

**PEMANFAATAN MEMBRAN NITROSELULOSA UNTUK
PENGIRIMAN ANTIGEN UJI DALAM DETEKSI TMV DENGAN DIBA***

*(APPLICATION OF NITROCELLULOSE MEMBRANE FOR
SENDING TEST ANTIGEN IN THE DETECTION OF TMV USING DIBA)*

Susanto Somowiyarjo, Y.B. Sumardiyono dan Suharno
Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Simplification of dot-immunobinding assay (DIBA) by using TMV- infected samples which were stored and mailed in nitrocellulose membrane (NCM) was described. The antigenicity of TMV in DIBA could be maintained in leaf extract-dotted NCM which had been stored at 29°C at least for 42 days. The method was developed for sending samples using infected leaf extract-dotted NCM to replace fresh samples. By this method, the antigenicity of the virus could be detected after they have been sent to 18 places which took time from 7 to 26 days. It is anticipated that the simplicity of DIBA using mailed samples will lead to DIBA's rapid adoption for development of central diagnosis facilities to support the viral diseases management. It may also have wider use in DIBA-based screening and survey programs for plant viruses and could overcome plant quarantine restriction.

Key words: TMV, antigenicity, DIBA

INTISARI

Penyederhanaan *dot-immunobinding assay* (DIBA) untuk diagnosis virus telah dilakukan dengan memanfaatkan antigen uji berupa ekstrak daun terinfeksi TMV yang telah disimpan dan dikirim melalui jasa pos. Keberadaan TMV dalam ekstrak tanaman sakit dapat dideteksi dengan DIBA meskipun ekstrak tersebut telah disimpan dalam *nitrocellulose membrane* (NCM) selama 42 hari pada suhu 29 °C. Uji yang sama juga dapat dimanfaatkan untuk mendeteksi virus dalam ekstrak dalam NCM yang sudah dikirim ke 18 lembaga penelitian dan pendidikan dengan waktu dari 7 sampai 26 hari. Selain penting untuk pengembangan pusat diagnosis penyakit tumbuhan, pengiriman sampel kering dengan NCM untuk uji serologi dapat dikembangkan lebih luas untuk program diagnosis dan survei virus tumbuhan dengan tetap memperhatikan kaidah-kaidah karantina tumbuhan.

Kata kunci : TMV, antigenisitas, DIBA

PENGANTAR

Sejak dilaporkan oleh beberapa pakar bahwa infeksi oleh virus atau kompleks virus pada umbi (bibit) merupakan penyebab

penting rendahnya angka hasil bawang putih (*Allium sativum* L.) (Yamashita *et al.*, 1990; Walkey, 1990; van Dijk dan Sutarya, 1992; van Dijk, 1993), maka usaha untuk menghasilkan bibit yang bebas virus melalui kultur meristem

a) Sebagian hasil penelitian yang dibiayai dengan Proyek Riset Unggulan Terpadu (RUT) 1/3 dengan nomor kontrak 1032/SP-KD/PPIT/IV/95

makin banyak diminati (Mori *et al.*, 1989; Walkey dan Antill, 1989). Sejalan dengan usaha tersebut dan untuk pengembangan diagnosis virus di lapangan telah banyak dilakukan penelitian untuk menghasilkan perangkat deteksi virus (Yamashita dan Oikawa, 1992; Tsuneyoshi dan Sumi, 1996).

Meskipun teknologi pelacak DNA telah berhasil dikembangkan untuk deteksi virus pada bawang putih (Tsuneyoshi dan Sumi, 1996), namun saat ini karena kesederhanaannya, uji serologi masih merupakan metode yang paling banyak dimanfaatkan untuk diagnosis dalam skala besar. Untuk mengatasi belum meratanya ketersediaan fasilitas diagnosis di seluruh sentral produksi bawang putih, maka bahan segar yang diduga sakit terpaksa harus dikirim ke laboratorium dengan jarak yang cukup jauh. Karena mudahnya sampel segar mengalami kerusakan di perjalanan, pengiriman sampel segar untuk diagnosis dirasakan tidak praktis dan mempunyai resiko fitopatologis yaitu terjadinya penyebaran penyakit yang lebih luas. Dalam rangka memperbaiki sistem diagnosis tersebut diperlukan cara alternatif pengiriman sampel yang mudah dan sederhana dengan resiko penularan penyakit yang rendah.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi antigenisitas TMV yang berosiasi dengan bawang putih (Hartono *et al.*, 1996) dalam ekstrak tanaman yang telah disimpan dan dikirim melalui jasa pos.

