



**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN
KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS* (SCMV) PADA HEWAN COBA
*KELINCIGALUR NEW ZEALAND WHITE***

SKRIPSI

Oleh :
NOVITA NISWATUN AZIZAH
NIM 121810401038

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN
KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS* (SCMV) PADA HEWAN COBA
*KELINCIGALUR NEW ZEALAND WHITE***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi syarat-syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh

**NOVITA NISWATUN AZIZAH
NIM 121810401038**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER
2017**

PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Khulal Aziz, ibu Khomsaniah tercinta, kakak Dodik Sumariyanto, Dedik Suhariyanto, adik Firman Arizal Suhariyanto, Isnia Maulidia Suhariyanto atas segala pengorbanan, kasih sayang dan doa yang terus mengalir;
2. Prof. Bambang Sugiharto selaku pembimbing sekaligus bapak untuk kita di laboratorium CDAST Universitas Jember
3. seluruh keluarga besar yang telah memberikando'a, dukungan dan semangat untuk menuntut ilmu;
4. semua guru-guru yang telah mendidik dan memberikan ilmunya, terima kasih yang tak terhingga atas ilmu yang telah diberikan;
5. almamater Universitas Jember.

MOTTO

“Jika semua yang kita kehendaki terus kita miliki, darimana kita belajar ikhlas”

“Jika semua yang kita impikan segera terwujud, darimana kita belajar sabar”

“Jika setiap doa kita terus dikabulkan, bagaimana kita belajar ikhtiar”

“Ketika kerjamu tidak dihargai, maka saat itu kamu sedang belajar ketulusan”

“Ketika usahamu dinilai tidak penting, maka saat itu kamu sedang belajar keikhlasan”

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Novita Niswatun Azizah

NIM : 121810401038

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul: **“Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Kapsid Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) pada Hewan Coba Kelinci galur New Zealand White”** adalah benar-benar karya sendiri yang merupakan sub tema dari penelitian Prof. Bambang Sugiharto yang berjudul Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas dan Tahan Sugarcane Mosaic Virus melalui Penerapan Teknologi *Pathogen Derived Resistance* yang dibiayai oleh Sistem Inovasi Nasional (SINas) Ristek Tahun 2014-2016 kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 21 Februari 2017

Yang menyatakan

Novita Niswatun Azizah
NIM 121810401038

SKRIPSI

**PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL PROTEIN KAPSID
SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV) PADA HEWAN
COBAKELINCI GALURNEW ZEALAND WHITE**

Oleh:

**NOVITA NISWATUN AZIZAH
NIM 121810401038**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Hardian Susilo Addy, S.P.,M.P., Ph.D

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “*Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Kapsid Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) pada Hewan Coba Kelinci Galur New Zealand White*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember pada:

Hari :
Tanggal :
Tempat : Fakultas MIPA Universitas Jember

Tim Penguji,

Ketua,

Sekretaris,

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc
NIP 19551022198212001

Hardian Susilo Addy., S.P, M.P, Ph.D
NIP. 198011092005011001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. Rike Oktarianti., M.Si
NIP 196310261990022001

Drs. Rudju Winarsa., M.Kes
NIP 196008161989021001

Mengesahkan,

Dekan,

Drs. Sujito, Ph.D
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Kapsid Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) pada Hewan Coba Kelinci galur *New Zealand White*: Novita Niswaton Azizah, 121810401038; 2017, 22Halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) merupakan salah satu virus yang menyerang tanaman tebu yang dapat menghambat fotosintesis, merusak tanaman, dan menurunkan hasil produksi yang signifikan (Alegria *et al.*, 2002). Besarnya kerugian yang ditimbulkan menyebabkan perlunya langkah pengendalian untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan. Salah satu cara efektif yang dapat dilakukan untuk menanggulangnya yaitu dengan melakukan diagnosa yang cepat dan tepat agar dapat segera dilakukan langkah pengendalian yang tepat. Diagnosa penyakit tebu diperlukan dalam menunjang peningkatan produksi tebu yang dapat menghasilkan panen optimal. Diagnosa yang lambat dan tidak tepat dapat menyebabkan ketidakefektifan yang menyebabkan rusaknya tanaman dan terbuangnya uang dan waktu (Kabashima, 1997). Salah satu cara yang cepat untuk mendiagnosa penyakit pada tanaman yaitu dengan penggunaa kit detektor berbasis serologi seperti yang sudah ada yaitu pada *Bean Yellow Mosaic Virus*, *Potato Virus Y*, dan *Plum Pox Virus*(Dsmz, 2016).

Uji serologi merupakan salah satu cara deteksi dan identifikasi suatu patogen dalam suatu inang yang memanfaatkan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi (Crowther,1995). Keberhasilan dan ketelitian uji serologi untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus sangat bergantung pada ketersediaan pereaksi diagnostik seperti antibodi dengan kualitas yang baik (Kumari *et.al.*,2006). Untuk membuat antibodi dari suatu virus tumbuhan pada umumnya digunakan protein kapsid partikel virus (Temaja *et.al.*,2010). Melalui kloning gen penyandi protein kapsidSCMV telah dihasilkan protein rekombinan yang dapat digunakan sebagai imunogen untuk membuat antibodi rekombinan yang diinjeksikan kedalam tubuh hewan berdarah panas seperti kelinci. Dengan

menggunakan uji serologis diharapkan akan mempunyai keunggulan proses maupun kualitasnya dibandingkan dengan pengamatan morfologis untuk mendeteksi gejala penyakit SCMV. Oleh karena itu perlu dilakukan pembuatan antibodi sebagai upaya deteksi dini dan langkah awal pengendalian penyakit dilapang.

