

PEMEMDEKAN WAKTU ELISA DALAM DETEKSI TMV^{a)}

(SHORTENING OF ELISA INCUBATION TIME IN THE DETECTION OF TMV)

Susanto Somowiyarjo, YB. Sumardiyono dan Purwati Widiyati
Laboratorium Virologi Tumbuhan Fakultas Pertanian
Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

In order to support the program for the management of viral diseases on garlic, a rapid diagnosis procedure was developed by shortening the incubation period of the indirect ELISA. No significant differences of ELISA absorbance were observed when the antigen was incubated for 4 h, 2 h, and 30 min at 37° C. The incubation period for the antibody and conjugate could be reduced from 4 h at 37° C or 18 h at 4° C to 30 min at 37° C. The shortest period of incubation for the assay could be obtained when each incubation time for the antigen, antibody and conjugate was 30 min. The detection limit for the shortened ELISA was 10⁴ for the virus in crude extracts and 0,5 µg/ml for the purified preparation.

Key word: TMV, detection, ELISA

INTISARI

Lama inkubasi untuk ELISA yang biasanya 24 jam dapat dipersingkat dengan waktu terpendek menjadi 1,5 jam tanpa mengurangi kemanfaatannya untuk deteksi TMV. Pada waktu inkubasi terpendek antigen, antibodi dan konjugat diinkubasikan masing-masing selama 30 menit pada suhu 37° C. Dengan menggunakan waktu inkubasi tersebut TMV dalam ekstrak dapat dideteksi sampai pada pengenceran 10⁴ sedangkan virus murni dapat dideteksi sampai pada konsentrasi 0,5 µg/ml. Kemungkinan pemanfaatan teknik ELISA yang diperpendek untuk deteksi virus yang lain didiskusikan pada makalah ini.

Kata kunci : TMV, deteksi, ELISA

PENGANTAR

Penyakit-penyakit viral yang salah satu patogennya adalah *Tobacco Mosaic Virus* (TMV) merupakan kendala dalam mencapai swasembada bawang putih (*Allium sativum* L.). Keadaan ini dapat terjadi karena penanam belum banyak yang mengenal tanda-tanda dan gejala yang timbul akibat infeksi virus, sehingga penanaman bawang putih dari waktu ke waktu dilakukan tanpa memperhatikan adanya infeksi virus.

Untuk mengatasi kendala tersebut di atas, dibutuhkan suatu metode deteksi virus yang mempunyai kepekaan tinggi misalnya *Indirect enzyme-linked immunosorbent assay* (I-ELISA). ELISA telah banyak digunakan untuk diagnosis

penyakit-penyakit virus tumbuhan dalam skala besar, khususnya pada tanaman tahunan, tanaman yang diperbanyak secara vegetatif, dan tanaman buah-buahan¹⁾ dengan waktu inkubasi kurang lebih 24 jam.

Penelitian ini bertujuan untuk mempersingkat waktu I-ELISA dengan mempersingkat waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat dalam rangka deteksi TMV.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Isolat virus.-- Pada penelitian ini digunakan isolat TMV yang pernah dilaporkan sebelumnya²⁾.

a) Sebagian penelitian yang dibiayai dengan Proyek Riset Unggulan Terpadu (RUT) I/3 dengan nomor kontrak 1032/SP-KD/PPIT/IV/95

Perbanyakan virus.-- Ekstrak daun *Chenopodium amaranticolor* Coste & Reyn terinfeksi virus dibuat 1:10 (b/v) dengan 0,02 M bufer fosfat pH 7,0. Inokulasi cairan ekstrak yang mengandung virus (sap) dilakukan dengan mengoleskan campuran sap dan karborundum (600 mesh) pada permukaan daun *C. amaranticolor*.

Penyiapan sampel uji.-- Satu gram daun *C. amaranticolor* dengan bercak lokal dan sampel dari lapangan ditumbuk dalam mortar porselin dengan 9 ml bufer sodium karbonat pH 9,6. Ekstrak kemudian disaring dan dibuat seri pengenceran 10^{-1} - 10^{-6} dengan bufer sodium karbonat.