BAHAN DAN METODE

Isolat Virus dan Antiserum

Isolat virus dan antiserum yang digunakan sama dengan yang digunakan pada penelitian sebelumnya (Hartono *et al.*, 1996; Somowiyarjo *et al.*, 1996). Perbanyakkan virus dilakukan pada *Chenopodium amaranticolor* Coste *et Reyn* dengan cara penularan mekanik.

Dot-Immunobinding Assay (DIBA)

Dalam hal yang tidak disebutkan secara khusus, pengujian antigenisitas virus dilakukan dengan metode DIBA yang dilaporkan oleh Hibi dan Saito (1985) dengan kondisi seperti yang digunakan untuk *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) (Somowiyarjo, 1989). Antigen diletakkan (*dotted*) pada nitrocelulose membrane (NCM) (ukuran pori 0,45 μ m, Bio-Rad) yang telah dipotong-potong dengan ukuran \pm 1x1 cm untuk setiap sampel. Selanjutnya NCM diproses mengikuti metode baku yang telah dilaporkan oleh Hibi dan Saito (1985) menggunakan *alkaline phosphatase-labelled goat anti rabbit IgG - IgM (H-L) immunoglobulin* (Sigma) dengan pengenceran 3.000 kali. Substrat terdiri atas campuran *Fast Red TR-Salt* (Sigma) dan *naphthol AS-MX* (Sigma) dengan komposisi dan cara penyiapan seperti yang dilaporkan oleh Bantari dan Goodwin (1985).

Pengaruh Penyimpanan Terhadap Antigenisitas TMV

Sebagai percobaan pendahuluan dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh penyimpanan terhadap antigenisitas virus. Ekstrak tanaman sakit dan sehat yang didisposisi (*dotted*) pada NCM dimasukkan dalam kotak plastik ukuran 5 x 10 x 20 cm yang di dalamnya telah diisi dengan 100 g CaCl₂. Kotak plastik kemudian disimpan pada suhu -5, 6, dan 29°C. Virus yang telah disimpan kemudian digunakan sebagai antigen uji dalam DIBA.

Pengiriman Sampel

Ekstrak tanaman sehat dan terinfeksi virus yang telah didisposisikan (*dotted*) pada NCM dikemas dalam sampul surat kemudian dikirim ke 18 alamat yang diharapkan dapat mewakili berbagai keadaan di Indonesia (Tabel 2). Di dalam amplop tersebut disertakan permohonan agar sampel yang telah sampai ke alamat dapat

dikirimkan ke Fakultas Pertanian UGM. Setelah tiba di Fakultas Pertanian UGM sampel kemudian diproses dengan metode DIBA.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pengaruh Penyimpanan Terhadap Antigenisitas TMV

Hasil penelitian pada Tabel 1 menunjukkan bahwa DIBA masih dapat mengenal adanya antigenisitas TMV dalam ekstrak tanaman sakit yang telah disimpan dalam NCM selama 42 hari pada ketiga suhu yang diuji. Hal ini mudah dimengerti karena TMV termasuk virus yang mempunyai stabilitas molekul tinggi dengan suhu inaktivasi (*thermal inactivation point*) 94°C (Semangun, 1988).

Tabel 1. Hasil *Dot-immunobinding assay* dengan antigen berupa ekstrak daun *C. amaranticolor* sehat (K) dan terinfeksi TMV (S) yang telah disimpan pada suhu 29, 6, dan -5°C

Suhu (°C)	Lama Penyimpanan (hari)					
	14		28		42	
	K	S	K	S	K	S
Kamar (29)	-	++	-	++	-	+++
6	-	+	-	+	-	++
-5	-	+	-	+	-	+

Keterangan: - tidak bereaksi
+ kemerahan
++ merah agak kabur
+++ merah

Meskipun penyimpanan daun terinfeksi pada suhu rendah sudah umum dilakukan untuk mempertahankan infektifitas virus dalam jangka panjang (Matthews, 1970), dalam penelitian ini terlihat adanya kecenderungan bahwa penyimpanan virus dengan NCM pada suhu yang lebih rendah justru akan menurunkan antigenisitas virus dalam DIBA. Diduga bahwa

penurunan antigenisitas tersebut bukan disebabkan oleh inaktivasi atau kerusakan partikel, tetapi karena adanya desorpsi (pelepasan) partikel virus dari NCM pada saat terjadi perubahan suhu yang mendadak dari rendah ke suhu kamar pada saat sampel diproses.

Fakta bahwa virus dapat mempertahankan antigenisitasnya pada suhu kamar merupakan peluang baik bagi suatu laboratorium untuk mengembangkan metode diagnosis dengan DIBA. Kemampuan virus dalam NCM untuk mempertahankan antigenisitasnya memungkinkan suatu laboratorium mengumpulkan sampel yang jumlahnya masih sedikit, untuk mencapai jumlah besar kemudian dapat diproses secara serentak dengan jumlah reagen yang relatif sedikit. Efisiensi jumlah reagen yang diperlukan, khususnya untuk memproses sampel yang jumlahnya besar, merupakan salah satu keunggulan DIBA dibandingkan dengan uji serologi yang lain, seperti *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Hibi dan Saito, 1985).