Pembuatan antibodi dilakukan pada *New Zealand White Rabbit* menggunakan antigen protein rekombinan protein kapsid SCMV hasil overekspresi *E. coli* strain BL-21 yang telah disisipi vektor yang mengandung cDNA protein kapsid SCMV. Antigen dicampur dengan *Freund's* adjuvant dan diimunisasi secara subkutan. Antibodi yang terbentuk digunakan untuk analisis molekuler tanaman seperti deteksi SCMV pada tanaman. Hasil penelitian menunjukkan bahwa antibodi poliklonal protein kapsid SCMV dapat mendeteksi antigen dengan berat molekul 36 kDa – 46 kDa sampai dengan konsentrasi 0,01 µg pada rekombinan protein kapsid SCMV, sedangkan pada tanaman yang bergejala mosaik antibodi poliklonal protein kapsid SCMV dapat mendeteksi protein kapsid SCMV pada bagian supernatan dan pelet.

PRAKATA

Puji syukur kepada Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul *Pembuatan Antibodi Poliklonal Protein Kapsid Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) pada Hewan Coba Kelinci galur New Zealand White*. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember. Penelitian ini dibiayai oleh Sinas Ristek Tahun 2014-2016 dengan judul “Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas Dan Tahan *Sugarcane Mosaic Virus* Melalui Penerapan Teknologi *Pathogen Derived Resistance*”

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr.Sc selaku dosen pembimbing utama dan bapak kami di laboratorium;
2. Hardian Susilo Addy., Ph.D selaku dosen pembimbing anggota yang dengan penuh kesabaran memberikan pengarahan, bimbingan, dan saran dalam penulisan skripsi ini;
3. Dr. Rike Oktarianti.,M.Si dan Drs. Rudju Winarsa.,M.Kes selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Drs.Siswanto,M.Si selaku dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan motivasi selama menjadi Mahasiswa Universitas Jember;
5. Purnama Okvidanari M.P, Arsetyo Rahardianto S.Si dan keluarga besar peneliti CDAST yang telah memberikan bantuan, dukungan dan masukan atas jalannya penelitian;
6. teman seperjuangan kiky, suvia, suwinda, savira, ari, cici, ayu, weny, tisa, diqita, febri, reza, amir, guruh yang telah memberkan semangat dan dukungannya;

7. keluarga besar CDAST, Sugar Group, Melinjo Group, Phage Team, Cassava Team atas dukungannya selama ini;
8. semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

Penulis juga menerima saran dan kritik dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Jember, 21 Februari 2017

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
BAB 1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat.....	2
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Respon Imun Humoral.....	3
2.2 Interaksi Antigen-Antibodi.....	5
2.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal.....	6
2.4 Uji Ouchterlony.....	7
BAB 3. METODE PENELITIAN	
3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal protein kapsid SCMV pada Tubuh Kelinci.....	9
3.2 Uji Ouchterlony.....	10
3.3 Analisis Western blotting.....	10
3.3.1 Deteksi Antibodi Poliklonal protein kapsid SCMV.....	10
3.3.2 Uji Deteksi SCMV pada Tanaman yang Memiliki Gejala mosaik.....	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal protein kapsid SCMV pada Kelinci dan Analisa <i>Ouchterlony</i>	12
4.2 Deteksi Antibodi Dengan Analisa <i>Western Blotting</i>	14
4.3 Deteksi Tanaman yang Memiliki Gejala SCMV Menggunakan Antibodi Poliklonal protein kapsid SCMV.....	15
BAB 5. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan.....	18
5.2 Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA	19
LAMPIRAN	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Aktivasi <i>Antigen Presenting Cell</i> (APC)	4
Gambar 2.2	Aktivasi sel T helper	4
Gambar 2.3	Aktivasi sel B	5
Gambar 2.4	Difusi antigen dan antibodi dalam media agar	8
Gambar 4.1	Uji <i>Ouchterlony</i> dengan 5 μ lantigen protein rekombinan protein kapsid SCMV	13
Gambar 4.2	Analisa <i>western blotting</i> antigen protein rekombinan protein kapsid SCMV.....	15
Gambar 4.3	Morfologi tanaman tebu tidak bergejala dan bergejala SCMV.....	16
Gambar 4.4	Deteksi tanaman bergejala SCMV menggunakan antibodi poliklonal protein kapsid SCMV Serum ke-V.....	16
Gambar 4.5	Deteksi tanaman bergejala SCMV menggunakan antibodi poliklonal protein kapsid SCMVSerum ke-V.....	17

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Frekuensi Injeksi antigen dengan <i>adjuvant</i> dan pengambilan serum pada kelinci.....	9
Tabel 4.1	Daftar perolehan pengambilan serum darah kelinci	13



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit pada tanaman menyebabkan menurunnya produksi utama dan kerugian ekonomi dalam industri pertanian (Sankaran, 2010). Salah satunya yaitu *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) yang menyerang tanaman tebu yang dapat menghambat fotosintesis, merusak tanaman, dan menurunkan hasil produksi yang signifikan (Alegria *et al.*, 2002). Pemantauan kesehatan dan diagnosa penyakit pada tanaman sangat penting untuk pertanian berkelanjutan sehingga diperlukan diagnosa yang cepat agar memudahkan langkah pengendalian penyakit (Sankaran, 2010). Besarnya kerugian yang ditimbulkan menyebabkan perlunya langkah pengendalian untuk mengurangi dampak yang ditimbulkan. Salah satu cara efektif yang dapat dilakukan untuk menanggulangnya yaitu dengan melakukan diagnosa yang cepat dan tepat agar dapat segera dilakukan langkah pengendalian penyakit melalui strategi manajemen yang tepat seperti pengendalian vektor melalui aplikasi pestisida, aplikasi fungisida, dan aplikasi kimia penyakit tertentu yang dapat meningkatkan produktivitas (Sankaran, 2010). Diagnosa yang lambat dan tidak tepat dapat menyebabkan ketidakefektifan yang menyebabkan rusaknya tanaman dan terbuangnya uang dan waktu (Kabashima, 1997). Salah satu cara yang cepat untuk mendiagnosa penyakit pada tanaman yaitu dengan penggunaan kit detektor berbasis serologi seperti yang sudah ada yaitu pada *Bean Yellow Mosaic Virus*, *Potato Virus Y*, dan *Plum Pox Virus* (Dsmz, 2016).