Uji ELISA.-- Pengujian menggunakan metode *non-precoated Indirect ELISA*^{a)} Pengujian dilakukan pada *polystyrene microtiter plate (NUNC) maxisorp*. Plate diinkubasikan berturut-turut dengan : (1) 100 μ l antigen dalam bufer sodium karbonat pH 9,6, (2) 100 μ l antibodi

spesifik terhadap virus, 4 μ g/ml, dalam 0,02 M *phosphate buffered saline* pH 7,4 yang mengandung 0,05% Tween 20 (PBS-T), (3) 100 μ l *goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate* (Sigma) 1:6000 dalam PBS-T, dan (4) 150 μ l substrat (1 mg/ml *p-nitrophenyl phosphate* dalam 10% *diethanolamine buffer* pH 9,8) selama 1,5 jam pada suhu kamar. Pencucian plate pada akhir inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat dilakukan dengan menginkubasikan plate dengan PBS-T selama 3 menit dan dilakukan 3 kali. Nilai absorbansi diukur dengan menggunakan *ELISA reader* (SLT Labinstrument 340 ATC) pada panjang gelombang 405 nm.

HASIL

Pemendekan waktu ELISA.-- I-ELISA dengan waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat yang diperpendek telah berhasil digunakan untuk deteksi TMV (Tabel 1).

Tabel 1. Nilai absorbansi (A_{405}) ELISA apabila virus murni diuji tiga belas kombinasi waktu inkubasi^{a)}

Antigen	Waktu inkubasi		A 405 pada konsentrasi virus murni (μ g/ml)					
	Antibodi	Konjugat	10	5	1	0,5	0,10	0,05
4 jam	18 jam	4 jam ^{b)}	0,77	0,85	0,73	0,56	0,11	0,06
4 jam	18 jam	2 jam	0,78	0,76	0,68	0,70	0,14	0,14
4 jam	18 jam	1 jam	0,64	0,67	0,65	0,72	0,23	0,12
4 jam	18 jam	30 menit	0,70	0,60	0,57	0,51	0,22	0,14
2 jam	18 jam	4 jam	1,30	1,15	1,10	1,01	0,46	0,13
1 jam	18 jam	4 jam	1,39	1,30	1,21	0,99	0,32	0,33
30 menit	18 jam	4 jam	1,11	0,91	0,81	0,75	0,13	0,01
4 jam	4 jam	16 jam	1,34	1,19	1,23	1,17	0,20	0,07
4 jam	2 jam	16 jam	1,48	1,53	1,33	1,35	0,29	0,16
4 jam	30 menit	16 jam	1,58	1,45	1,15	0,74	0,16	0,14
30 menit	30 menit	30 menit	0,61	0,51	0,41	0,31	0,06	0,05
1 jam	2 jam	1 jam	0,76	0,70	0,63	0,36	0,02	0,00
1 jam	30 menit	2 jam	1,01	0,92	0,72	0,47	0,13	0,07

^{a)} Masing-masing nilai absorbansi merupakan rata-rata dari tiga ulangan dengan tiga sumuran tiap perlakuan.

^{b)} Prosedur standar

Dari hasil tersebut terlihat bahwa pemendekan waktu inkubasi antigen, antibodi, maupun konjugat tidak mengurangi sensitivitas I-ELISA. Bahkan pada beberapa kombinasi waktu inkubasi, nilai absorbansi yang diperoleh lebih tinggi dibanding nilai absorbansi pada prosedur standar. Nilai absorbansi yang diperoleh dengan

kombinasi waktu inkubasi 30 menit, masing-masing untuk antigen, antibodi, dan konjugat tidak menunjukkan perbedaan yang berarti bila dibandingkan dengan prosedur standar. Hasil yang sama juga diperoleh pada uji ELISA dengan sampel uji ekstrak tanaman terinfeksi (Tabel 2).