2. Pengaruh Pengiriman Sampel Terhadap Antigenisitas TMV

Waktu yang diperlukan untuk mengirimkan sampel dari Fakultas Pertanian UGM ke alamat yang dituju dan mengirimkan kembali ke Fakultas Pertanian UGM bervariasi dari 7 hari sampai 26 hari (Tabel 2.)

Dari Tabel 2 juga dapat diketahui bahwa virus masih mempunyai antigenisitas meskipun telah mengalami perjalanan yang cukup lama. Keberhasilan yang serupa pernah dilaporkan oleh Lister *et al.* (1985) dengan mengirimkan sampel daun gandum kering yang terinfeksi *Barley Yellow Dwarf Virus*.

Fakta bahwa TMV dapat mempertahankan antigenisitasnya pada suhu yang relatif tinggi dan setelah melalui perjalanan jauh perlu ditindaklanjuti dengan meneliti virus lain khususnya yang jauh kekerabatannya. Pada

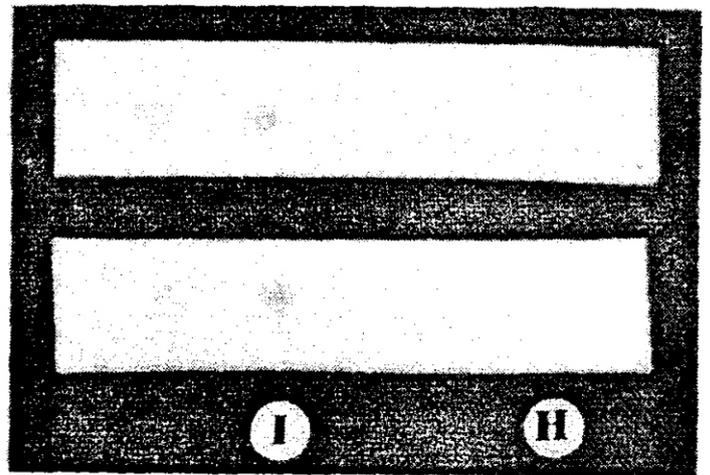
penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) juga dapat mempertahankan antigenisitasnya setelah dikirim melalui pos (Somowiyarjo *et al.*, 1989). Dalam hal mempertimbangkan stabilitas partikel dalam penyimpanan, perlu diingat bahwa virus dengan ukuran kecil dan berbentuk sferik umumnya lebih tahan dari pada virus dengan ukuran besar dan berbentuk batang atau benang (Matthews, 1970).

Tabel 2. Reaksi ekstrak daun *C. amaranticolor* sehat (K) dan terinfeksi TMV (S) yang telah dikirim melalui pos dalam uji *dot-immunobinding assay*

No.	Tujuan pengiriman	Lama Pengiriman (hari)	Reaksi	
			K	S
1	UNS Surakarta	7	-	++
2	UNMER Madiun	9	-	++
3	UNSOED Purwokerto	9	-	++
4	Bandara Iskandar Kalimantan Tengah	10	-	++
5	Universitas Jember	11	-	+++
6	Diperta Tanaman Pangan Jateng	11	-	+
7	Diperta Tanaman Pangan Lampung	13	-	+
8	UNHALU Kendari	13	-	+++
9	IPB Bogor	13	-	+++
10	Diperta Tanaman Pangan Irian Jaya	13	-	++
11	Jakarta Utara	14	-	++
12	UNSYIAH Aceh	14	-	+++
13	Diperta Tanaman Pangan Kalsel	14	-	++
14	Pangkal Pinang	15	-	++
15	Diperta Tanaman Pangan Jabar	17	-	++
16	Univ. Palembang	19	-	+++
17	Univ. Lampung	19	-	+++
18	Tokyo, Jepang	26	-	+++

Keterangan : - tidak bereaksi
+ kemerahan
++ merah agak kabur
+++ merah

Kenampakan reaksi salah satu sampel yang telah dikirim terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Contoh hasil DIBA dengan ekstrak tanaman sehat (H) dan sakit (I) yang telah dikirim melalui pos.