Uji serologi merupakan salah satu cara deteksi dan identifikasi suatu patogen dalam suatu inang yang memanfaatkan reaksi spesifik antara antigen dan antibodi (Crowther, 1995). Keberhasilan dan ketelitian uji serologi untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus sangat bergantung pada ketersediaan pereaksi diagnostik seperti antibodi dengan kualitas yang baik (Kumari *et al.*, 2006). Untuk membuat antibodi dari suatu virus tumbuhan pada umumnya digunakan protein kapsid partikel virus (Temaja *et al.*, 2010). Melalui kloning gen penyandi protein kapsid SCMV telah dihasilkan protein rekombinan yang

dapat digunakan sebagai imunogen untuk membuat antibodi rekombinan yang diinjeksikan kedalam tubuh hewan berdarah panas seperti kelinci. Dengan menggunakan uji serologi diharapkan akan mempunyai keunggulan proses maupun kualitasnya. Oleh karena itu perlu dilakukan pembuatan antibodi sebagai upaya deteksi dini sebagai penentu langkah awal pengendalian penyakit dilapang.

1.1 Rumusan Masalah

Antibodi protein kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) merupakan salah satu faktor penting yang digunakan untuk deteksi penyakit SCMV pada tanaman tebu dengan metode serologi seperti *Western Blot*. Belum tersedianya antibodi merupakan salah satu kendala yang ada, oleh karena itu perlu dilakukan pembuatan antibodi poliklonal protein kapsid SCMV terlebih dahulu.

1.2 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan antibodi poliklonal dari protein kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) yang digunakan untuk deteksi penyakit SCMV pada tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.).

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah diperolehnya antibodi poliklonal protein kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* yang selanjutnya dapat dikembangkan sebagai metode diagnostik berbasis serologi yang memudahkan deteksi SCMV dilapang.

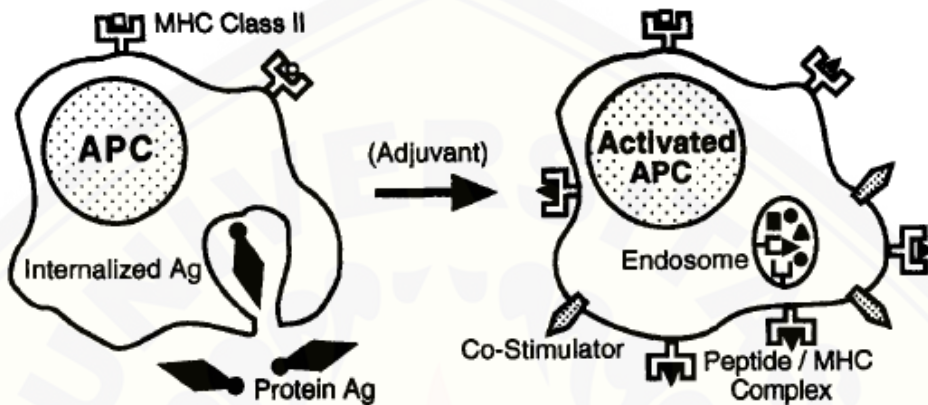
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Respon Imun Humoral

Respon humoral merupakan salah satu respon imun spesifik. Respon imun humoral dimulai dengan masuknya antigen ke dalam tubuh yang dilanjutkan dengan interaksi antara sel B dan sel T dengan respon imun lainnya sehingga sel plasma akan membentuk antibodi spesifik terhadap satu jenis antigen tertentu dan terbentuk kompleks antigen-antibodi melalui antigen binding site (Radji, 2010). Antigen adalah bahan yang berinteraksi dengan produk respon imun yang dirangsang oleh imunogen spesifik seperti antibodi. Imunogen adalah bahan yang menginduksi respon imun yang ditandai dengan induksi sel B untuk produksi imunoglobulin dan aktivitas sel T yang melepaskan sitokin. Imunogenesitas adalah kemampuan untuk menginduksi respon imun humoral atau selular, sedangkan antigenesitas adalah kemampuan suatu antigen untuk menginduksi respon imun yang dapat bereaksi dengan reseptor antigen yang diproduksi sel B dan reseptor antigen pada permukaan sel T (Bratawidjaja dan Rengganis, 2009). Antibodi merupakan serum immunoglobulin yang disintesis oleh tubuh sebagai respon terhadap substansi asing yang masuk ke dalam tubuh. Suatu makromolekul yang mampu memicu pembentukan antibodi disebut antigen. Struktur dasar dari sebuah molekul antibodi terdiri dari dua rantai ringan identik dan dua rantai berat identik yang dihubungkan oleh ikatan disulfida. Terdapat lima kelas imunoglobulin berdasarkan perbedaan aktivitas biologisnya yaitu IgM, IgG, IgE, IgA, dan IgD (Stryer, 1995).

