

IMMUNOGENESITY OF SPESIFIC PROTEIN MOLECULAR WEIGHT 16 KDa (PS16) LEAF OF SIAM CITRUS INFECTED BY CITRUS VEIN PHLOEM DEGENERATION (CVPD) DISEASE

Made Sritamin*, Aulanni 'am**, IGP. Wirawan*, dan Liliek Sulistyowati***

* Depart.of Plant Protection, Faculty Agriculture of Udayana University

** Depart.of Biochemistry, Mathematic and Natural Science Faculty of Brawijaya University

*** Depart. of Plant Protection, Faculty Agriculture of Brawijaya University

ABSTRACT

*Citrus Vein Phloem degeneration (CVPD) is an important citrus disese, which damaged citrus plantation and causing decrease of citrus production. In Indonesia, the CVPD disease caused by **Liberobacter asiaticum** bacteri and the disease spread out by vectir insect **Diaphorina citri** and using infected bud in wood grafting. In infected citrus plant, two specific protein molecules with molecular weigt 16 kDa and 66 kDa are found. These protein molecules are not found in healthy citrus plant. The immunogenicity of PS16 accumulated on leaf of citrus plant infected by CVPD is known yet. The research material were leaves of citrus plant infected CVPD, leaves of healthy citrus plant and reagent used these research are for isolation of the total protein leaf of citrus plant, SDS-PAGE electroforesis, electroelution of PS16, ELISA Methods, Dot-Blot Method, anti-PS16 as aprimery antibody and secondary antibody is anti-Rabbit IgG Conjugated AP. The result of the research showed that of PS16 accumulated on leaf of citrus plant infected CVPD has immunogenic character. It is indicated by increase of the titer anti-PS16 after first immunization ang 2nd booster by indirect ELISA method and can be used to induce antibody (anti-PS16) and so showed that positive reaction between PS16 with anti-PS16. It is indicated by purples dark blue on cellulose membrane by Dot Blot method.*

Key words: antigen, antibody, anti- PS16, CVPD, Dot Blot, Indirect ELISA, PS16

PENGANTAR

Penyakit *Citrus Vein Phloem Degeneration* (CVPD) adalah merupakan penyakit yang sangat merugikan pada tanaman jeruk dan menimbulkan kerusakan pada tanaman, bahkan pada tanaman yang terserang berat dapat mengakibatkan kehilangan hasil dan dapat mematikan tanaman dalam waktu 1–2 tahun. Penyakit CVPD disebabkan oleh bakteri *Liberobacter asiaticum* (Garnier *et al.*, 2000; da Graca, 1991) dan *Liberobacter africanus* di Afrika (Su, 2001). Gejala serangan penyakit adalah daun menguning atau klorosis (Ohtsu, 1998) dan menyerupai gejala defisiensi mineral (Bove, 1995). Biji banyak yang abortus dan rasa buah menjadi masam (da Graca, 1991).

Penyebaran penyakit ini dapat melalui pembibitan dengan mata tunas yang terinfeksi (Su, 2001) dan melalui serangga vektor *Diaphorina citri* (Su dan Hung, 2001), nimfa *D. citri* tertular patogen ketika mulai menghisap makanan pada tanaman jeruk terinfeksi CVPD (Wijaya, 2003). Bakteri *L. asiaticum* tidak dapat dikultur pada media buatan (Garnier *et al.*, 2000) hal ini merupakan faktor yang menyebabkan mekanisme infeksi penyakit CVPD dan pengendalian secara tepat belum banyak diketahui (Wirawan

et al., 2004). Pada tanaman yang terinfeksi ditemukan dua molekul protein dengan berat molekul 16 kDa dan 66 kDa, pada tanaman sehat kedua molekul protein tersebut tidak ada. Peran dan sumber protein tersebut sampai saat ini belum diketahui. Untuk itu dipilihnya teknologi biologi molekuler khususnya DNA dan protein sebagai alternatif untuk mengatasi kendala tersebut. Teknologi isolasi DNA dan protein pada dasarnya meliputi teknologi isolasi DNA atau gen dan isolasi protein kemudian mengevaluasinya. Melalui pendekatan biologi molekuler dapat dikaji secara menyeluruh tentang DNA dan protein dalam organisme tersebut yang terlibat dalam mekanisme interaksi suatu patogen dengan tanaman inangnya (Sulistyowati, 2003).