Tabel 2. Nilai absorbansi (A_{405}) ELISA apabila virus dalam ekstrak diuji pada tiga belas kombinasi waktu inkubasi^{a)}

Waktu inkubasi			A 405 ekstrak tanaman pada pengenceran:							
Antigen	Antibodi	Konjugat	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
			I	H	I	H	I	H	I	H ^{b)}
4 jam	18 jam	4 jam ^{c)}	0,79	0,13	0,74	0,04	0,55	0,22	0,23	0,02
4 jam	18 jam	2 jam	0,81	0,16	0,75	0,04	0,73	0,05	0,38	0,00
4 jam	18 jam	1 jam	0,71	0,12	0,63	0,06	0,53	0,05	0,45	0,07
4 jam	18 jam	30 menit	0,93	0,11	0,79	0,07	0,71	0,03	0,49	0,00
2 jam	18 jam	4 jam	1,04	0,20	0,84	0,13	0,87	0,08	0,35	0,06
1 jam	18 jam	4 jam	1,47	0,14	1,17	0,03	1,42	0,02	0,67	0,00
30 menit	18 jam	4 jam	0,76	0,07	0,55	0,05	0,49	0,04	0,02	0,00
4 jam	4 jam	16 jam	1,47	0,04	1,45	0,00	1,38	0,00	0,99	0,00
4 jam	2 jam	16 jam	1,77	0,11	1,72	0,12	1,74	0,07	1,19	0,03
4 jam	30 menit	16 jam	1,70	0,00	1,55	0,01	1,67	0,00	1,19	0,02
30 menit	30 menit	30 menit	0,70	0,02	0,64	0,00	0,60	0,00	0,20	0,00
1 jam	2 jam	1 jam	0,93	0,06	0,79	0,00	0,79	0,00	0,45	0,00
1 jam	30 menit	2 jam	1,38	0,10	1,28	0,03	1,22	0,01	0,75	0,00

^{a)} Masing-masing nilai absorbansi merupakan rata-rata dari tiga ulangan dengan tiga sumuran tiap perlakuan.

^{b)} I= ekstrak tanaman terinfeksi, H= ekstrak tanaman sehat

^{c)} Prosedur standar

Pengaruh perlakuan bovine serum albumin (BSA).--Masalah yang umum dijumpai pada ELISA adalah adanya reaksi non-spesifik. Penambahan BSA setelah pelapisan sumuran dengan antigen dapat mengurangi reaksi non-spesifik¹⁰⁾. Pada penelitian ini, setelah pelapisan sumuran dengan antigen, sumuran diblok dengan menggunakan 0,05% BSA dalam 0,02 PBS M pH 7,4 selama 1 jam pada suhu 37°C. Dua prosedur dibandingkan untuk mengetahui pengaruh cara perlakuan BSA pada ELISA yang dipercepat. Prosedur pertama, pemblok dilakukan dengan menginkubasikan sumuran dengan 0,05% BSA

dalam 0,02 M pH 7,4 selama 30 menit pada suhu 37°C. Pada prosedur kedua, BSA ditambahkan ke dalam bufer yang digunakan untuk mengencerkan antibodi pada konsentrasi 0,05%. Pada konsentrasi virus yang tinggi kedua prosedur di atas memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibanding tanpa perlakuan BSA (Tabel 3).

Pengaruh cara perlakuan BSA dalam ELISA yang dipercepat pada ekstrak tanaman terlihat pada tabel 4. Perlakuan BSA dengan prosedur pertama mampu menurunkan reaksi non-spesifik pada ekstrak tanaman sehat. Namun, perlakuan BSA dengan prosedur kedua,

pada tingkat pengenceran tertentu memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibanding tanpa perlakuan BSA, meskipun tidak berbeda. Hal ini merupakan fenomena yang belum dapat dijelaskan. Pada ekstrak tanaman terinfeksi, perlakuan BSA pada kedua prosedur dapat memberikan nilai absorbansi lebih tinggi maupun lebih rendah dibanding tanpa perlakuan BSA.