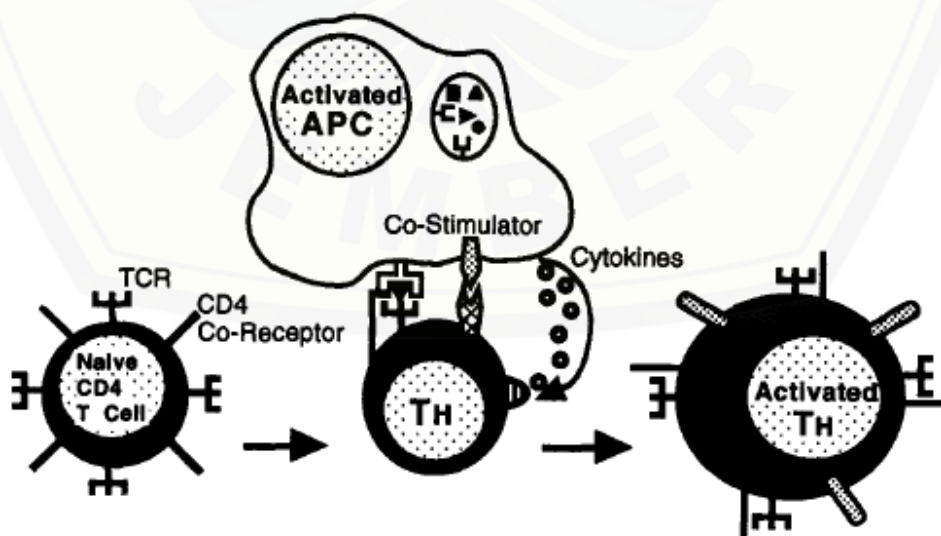
Berdasarkan ketergantungan terhadap sel T protein digolongkan dalam *T-dependent* yaitu memerlukan pengenalan sel T untuk menginduksi respon imun humoral untuk menghasilkan antibodi (Bratawidjaja dan Rengganis, 2009). Respon imun humoral dimulai dengan masuknya antigen ke dalam tubuh. Antigen yang ada dalam tubuh kemudian akan dikenali oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) yang akan menangkap antigen. Antigen yang ada di dalam APC kemudian akan terdegradasi oleh endosome. Fragmen-fragmen antigen yang telah didegradasi kemudian akan dipresentasikan menuju ke permukaan APC oleh

molekul MHC kelas II (Campbell *et al.*, 2004). Adanya *adjuvant* membantu meningkatkan respon imun melalui peningkatan aktivasi sel T dengan meningkatkan APC dan sitokin yang dihasilkan (Bratawidjadja dan Rengganis, 2014).



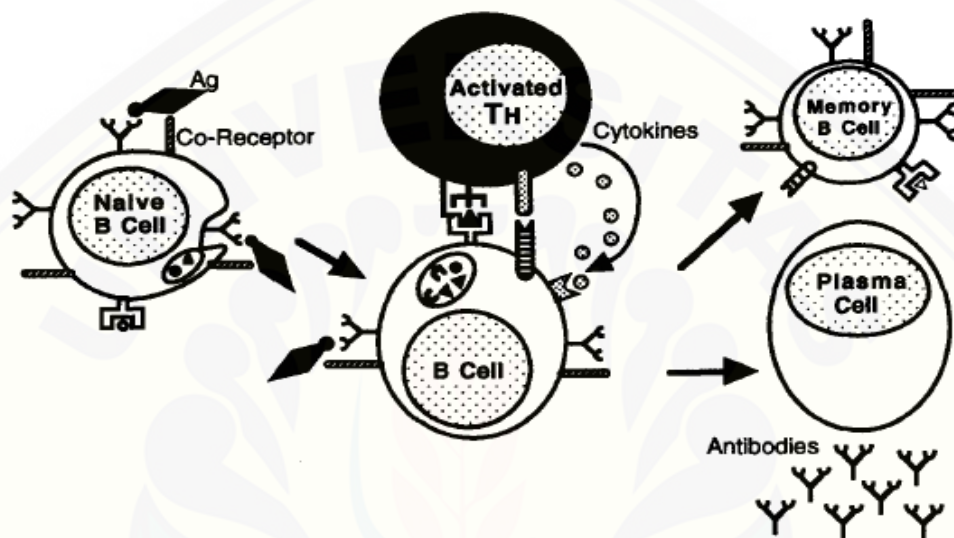
Gambar 2.1 Aktivasi *Antigen Presenting Cell* (APC) (Hanly *et al.*,1995).

Kompleks MHC kelas II yang membawa fragmen antigen kemudian akan dikenali oleh T-Cell Receptor (TCR) sehingga terbentuk interaksi antara keduanya, interaksi tersebut diperkuat oleh CD4 yaitu molekul reseptor permukaan sel T, sementara APC yang berikatan dengan reseptor permukaan sel T mensekresikan sitokin (IL-1) yang dapat mengaktifkan sel T helper.



Gambar 2.2 Aktivasi sel T helper (Hanly *et al.*,1995).

Sel T helper yang teraktivasi kemudian tumbuh dan membelah dan menghasilkan klon sel T helper yang semuanya memiliki reseptor yang terpasang dengan molekul MHC, selain itu juga dihasilkan sitokin interleukin-2 (IL-2) yang menginduksi proliferasi T helper dan aktivasi sel B. Sel B yang teraktivasi kemudian berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel B memori dan sel plasma untuk memproduksi IgG dan sel memori (Campbell *et al.*, 2004).



Gambar 2.3 Aktivasi sel B (Hanly *et al.*, 1995).

2.2 Interaksi Antigen-Antibodi

Antibodi dapat mengenal setiap molekul biologik sebagai antigen seperti hasil metabolik polisakarida, lipid, hormon, fosfolipid, dan protein. Pengenalan antigen dan antibodi melibatkan ikatan nonkovalen dan reversibel. Berbagai jenis interaksi nonkovalen seperti faktor elektrostatis, ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dapat berperan dalam pengikatan antigen oleh antibodi (Bratwidjadja dan Rengganis, 2014). Bagian dari antigen yang secara langsung berikatan dengan molekul reseptor disebut epitop. Antibodi dapat mengenal epitop dengan ukuran yang berbeda dan dapat menggunakan sebagian atau semua *Complementary Determining Regions* (CDRs) (Nelson, *et al.* 1997 dalam Lipman, *et al.*, 2005). Kekuatan ikatan antara satu antibodi dan epitop disebut afinitas antibodi (Bratwidjadja dan Rengganis, 2014). Afinitas pengikatan antibodi