Untuk mengetahui keberadaan bakteri *L. asiaticum* dalam jaringan dapat dideteksi menggunakan antibodi bakteri tersebut (Garnier, *et al.*, 1987) dan dengan DNA pelacak dengan teknik Dot-Blot hibridisasi (Ohtsu, *et al.*, 2002).

Dalam penelitian ini dikaji tentang karakterisasi PS16 dari daun jeruk siam terinfeksi penyakit CVPD khususnya sifat imunogeniknya dan uji imunogenitas antibodi hasil induksi dari PS16 daun jeruk terinfeksi CVPD dengan metode Dot-Blot

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun jeruk sehat dan daun jeruk terinfeksi CVPD yang sebelumnya telah dideteksi dengan teknik PCR, dan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*). Reagen kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah Tris HCl, *Sodium Dodecyl Phosphate* (SDS), glisin, Amonium Persulphate (APS) N1,N1,N1,N1-*Tetra methyl Diamine* (TEMED), NaCl, *Ethylene Diamine Tetra Acetic acid* (EDTA), Mercapto etanol 2%, *Dithiothreitol* (DTT), *Aquabidest*, gliserol, bromofenol blue, *Comassie Brilliant Blue R-250* (CBB-R 250), metanol absolut, asam acetat glasial, akrilamida bisokrilamida, etanol, acetone, Na₂HPO₄, CuSO₄, Bovine s Berum a Albumin (BSA), Amonium sulfat 50%, NaOH, *Cetil trimethyl Ammonium Bromide* (CTAB), *Phenyl Methyl Sulfonyl Flouride* (PMSF), *Trichloro acetic acid* (TCA), Agarose 1%, *Ethyidium Bromide* (EtBr), Nitrogen cair dan alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: seperangkat alat *Polymerase Chain Reaction* (PCR), seperangkat alat elektroforesis DNA, seperangkat alat elektroforesis protein UV-transilluminator, kamera Polaroid, *Enzyme Linked Sorbent Assay* (ELISA) reader dan alat Dot Bloter.

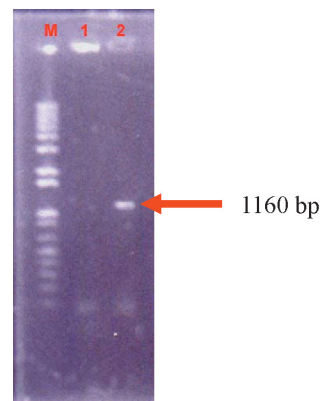
Cara Kerja

Konfirmasi penyakit CVPD pada tanaman jeruk dilakukan dengan metode PCR dan isolasi protein total daun jeruk menurut metode yang dilakukan oleh Stacy dan Aalen, (2003) yaitu 0,1 gram ditambah 500 µl buffer ekstrak untuk isolasi daun jeruk (0,1 M Tris HCl; 0,5 M NaCl; 5 mM DTT; 5 mM EDTA dan *Aquabidest*) dihaluskan ditambah PMSF, diinkubasi 1 jam pada suhu 4 °C, selanjutnya disentrifuga 13.000 rpm, 4 °C, selama 5 menit. Supernatant ditambah TCA untuk pengendapan dan disimpan selama 1 jam dalam suhu 20 °C kemudian sentrifuga 13.000 rpm, pada suhu 4 °C selama 5 menit. Pellet dicuci dengan acetone dan dikeringanginkan kemudian pellet ditambah *aquabidest* 10 µl, larutan ini merupakan protein yang siap untuk dielektroforesis. Selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan SDS-PAGE. Dari hasil SDS-PAGE PS16 diisolasi dari gel untuk kemudian dielektroelusi menurut metode Aulanni'am (2005). Kadar PS16 terelusi diukur kadar proteinnya dengan spektrofotometer UV-VIS pada panjang gelombang standar *Bovim Serum Albumin* (BSA) yaitu pada λ 540 nm. PS16 hasil elektroelusi digunakan sebagai bahan biosintesis antibodi (anti-PS16) pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*)