Tabel 3. Pengaruh cara perlakuan *bovine serum albumin* (BSA) dalam ELISA yang dipercepat terhadap nilai absorbansi pada virus murni

Perlakuan ^{a)}	A ₄₀₅ ^{b)} virus murni pada konsentrasi (µg/ml)					
	10	5	1	0,50	0,10	0,05
A	0,55	0,54	0,37	0,26	0,03	0,01
B	0,60	0,57	0,50	0,28	0,05	0,01
C	0,42	0,42	0,37	0,25	0,05	0,02

^{a)} Perlakuan: A. Plate diinkubasikan dengan 0,05% BSA 0,02 M PBS pH 7,4 selama 30 menit pada suhu 37°C.
 B. BSA ditambahkan pada bufer yang digunakan untuk mengencerkan antibodi pada konsentrasi 0,05%.
 C. Tanpa perlakuan BSA.

^{b)} Masing-masing nilai absorbansi merupakan rata-rata dari tiga ulangan dengan tiga sumuran tiap perlakuan. Waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat masing-masing 30 menit pada suhu 37°C

Tabel 4. Pengaruh cara perlakuan *bovine serum albumin* (BSA) dalam ELISA yang dipercepat terhadap nilai absorbansi pada ekstrak tanaman sakit (I) dan ekstrak tanaman sehat (H)

Perlakuan ^{a)}	A ₄₀₅ ^{b)} ekstrak tanaman pada pengenceran							
	10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
	I	H	I	H	I	H	I	H
A	0,63	0,07	0,36	0,03	0,44	0,02	0,07	0
B	0,48	0,13	0,47	0,03	0,58	0,03	0,06	0
C	0,58	0,07	0,40	0,04	0,50	0,02	0,15	0

^{a)} Perlakuan: A. Plate diinkubasikan dengan 0,05% BSA 0,02 M PBS pH 7,4 selama 30 menit pada suhu 37°C.
 B. BSA ditambahkan pada bufer yang digunakan untuk mengencerkan antibodi pada konsentrasi 0,05%.
 C. Tanpa perlakuan BSA.

^{b)} Masing-masing nilai absorbansi merupakan rata-rata dari tiga ulangan dengan tiga sumuran tiap perlakuan. Waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat masing-masing 30 menit pada suhu 37°C.

Deteksi virus dari sampel lapangan.-- ELISA yang dipercepat pada deteksi TMV dari sampel lapangan memberikan hasil seperti pada tabel 5. Dari tabel tersebut ternyata reaksi positif hanya ditunjukkan oleh sampel daun tembakau dari Parakan dan Kedu, sedangkan sampel lainnya menunjukkan reaksi negatif.

Tabel 5. Deteksi TMV menggunakan ELISA yang dipercepat dalam sampel dari lapangan

Sampel ^{a)}	A ₄₀₅ ^{b)}
Tembakau 1	0,43
Tembakau 2	0,50
Tembakau 3	0,02
Bawang putih 1	0,03
Bawang putih 2	0,02
<i>C. amaranticolor</i> sakit	0,41
<i>C. amaranticolor</i> sehat	0,02

^{a)} Sampel daun tembakau dikoleksi dari :
 1, Parakan; 2, Kedu (Temanggung);
 3, Ngaglik (Sleman).

Sampel daun bawang putih dikoleksi dari :
 1, Sanden; 2, Srandakan (Bantul).

^{b)} Masing-masing nilai absorbansi merupakan rata-rata dari tiga sumuran pada plate ELISA. Antigen digunakan pada pengenceran 10⁻⁴ kali dan antibodi pada 1:1000. Waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat masing-masing 30 menit tanpa perlakuan BSA.