Dibandingkan dengan cara konvensional dalam pengiriman sampel, yaitu dalam bentuk pengiriman sampel segar, pengiriman sampel dalam bentuk antigen yang didisposisi (*dotted*) pada NCM mempunyai beberapa keuntungan antara lain: dapat menghindari pembusukan sampel, lebih ringan, lebih murah serta memperkecil adanya risiko penularan penyakit dari sampel sakit yang dikirim. Apabila diperlukan, risiko adanya penularan patogen dari sampel sakit dapat dihindari dengan memperlakukan sampel sebelum dikirim dengan menambahkan bahan, misalnya *glutaraldehyde*, yang dapat menginaktivkan virus tanpa merusak antigenisitasnya. Pengiriman antigen yang telah dihilangkan infektifitasnya ini juga pernah disarankan untuk patogen yang berbahaya bagi manusia dan hewan (Palfree dan Elliott, 1982).

Pengembangan teknik diagnosis dengan antigen yang sudah tidak infeksi tampaknya perlu terus dikembangkan untuk jenis antigen yang lebih luas, agar pengiriman bahan untuk diagnosis dapat dilakukan secara cepat dan sederhana tanpa harus berbenturan dengan peraturan karantina yang melindungi kepentingan masyarakat.

Hasil penelitian ini dan penelitian sebelumnya telah cukup sebagai dasar perlunya segera dikembangkan sentralisasi fasilitas diagnosis untuk virus pada tanaman-tanaman penting dalam rangka efisiensi fasilitas serologi di lembaga-lembaga yang sudah berkembang. Dengan sentralisasi maka fasilitas pengujian serologi yang harganya relatif mahal tidak perlu harus dimiliki oleh pusat-pusat produksi dan yang diperlukan adalah suatu lembaga yang mampu mengkoordinasi kegiatan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Bantari, E.E. and P.H. Goodwin. 1985. Detection of Potato Virus S, X, and Y by Enzyme-linked Immunosorbent Assay on Nitrocellulose Membrane (Dot-ELISA). *Plant Diseases* 69: 202-205.
- Hartono S., Y.B. Sumardiyono dan S. Somowiyarjo. 1996. Karakterisasi TMV Isolat Bawang Putih. *BPPS-UGM* 9(2B): 167-175.
- Hibi, T. and Y. Saito. 1985. A Dot-Immunobinding Assay for the Detection of Tobacco Mosaic Virus in Infected Tissues. *J. Gen. Virol.* 66: 1191-1194.
- Lister, R.M., D. Clement, M. Skaria and J.A. McFtridge. 1985. Stability of ELISA Activity of Barley Yellow Dwarf Virus in Leaf Samples and Extracts. *Plant Disease* 69(10): 854-8578.
- Matthews, R.E.F. 1970. *Plant Virology*. Acad. Press., New York. 778 p.
- Mori, N., T. Ogawa and N. Matsubara. 1989. Production of Virus-free Garlic (*Allium sativum* L.) by Tissue Culture. *Bull. of Nagasaki Agric. and For. Exp. St.* 17: 67-83.
- Palfree, R.G.E. and B.E. Elliott. 1982. An Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detergent Solubilized Ia Glicoproteins Using Nitrocellulose Membrane Discs. *J. Immunol. Methods.* 52:395-408.
- Semangun, H. 1988. *Penyakit-penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Gadjah Mada Univ. Press. 808p.
- Somowiyarjo, S., N. Sako and F. Nonaka. 1989. Dot-immunobinding Assay for Zucchini Yellow Mosaic Virus Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 55: 56-63.
- Somowiyarjo, S., Y.B. Sumardiyono dan P. Widiyati. 1996. Pemendekan Waktu ELISA Dalam Deteksi TMV. *J. Perlind. Tan. Ind.* 2(2): 66-71.
- Tsuneyoshi, T. and S. Sumi. 1996. Differentiation among garlic viruses in mixed infections based on RT-PCR procedures and direct tissue blotting immunoassays. *Phytopathology* 86:253-259.
- Van Dijk, P. 1993. Carlavirus Isolates from Cultivated Allium Species Represent Three Viruses. *Nth. J. Pl. Path.* 99: 233-257.
- Van Dijk, P. and Sutarya. 1992. *Virus survey of garlic, shallot and welsh onion in Java, Indonesia*. Internal Communication of the DLO Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO) Wageningen, Netherlands. 70p.
- Walkey, D.G.A. 1990. Virus Diseases. p.191-212. *Dalam* H.D. Rabinowitch and J.L. Brewster (Ed.) *Onions and Allied Crops. Vol. II*. CRC Press, INC., Florida.
- Walkey, D.G.A. and D.N. Antill. 1989. Agronomic Evaluation of Virus-free and Virus-infected Garlic (*Allium sativum* L.). *J. Horticultural Science* 64: 53-60.
- Yamashita, K. and K. Oikawa. 1992. Detection of Garlic Mosaic Virus by DIBA and Indirect ELISA. *Ann Rept. Plant Prot. North Japan* 43:66-68.