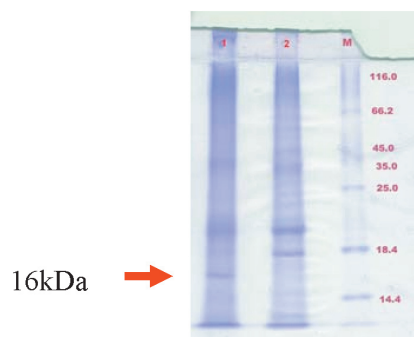
Untuk mengetahui sifat imunogenik dari Anti-PS16 yang diperoleh dari serum tikus putih, diuji nilai titernya dengan metode *indirect* ELISA menggunakan ELISA reader dan uji spesifitas anti-PS16 menggunakan metode Dot-Blot (Aulanni'am, 2005).

HASIL

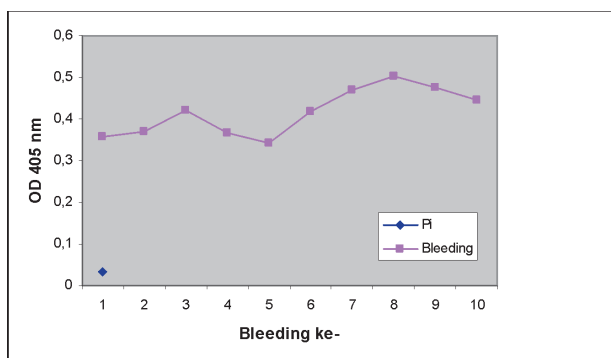
Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tanaman jeruk terinfeksi CVPD yang terlebih dahulu telah dideteksi melalui metode PCR bahwa tanaman telah terinfeksi yaitu adanya pita DNA pada ukuran 1160 bp setelah amplifikasi 16S rDNA bakteri CVPD dengan PCR ditunjukkan pada Gambar 1.



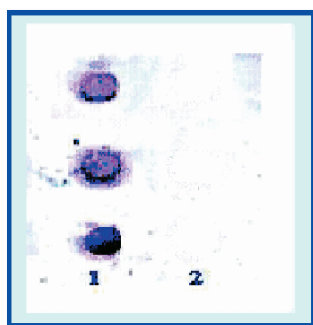
Gambar 1. Hasil amplifikasi DNA daun jeruk dengan PCR
Keterangan: M = Marker, kolom 1 adalah daun sehat dan kolom 2 adalah daun sakit. Tanda panah → adalah pita DNA



Gambar 2. Profil protein daun jeruk sehat dan daun jeruk terinfeksi CVPD
Keterangan: kolom 1 adalah pita protein daun jeruk terinfeksi, kolom 2 adalah pita protein daun jeruk sehat, M adalah Marker, tanda panah → adalah protein spesifik BM 16 kDa (PS16)



Gambar 3. Profil titer anti PS16 hasil induksi PS16 dari jeruk siam terinfeksi CVPD pada 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*)



Gambar 4. Uji imunogenitas anti-PS16 terhadap PS16 daun jeruk

Hasil isolasi total protein seperti yang disajikan pada Gambar 2 yaitu profil protein daun jeruk sehat dan daun jeruk terinfeksi CVPD.

Uji titer antibodi anti PS16 dengan metode ELISA yang diukur dengan ELISA-reader pada 405 nm seperti pada Gambar 3.

Uji imunogenitas anti-PS16 terhadap PS16 daun jeruk terinfeksi CVPD disajikan pada Gambar 4.

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian ini konfirmasi bahwa pada tanaman jeruk terinfeksi penyakit CVPD ditemukan pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR pada ukuran 1160 bp yang merupakan DNA bakteri CVPD, yaitu pada Gambar 1 kolom 2 sedangkan pada tanaman sehat tidak ada pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR. Pada Gambar 2 kolom 1 adalah sampel dari daun tanaman jeruk terinfeksi CVPD terdapat pita protein pada berat molekul 16 kDa, ini berarti bahwa pada tanaman terinfeksi CVPD terakumulasi PS16, namun pita tersebut tidak muncul pada tanaman jeruk sehat pada Gambar 2 kolom 2. Hasil penelitian ini sesuai dengan