PEMBAHASAN

Indirect ELISA telah berhasil digunakan untuk deteksi berbagai macam virus tumbuhan. I-ELISA lebih sensitif dibanding DAS ELISA, oleh karenanya metode tersebut lebih cocok untuk diagnosis virus dan deteksi virus secara rutin^{1,10,12)}. Namun, dengan menggunakan prosedur standar, hasil pengujian diperoleh dalam waktu 1-2 hari. Waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat yang diperpendek diuji untuk mengatasi hal tersebut di atas.

Data pada tabel 1 dan 2 menunjukkan bahwa antigen yang diinkubasikan selama 30 menit pada suhu 37°C memberikan nilai absorbansi yang layak untuk deteksi TMV, bahkan pada preparasi virus murni memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibanding prosedur standar. Suhu dan waktu inkubasi merupakan faktor penting dalam reaksi serologi¹⁾. Inkubasi

selama 30 menit pada suhu 37°C memacu reaksi serologi tanpa merusak antigenisitas virus. Inkubasi antibodi selama 30 menit pada suhu 37°C ternyata dapat menstimulasi reaksi serologi antara antigen dan antibodi. Dalam hal ini, waktu inkubasi konjugat adalah 16 jam.

Konjugat yang diinkubasikan pada suhu 37°C selama 30 menit, pada ekstrak tanaman memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibanding prosedur standar. Hal ini menunjukkan bahwa kondisi tersebut lebih sesuai untuk terjadinya reaksi antara konjugat dengan kompleks antigen-antibodi. Sebaliknya, pada preparasi virus murni kondisi inkubasi seperti tersebut di atas memberikan nilai absorbansi sedikit lebih rendah dibanding prosedur standar. Namun, pada uji ELISA hasil yang layak tidak harus ditunjukkan oleh nilai absorbansi yang tinggi. Oleh karena itu, kombinasi waktu inkubasi antigen, antibodi, dan konjugat masing-masing selama 30 menit lebih cocok digunakan dalam I-ELISA untuk memperoleh hasil pengujian yang lebih cepat.

Bovine serum albumin (BSA) dapat mengurangi reaksi non-spesifik pada ELISA⁷. Tabel 3 menunjukkan bahwa penggunaan BSA baik untuk *blocking* plate mikrotiter setelah pelapisan dengan antigen maupun untuk tambahan pada bufer yang digunakan untuk mengencerkan antibodi memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi daripada tanpa perlakuan BSA untuk preparasi virus murni pada konsentrasi tinggi. Hal ini disebabkan karena kedua prosedur perlakuan BSA di atas mampu menurunkan desorpsi antigen maupun kompleks antigen-antibodi dari permukaan plate.

Faktor yang penting dalam I-ELISA adalah stabilitas antigen yang terserap pada permukaan plate. Desorpsi antigen⁸ dan kompleks antigen-antibodi dari plate selama inkubasi dan tahap pencucian⁹ telah dilaporkan. Sebaliknya, pada konsentrasi virus yang rendah BSA memberikan nilai absorbansi yang lebih rendah. Perlakuan BSA pada konsentrasi virus rendah akan mengganggu determinan antigenik dalam membentuk kompleks dengan antibodi.

Pada ekstrak tanaman sehat penggunaan BSA untuk *blocking* plate dapat menurunkan reaksi non-spesifik karena kemampuannya

menutup bagian permukaan plate yang tidak terlapisi antigen. Namun, perlakuan BSA dengan menambahkannya pada bufer yang digunakan untuk mengencerkan antibodi, pada tingkat pengenceran tertentu memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi dibanding tanpa perlakuan BSA meskipun tidak berbeda nyata (Tabel 4). Hal ini merupakan fenomena yang belum dapat dijelaskan.

Pada ekstrak tanaman terinfeksi perlakuan BSA dapat memberikan nilai absorbansi lebih tinggi maupun lebih rendah dibanding tanpa perlakuan BSA (Tabel 4) tergantung protein viral maupun non-viral yang terserap pada plate. Kompetisi antara protein viral dan non-viral dalam menempati permukaan plate akan sangat mempengaruhi hasil pengukuran kuantitatif. Apabila protein viral yang terserap pada permukaan plate lebih banyak, maka akan memberikan nilai absorbansi yang lebih tinggi, dan sebaliknya.