dipengaruhi oleh konformasi determinan dan pengikatan protein sebelumnya. Afinitas antibodi yang tinggi cenderung mengikat antigen yang berukuran lebih besar dengan cepat dan memisah secara lambat dibandingkan afinitas antibodi yang rendah. Sedangkan kekuatan ikatan antibodi dengan epitop antigen keseluruhan disebut aviditas. Aviditas ditentukan oleh afinitas antibodi pada epitop, jumlah antibodi *binding site*, dan kompleks antibodi-antigen. Interaksi antigen dan antibodi dapat menimbulkan presipitasi. Antibodi poliklonal baik digunakan sebagai imunopresipitasi karena dapat mengikat molekul antigen dan menghasilkan kompleks antibodi-antigen yang membentuk garis presipitasi (Lipman *et al.*, 2005). Pada perkembangannya ikatan antigen dan antibodi dapat digunakan sebagai identifikasi dan karakterisasi antigen spesifik menggunakan antibodi spesifik sebagai *probe* yang divisualisasikan dengan *enzyme conjugated second antibody* seperti *Western Blot* (Dunbar dan Timmons, 1990).

2.3 Pembuatan Antibodi Poliklonal

Antibodi poliklonal terbentuk dari zat asing (antigen) yang masuk ke dalam tubuh menyebabkan rangsangan kekebalan (imun). Respon imun terjadi apabila sudah ada sel memori sebelumnya, menghasilkan antibodi dengan afinitas dan aviditas tinggi (Goldsby *et al.*, 2000). Peningkatan respon imun pada hewan coba dapat dipacu dengan menambahkan *adjuvant* pada antigen sebelum disuntikkan. *Adjuvant* merupakan bahan yang berbeda dari antigen yang ditambahkan ke vaksin untuk meningkatkan respon imun melalui peningkatan aktivasi sel T dengan meningkatkan APC dan sitokin yang dihasilkan. *Adjuvant* yang diikat antigen pada vaksin dapat mempertahankan antigen tetap ditempat injeksi dan mengantarkan antigen menuju kelenjar getah bening tempat respon imun berlangsung (Bratawidjadja dan Rengganis, 2014).

Pada imunisasi pertama digunakan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* yang akan menstimulasi dan meningkatkan respon imun yang spesifik terhadap antigen (Burgess dalam Syamsuri, 2013). CFA diperkuat dengan adanya bagian aktif pada bakteri yaitu muramil dipeptida yang menginduksi fungsi makrofag dan respon antibodi

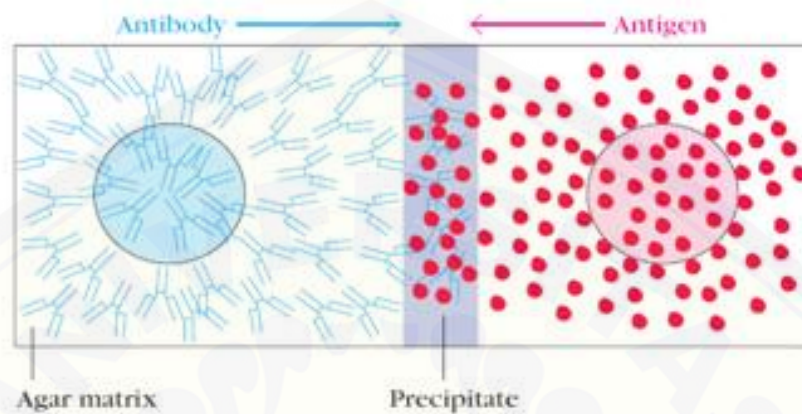
yang kuat dalam waktu lama (Cooper, 1977). Sedangkan pada imunisasi yang kedua digunakan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA) yang mengandung minyak mineral yang dicampur dengan antigen dalam air dan tidak mengandung *Mycobacterium tuberculosis* untuk menghindari reaksi hipersensivitas (Bratawidjada dan Rengganis, 2014). Ketika terdapat paparan antigen untuk pertama kalinya (respon primer), sel plasma akan membentuk immunoglobulin M (IgM) sebelum membentuk IgG. IgM merupakan antibodi yang pertama kali dibentuk oleh sel plasma pada respon primer setelah paparan antigen pertama. Paparan antigen baru berikutnya (*booster*) akan mengaktifasi sel memori dan merangsang respon antibodi kedua kali yang jauh lebih cepat dan kuat. Hal ini disebabkan sel memori berproliferasi dengan cepat membentuk sel plasma yang menghasilkan antibodi dalam jumlah besar yang disebut respon imun sekunder (Clark dan Pazdernik, 2009).

Penggunaan hewan uji merupakan salah satu faktor penting dalam produksi antibodi. Hewan yang sering digunakan adalah kelinci karena lebih mudah, murah, memiliki respon imun yang kuat, serta dapat diambil serum darahnya tanpa mengganggu kelinci tersebut (Lipman *et al.*, 2005). Pada umumnya kelinci yang digunakan adalah kelinci betina berusia 10-16 minggu. Dipilihnya kelinci betina karena lebih sensitif terhadap dosis antigen yang lebih rendah dan lebih lama dalam merespon imunisasi dibanding kelinci jantan, sedangkan kelinci yang lebih tua tidak dianjurkan untuk digunakan karena pada usia ini kemampuan sistem imun yang menurun (Leenars dan Hendriksen, 2005).

2.4 Uji Ouchterlony

Uji ouchterlony merupakan teknik imunologi yang digunakan untuk deteksi dan identifikasi reaksi antara antigen dan antibodi. Teknik ini ditemukan pada tahun 1948 oleh seorang ahli fisika Swedia bernama Orjan Ouchterlony. Prinsip kerja dari uji ouchterlony ini memanfaatkan reaksi antara antigen dan antibodi. Antigen dan antibodi yang berikatan akan membentuk presipitat. Presipitat ini terjadi karena antigen yang multivalent yaitu memiliki beberapa antigenik determinan per molekul yang dapat berikatan dengan antibodi, dan

antibodi setidaknya memiliki dua daerah pengikatan antigen sehingga membentuk agregat besar yang mengendap di gel dan membentuk garis presipitat putih yang merupakan ikatan antara antigen dan antibodi yang komplemen (Bailey, 1996).



