakao dan lada, *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp, dan *Thielaviopsis* sp. *P. palmivora* isolat kakao diperoleh dari Balai Penelitian Kopi dan Kakao, Jember sedangkan isolat lada merupakan jamur koleksi Lab. Mikologi Fakultas Pertanian UGM. Tiga jamur terakhir diperoleh dari jaringan kelapa sakit pada saat isolasi *P. palmivora*. Gambar 2 menunjukkan bahwa antibodi monoklonal yang dikembangkan tidak hanya mampu membedakan jamur *Phytophthora palmivora* isolat kelapa dengan genus lain, tetapi juga mampu membedakan antara *P. palmivora* isolat kelapa dengan isolat kakao dan lada. Data ini memberikan

petunjuk bahwa antibodi monoklonal yang dikembangkan spesifik terhadap epitop yang hanya dimiliki oleh isolat kelapa. Oleh karena itu antibodi ini mempunyai harapan besar untuk dikembangkan menjadi reaktan untuk deteksi patogen busuk pucuk kelapa yang spesifik.

**Deteksi *P. palmivora* pada jaringan tanaman.** Untuk mengetahui reaktivitas AbM-PM.3 dalam ELISA dengan antigen uji berupa ekstrak tanaman kelapa, dilakukan ELISA dengan antigen uji jaringan kelapa sehat, jaringan kelapa terserang *P. palmivora* dengan gejala awal, dan gejala lanjut. Jaringan kelapa diuji pada pengenceran 100 x dengan menggunakan bufer Karbonat pH. 9,6. Seperti dapat diamati pada gambar 3, antibodi monoklonal mampu secara nyata membedakan antara jaringan sakit dan sehat meskipun kurang dapat membedakan antara jaringan yang bergejala awal dan lanjut.



Gambar 2. Reaktivitas antibodi monoklonal terhadap *Phytophthora palmivora* isolat kelapa (AbM-PM.3) dengan antigen homolog (1), *P. palmivora* isolat kakao (2), *P. palmivora* isolat lada (3), *Fusarium* sp. (4), *Colletotrichum* sp. (5), dan *Thielaviopsis* sp. (6) dalam *Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay*. AbM-PM.3 diuji pada pengenceran 100 ×, sedangkan antigen uji berupa ekstraks miselium yang diencerkan 100 ×.



Gambar 3. Nilai absorbansi ELISA (A 405 nm) yang diperoleh pada *Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay* dengan menggunakan antibodi monoklonal (AbM-PM.3) dan antigen uji berupa ekstrak tanaman kelapa sehat (A), bergejala awal (B), dan bergejala lanjut (C).

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa antibodi monoklonal (AbM-PM.3) dapat memenuhi persyaratan untuk dipakai sebagai reaktan dalam diagnosis penyakit. Agar hasil penelitian ini dapat dimanfaatkan oleh masyarakat secara luas maka penelitian lanjutan, khususnya pengujian ELISA dengan memanfaatkan antigen uji berupa berbagai bentuk inokulum (klamidospora dan zoospora) maupun kemampuan ELISA yang diuji untuk mendeteksi antigen dalam berbagai substrat (tanah dan air) masih sangat diperlukan.

Setelah dilakukan penyempurnaan maupun penyederhanaan teknik pengujian diharapkan hasil penelitian ini dapat dipakai sebagai salah satu alat untuk mengembangkan pengelolaan kesehatan kelapa dengan cara yang akrab lingkungan.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dewan Riset Nasional yang telah membiayai penelitian ini melalui Proyek RUT-III yang semula diketuai oleh almarhum Dr.Ir. Hakam S. Modjo, M.Sc. kemudian digantikan oleh Prof.Dr.Ir. Bambang Hadisutrisno, DAA., dengan nomor kontrak 94/SP/RUT/BPTP/96, tanggal 17 April 1996. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ir. Sri Sukanto, MS dari Balai Penelitian Kopi dan Kakao atas pemberian *P. palmivora* isolat kakao.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonim, 1992. *Survai Penyakit Busuk Pucuk (Phytophthora sp.) pada Beberapa Varietas Kelapa di Indonesia*. Direktorat Jenderal Perkebunan Departemen Pertanian. 35 p.
- Burrell, R.G., Clayton, C.W., Gallegly, M.E. and Lilly, V.G. 1966. Factors Affecting the Antigenicity of the Mycelium of Three Species of *Phytophthora*. *Phytopathology* 56: 422-426.
- Cahill, D.M. & Hardham, A.R. 1984. Exploitation of zoospore Taxis in the Development of a Novel Dipstick Immunoassay for the Specific Detection of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 74: 193-200.
- Clark, M.F. & A.N. Adam. 1977. Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475-483.
- Dietzgen, R.G. & E. Sander. 1982. Monoclonal Antibodies Against Plant Virus. *Arch. Virol.* 74: 197-204.
- Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., butcher, G.W. & Howard, J.C. 1977. Antibodies to Major Histocompatibility antigens Produced by Hibrid cell Lines. *Nature* 266: 550-552.
- Girsang, P. 1990. Situasi Perkelapaan di Indonesia. *Manggar* 3 (3): 40-46.
- Koenig, R., 1981. Indirect-ELISA Methods for the Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 67: 53-62.
- Kohler, G. & Milstein, C. 1975. Continuous Culture of Fused Cells Screening Antibodies of Pre-defined Specificity. *Nature* 256: 495-497.
- Luben, R.A., P. Brazeau, P. Bohlen, & R. Guillemin. 1982. Monoclonal antibodies to Hypothalamic growth Hormone-Releasing Factor with Picomoles of Antigen. *Science* 218: 887-889.
- Modjo, H.S., Hadisutrisno, B., & Sri Sumarni, V. 1989. Kajian Tipe Pasangan (*Mating Type*) Empat Isolat *Phytophthora palmivora*. *Kongres Nasional PFI X dan Seminar Ilmiah*, Denpasar, Bali, 5 p.
- Schreier, M., G. Kohler, H. Hengartner, C. Berek, M. Trucco, & L. Forni. 1980. *Hybridoma Techniques*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 65 p.
- Sikora, K. & H.M. Smedley. 1984. *Monoclonal Antibodies*. Blackwell Scientific Publications, London, 132 p.
- Somowiyarjo, S., N. Sako, & F. Nonaka. 1985. Application of Precoated Indirect-Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Detecting Zucchini Yellow Mosaic Virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 569-575.
- Spitz, M., L. Spitz, R. Thorpe & E. Eugui. 1984. Intrasplenic Primary Immunization for the Production Monoclonal Antibodies. *J. Immunol. Methods* 70: 39-43.
- Thomas, J.E., P.R. Massalski & B.D. Harisson. 1986. Production of Monoclonal Antibodies to African Cassava Mosaic Virus and Differences in their Reactivities with Other White Fly-Transmitted Gemini Viruses. *J. gen. Virol.* 67: 2739-2748.