Kapasitas plate dalam menyerap protein (antigen) terbatas dan konsentrasi reaktan dapat mempengaruhi sensitivitas uji ELISA. Apabila kapasitas plate terlampaui protein akan terikat secara lemah⁷. Pada tingkat pengenceran rendah, konsentrasi protein (antigen) tinggi, antigen akan terikat secara lemah pada permukaan plate sehingga kemungkinan terjadinya desorpsi akan semakin besar dan hal ini akan mempengaruhi hasil pengukuran kuantitatif. Selain itu, untuk terbentuknya kompleks antigen-antibodi diperlukan proporsi yang optimum antara keduanya. Apabila salah satu komponen berlebihan, proses pembentukan kompleks antigen-antibodi akan terhambat¹⁰. Pada tingkat pengenceran rendah proporsi antigen dalam keadaan berlebihan sehingga menghambat pembentukan kompleks antigen-antibodi, dan pada akhir pengujian akan memberikan nilai absorbansi yang lebih rendah.

Meskipun uji dengan sampel lapangan baru dilakukan dengan jumlah sampel yang sangat terbatas, namun ada petunjuk yang kuat bahwa ELISA yang dipercepat dapat digunakan untuk deteksi adanya TMV. Penelitian untuk mengetahui uji tersebut untuk virus yang lain sedang dalam tahap pelaksanaan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Bos, L. 1983. *Introduction to Plant Virology*. (Pengantar Virologi Tumbuhan, alih bahasa Triharso). Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 226 hal.
2. Butler, J.E. 1988. The Amplified ELISA (a-ELISA): Immunochemistry and Applications. In Kemeny, D.M. and S.J. Challacombe (Eds.): *ELISA and Other Solid Phase Immunoassay. Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Sons. New York. p. 107-133.
3. Challacombe, S.J. 1988. Application of ELISA to Microbiology. In Kemeny, D.M. and S.J. Challacombe (Eds.): *ELISA and Other Solid Phase Immunoassay. Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Sons. p. 319-342.
4. Clark, M.F. 1981. Immunosorbent Assays in Plant Pathology. *Ann. Rev. Phytopathology*. 19 : 83-106.
5. Cushing, J.E. and D.H. Campbell. 1957. *Principles of Immunology*. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 344 p.
6. Hartono, S. 1996. *Deteksi Virus Bawang Putih dengan ELISA*. Tesis S-2. Program Pasca Sarjana UGM. Yogyakarta.
7. Kemeny, D.M. and S. Chantler. 1988. An Introduction to ELISA. In Kemeny, D.M. and S.J. Challacombe (Eds.): *ELISA and Other Solid Phase Immunoassay. Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Sons. New York. p. 1-29.
8. Kemeny, D.M. and S.J. Challacombe. 1988. Microtitre Plates Other Solid Phase Supports. In Kemeny, D.M. and S. J. Challacombe (Eds.): *ELISA and Other Solid Phase Immunoassay. Theoretical and Practical Aspects*. John Wiley and Sons. p. 31-55.
9. Koenig, R. 1981. Indirect ELISA Methods for The Broad Specificity Detection of Plant Viruses. *J. Gen. Virol.* 55 : 53-62.
10. Lommel, S.A., A.H. McCain, and T.J. Morris. 1982. Evaluation of Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for The Detection of Plant Viruses. *Phytopathology*. 72:1018-1022.
11. Martin, R.R. 1985. Recent Advances in Virus Detection. *HortScience*. 20(5) : 837-845.
12. Van Regenmortel, M.H.V. and J. Burckard. 1980. Detection of a Wide Spectrum of Tobacco Mosaic Virus Strains by Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent assays (ELISA). *Virology* 106 : 327-334.