Gambar 2.4 Difusi antigen dan antibodi dalam media agar (Bailey, 1996).

BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Sciences dan Technology* (CDAST) Universitas Jember mulai bulan Agustus 2016 - Desember 2016.

3.1 Pembuatan Antibodi Poliklonal protein kapsid SCMV pada Tubuh Kelinci

Pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menginjeksikan antigen yang berupa protein rekombinan protein kapsid SCMV ke dalam tubuh kelinci. Satu minggu sebelum injeksi diadakan pengambilan serum darah pre-imunisasi dari pembuluh vena telinga kelinci. Injeksi dilakukan dengan mencampur antigen protein rekombinan protein kapsid SCMV sebanyak 0,5 mg dengan *Freund's Complete Adjuvant*(FCA) sebanyak 1 ml dengan perbandingan 1:1 sampai homogen, kemudian diinjeksikan pada bagian bawah kulit (subkutan) punggung kelinci. Dua minggu kemudian dilakukan booster injeksi dengan mencampur antigen protein rekombinan protein kapsid SCMV sebanyak 0,1 mg dengan *Freund's Incomplete Adjuvant*(FIA) dengan perbandingan 1:1 sebanyak 1 ml sampai homogen dan seterusnya setiap satu minggu sekali sesuai dengan frekuensi injeksi antigen pada Tabel 3.1 (Dunbar dan Schwoebel, 1990).

Tabel 3.1 Frekuensi Injeksi antigen dengan *adjuvant* dan pengambilan serum pada kelinci

No	Minggu ke-	Jenis <i>Adjuvant</i>	Dosis antigen (mg)	Pengambilan serum
1	I	-	-	Pre-imunisasi
2	I	FCA	0,5	-
3	III	FIA	0,1	-
4	IV	FIA	0,1	Serum I
5	V	FIA	0,1	Serum II
6	VI	FIA	0,1	Serum III
7	VII	FIA	0,1	Serum IV
8	VIII	FIA	0,1	Serum V
9	IX	FIA	0,1	Serum VI
10	X	-	-	Serum VII

Satu bulan setelah injeksi pertama diambil serum darah kelinci untuk dilakukan uji serologi terhadap terbentuknya antibodi. Antibodi poliklonal yang terbentuk dianalisis dengan uji ouchterlony (Timmons dan Dunbar, 1990).

3.2 Uji Ouchterlony

Analisis ouchterlony dilakukan dengan melarutkan agarose 1% dengan agarose *buffer solution* yang terdiri dari 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, NaCl, dan 0,1 M NaN₃. Larutan dipanaskan dengan *microwave* sampai homogen kemudian dituang ke dalam gelas kaca sampai merata keseluruhan permukaan dan dibiarkan hingga dingin dan membeku, kemudian dibuat sumuran dengan diameter 2-3 mm dan jarak antar sumuran 0,5 cm. Larutan antigen dan antibodi dimasukkan ke dalam sumuran secara berdampingan dan diinkubasi selama dua hari kemudian diamati. Garis presipitasi yang terbentuk diantara sumuran antibodi dan antigen diwarnai dengan menggunakan pewarna *Commassie Brilliant Blue* (CBB) 1 %.

3.3 Analisis *Western Blotting*

Analisa *Western Blotting* dilakukan untuk deteksi adanya antibodi poliklonal protein kapsid SCMV dan deteksi SCMV pada tanaman yang memiliki gejala mosaik. Analisa *Western Blotting* dilakukan dengan tahapan SDS-PAGE untuk memisahkan protein berdasarkan ukurannya, transfer protein ke membrane *nitrocellulose*, dan deteksi menggunakan antibodi poliklonal protein kapsid SCMV.

3.3.1 Deteksi antibodi poliklonal protein kapsid SCMV

Untuk deteksi antibodi poliklonal protein kapsid SCMV SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dilakukan dengan memasukkan 0,001, 0,01, 0,1, dan 1 µg sampel protein rekombinan protein kapsid SCMV yang ditambah dengan *buffer loading* dengan perbandingan 1:1, kemudian dipanaskan pada air mendidih selama tiga menit. Sampel yang sudah dipanaskan dimasukkan ke dalam sumuran gel dan di *running* pada 70 volt selama 2,5 sampai 3 jam. Protein yang telah dipisahkan dengan SDS-PAGE

kemudian ditransfer ke membran *nitrocellulose* melalui aliran listrik sebesar 250 mA selama 2 jam pada suhu 4°C. Membran dicuci dengan TBS (*Tris Buffered Saline*) sebanyak tiga kali masing-masing lima menit. Setelah dicuci, protein pada membran diblocking dengan cara direndam pada 0,5% skim milk dalam TBS selama 30 menit. Deteksi antigen protein rekombinan protein kapsid SCMV dilakukan dengan inkubasi membran yang diberi antibodi poliklonal protein kapsid SCMV pada *shaker overnight*. Membran dicuci kembali dengan TBS sebanyak 3 kali 5 menit, kemudian diberi antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugate*) dalam TBS skim milk dan diinkubasi selama 1 jam. Sebelum pewarnaan, membran dicuci lagi dengan TBS dan buffer alkali fosfat pH 9,5. Pewarnaan dilakukan dengan 25 µl BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*) dan 50 µl NBT (*nitrobluetetrazolium chloride*) yang dilarutkan dalam 10 ml buffer alkali phosphate. Pita protein yang terbentuk merupakan pita protein protein kapsid SCMV.

3.3.2 Uji deteksi SCMV pada tanaman yang memiliki gejala mosaik

Uji deteksi SCMV pada tanaman yang memiliki gejala mosaik dilakukan dengan ekstraksi protein yang dilanjutkan dengan analisa *Western Blotting*. Ekstraksi protein dilakukan dengan menghaluskan daun tanaman tebu dengan mortal-stumpler yang mengandung buffer ekstraksi (0,25 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,2 mM EDTA, 0,01% PMSF, PVP 10%, 10% β-Mercaptoethanol). Kemudian sampel yang sudah dihaluskan dengan buffer disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit dan 40.000 rpm selama 4 jam untuk memisahkan supernatan dan peletnya. Deteksi SCMV pada tanaman tebu dilakukan pada supernatan dan peletnya. Protein yang telah ditransfer ke membran *nitrocellulose* kemudian diinkubasi dengan antibodi primer selama *overnight*. Setelah itu ditambahkan antibodi sekunder (*Alkaline phosphatase Goat-Anti IgG Rabbit conjugate*) dan diwarnai dengan BCIP dan NBT seperti metode yang disebutkan diatas. Pengamatan dilakukan dengan melihat terbentuknya warna pita pada ukuran target protein yang diduga.

BAB 5. PENUTUP

4.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan antibodi poliklonal protein kapsid SCMV dapat mendeteksi antigen baik protein kapsid SCMV maupun protein kapsid rekombinan dengan berat molekul 36 kDa – 46 kDa. Pada rekombinan protein kapsid SCMV antibodi poliklonal protein kapsid SCMV dapat mendeteksi sampai dengan konsentrasi 0,01 µg, sedangkan pada tanaman yang bergejala mosaik protein kapsid SCMV terdeteksi pada bagian supernatant dan pelet.

4.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan masih terdapat beberapa kendala yang dialami pada saat pelaksanaan kegiatan penelitian diantaranya yaitu sulitnya pengambilan serum darah karena kelinci terlalu aktif dan aliran darah yang lambat sehingga serum yang didapatkan hanya sedikit. Oleh karena itu untuk penelitian yang selanjutnya mungkin perlu diobservasi kembali untuk teknik pengambilan darah pada hewan coba seperti pembiusan agar didapatkan serum dalam jumlah banyak.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K. dan Lichtman, A. H. 1991. *Cellular dan Molecular Immunology; Updated Edition*. Cina. Elsevier Inc.
- Alegria, O.M , M.Royer, M.Bousalem, M.Chatenet, M.Peterschmitt, Girard dan P.Rott. 2002. Genetic diversity in the coat protein coding region of eighty-six sugarcane mosaic virus isolates from eight countries, particularly from Cameroon and Congo. *Journal of Virology*. 148: 357-372.
- Bailey, Graham S. 1996. *The Protein Protocols*. New Jersey: Humana Press.
- Bratawidjaja,K.R dan Rengganis,I. 2014. *Imunologi Dasar*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Campbell, Neil, A., Jane B.Reece dan Lawrence G.Mitchell. 2004. *Biologi Edisi ke-5 Jilid 3*. Jakarta: Erlangga.
- Comstock,J.C dan R.A Gilbert.2009. *Sugarcane Mosaic Virus Disease*.Florida:University of Florida.
- Clark, D.P dan Pazdernik, N. J. 2009. *Biotechnology: Applying the Genetic Revolution*. USA:Elsevier Inc.
- Crowter,J.R. 1995. *ELISA:Theory and Practice*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Dunbar, B.S dan Schwobel, E.D. 1990. Preparation of Polyclonal Antibodies. In M.P Deutscher. *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*.California:Academic Press Inc.
- Duriat, A.S. 1979. Pengaruh tobacco mosaic virus pada beberapa varietas tomat dalam masalah dan pengendalian penyakit tanaman pertanian Indonesia.*PFI Bogor*:124-129.
- Dsmz. 2016. *Plant Virus Diagnostics*. <https://www.dsmz.de>. (Diakses pada 12 Febuari 2017).
- Ehrenstein,R. Michael dan Clare A.Notley.2010.The importance of natural IgM:scavenger, protector,dan regulator. *Nature Journal*.10:778-786.
- Goldsby,R.A.,Kindt,T.J.,Osborne,B.A.2000. *Immunology 4th Edition*. New York: W.H.Freeman and Company.
- Grisham, MP. 2000. *A guide to sugarcane disease*. New Jersey: Montpellier.

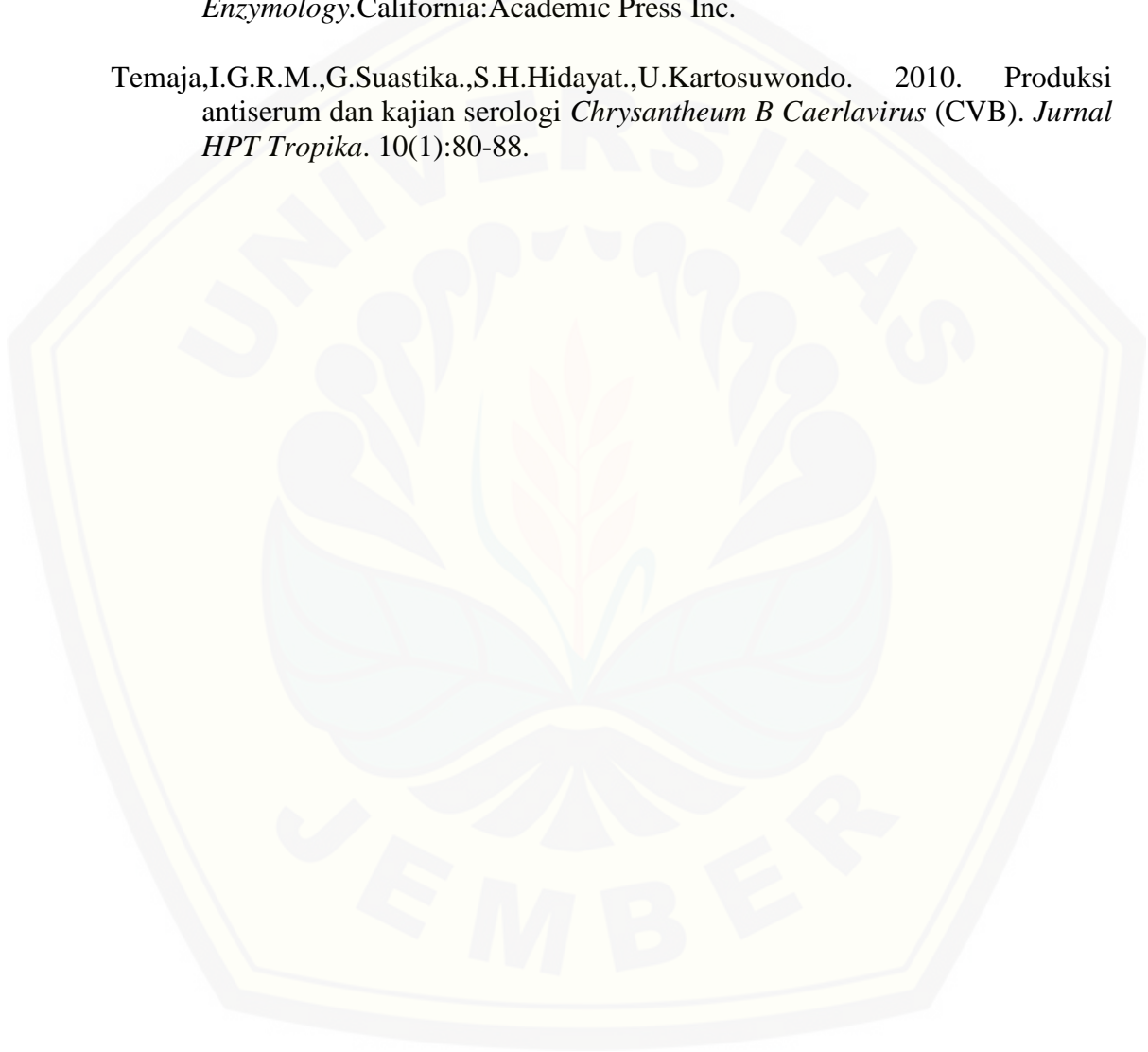
- Hanly, W. Carey., James E. Arthwohl, dan B. Taylor Bennett. 1995. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal*. 37(3):93-118.
- Hendriksen C, Hau J. 2003. Production of polyclonal dan monoclonal antibodies. In: Book of Laboratory Animal Science. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press LLC.
- Harlow dan Lane D. 1999. *Using Antibodies. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartono, E. 2002. *Analisa Trend Produksi, Konsumsi, dan Impor Gula Indonesia*. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Huttinga, H. 1973. Properties of viruses of the potyvirus group. 1. A simple method to purify bean yellow mosaic virus, pea mosaic virus, lettuce mosaic virus and potato virus Y. *Journal P. Path.* 79:125-129.
- Kresno, S.B. 1984. *Imunologi: Diagnosis dan Prosedur*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Kumari, S.G., Makkouk, K.M., Attar, N. 2006. An improved antiserum for sensitive serologic detection of chickpea chlorotic dwarf virus. *Journal Phytopathology*. 154:129-133.
- Kunckel, J.G. 1988. *Immunological Techniques in Insect Biology*. New York: W.H. Freeman and Company.
- Leenaars, M., Hendriksen, C. 2005. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies. *ILAR Journal*. 46(3):269-279.
- Lipman, N., Jackson, L., Trudel, L., Weis Garcia . 2005. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing, characteristic, application, and information resources. *ILAR Journal*. 3:258-268.
- Lowry, Oliver H., Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr dan Rose J. R. Danall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biol. Chem.* 193:265-275.
- Rojas, R dan Gerard A. 2002. Immunoglobulin Transport a Cross Polarized Epithelial Cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3:944-956.
- Sherwood, Lauralee. 2001. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

Sankaran , Ashish Mishra, Reza Ehsani. 2010. A review of advanced techniques for detecting plant diseases. *Journal of Computers and Electronics in Agriculture*. 72:1-13.

Stryer, Lubert. 1995. *Biokimia*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.

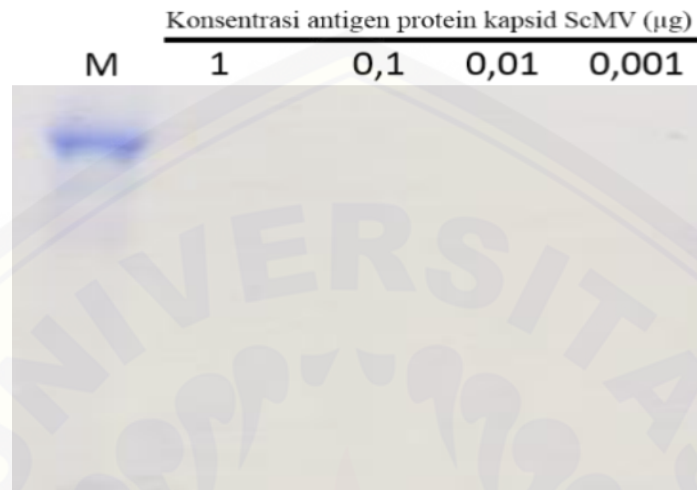
Timmons,T.M danDunbar, B.S. 1990. Protein Blotting dan Immunodetection. In M.P Deutscher. *Guide to Protein Purification. Methods in Enzymology*.California:Academic Press Inc.

Temaja,I.G.R.M.,G.Suastika.,S.H.Hidayat.,U.Kartosuwondo. 2010. Produksi antiserum dan kajian serologi *Chrysantheum B Caerlavirus* (CVB). *Jurnal HPT Tropika*. 10(1):80-88.



LAMPIRAN

1. Gambar sisa gel SDS-PAGE hasil transfer Western Blotting pada serum pre-imun (4.2 A)



2. Gambar pengambilan serum darah kelinci (a) dan injeksi antigen protein kapsid SCMV (b)



(a)

(b)