pernyataan Wirawan *et al.* (2004) dan Marhaeni (2003) bahwa pada tanaman jeruk terinfeksi CVPD terakumulasi protein spesifik dengan berat molekul 16 kDa. Hasil isolasi PS16 dari SDS-PAGE dan selanjutnya melalui elektroelusi PS16 tersebut dan berdasarkan persamaan regresi dari kurva absorbansi Bovin Serum Albumin (BSA) didapatkan nilai rata-rata kadar protein PS16 adalah 1646,66 $\mu\text{g/ml}$. Hasil kadar protein ini sudah memenuhi syarat untuk diinjeksikan pada tikus yaitu untuk tiap imunisasi diinjeksikan 25–100 $\mu\text{g/ml}$ (Ausubel *et al.*, 1992).

Uji titer antibodi anti-PS16 yang diukur dengan ELISA-reader menunjukkan bahwa titer meningkat dari *bleeding* pertama sampai ketiga dan menurun sampai *bleeding* kelima dan sehari setelah *bleeding* kelima dilakukan *booster* kedua dan hasilnya menunjukkan adanya kenaikan nilai titer dan mencapai nilai titer optimal pada *bleeding* kedelapan. Hal ini disebabkan karena sudah ada memori sebelumnya yaitu setelah imunisasi pertama yaitu telah mengenali antigen (PS16) (Herscowits, 1994), hasil ini seperti disajikan pada Gambar 3. Pada *bleeding* ke-9 mulai menurun sampai *bleeding* ke-10 namun nilai titernya masih lebih tinggi dari *bleeding* kelima. Ini berarti bahwa PS16 yang diinjeksikan ke dalam tubuh hewan coba telah mampu menginduksi antibodi (anti-PS16). Hasil uji imunogenitas anti-PS16 terhadap PS16 pada Gambar 4 menunjukkan bahwa antara anti-PS16 dengan PS16 terjadi reaksi positif yang ditandai dengan terbentuknya noda biru keunguan pada kertas membran *nitrocelulosa* (Eaton, 1994) yang berarti anti-PS16 sebagai antibodi primer dan setelah diinkubasi dengan anti-rabbit IgG *conjugated* AP sebagai antibodi sekunder dapat mengenali PS16.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa PS16 adalah bersifat imunogenik, hasil ini didukung oleh kadar protein dan berat molekul yang dimiliki oleh PS16 telah memenuhi syarat sebagai imunogen. Kadar protein yang dimiliki oleh PS16 yang terakumulasi pada tanaman jeruk siam terinfeksi CVPD adalah 1646,66 $\mu\text{g/ml}$ dan dapat dipakai sebagai imunogen untuk menginduksi antibodi

Untuk mengetahui peran dan dari mana asal PS16 yang terakumulasi pada tanaman jeruk siam terinfeksi CVPD perlu dikaji lebih lanjut.

KEPUSTAKAAN

- Aulanni'am. 2005. Protein dan Analisisnya. Citra Mentari Group. Malang. 65145.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Mppre DD, Seldman JG, Smith JA, dan Struhl K, 1992. Sort Protocols in Molecular Biology. 2nd ed. John Willey & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore.

- Bove JM, 1995. Virus and Virus Like Disease of Citrus in the Near Region. Italy, FAO.
- Da Graca JV, 1991. Citrus Greening disease. *Annu Rev Phytopathol.* 29: 109–136.
- Eaton B, 1994. New Tools for diagnosing diseases *in Gen at Work.* Biotechnology. Ed Phil Larkin. CSIRO, Australia.
- Garnier M, Martin-Gros G, dan Bove JM, 1987. Monoclonal Antibodies against the bacterial-like organism associated with Citrus Greening disease. *Ann Inst Pasteur/microbiol.* 138: 639–650.
- Garnier M, Jagoueix S, Cronje PR, Le Roux HF, Bove JM, 2000. Genomic Characterization of a *Liberobacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*. In the Western Cape Province of South Africa. Proposal a Candidatus *Liberobacter africanum*, Subsp. Capensis. *Int. J. of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 50: 2119–2125.
- Herscovitz H, 1994. Imunofisiologi: Fungsi Sel dan Interaksi Seluler dalam Pembentukan Antibodi. Dalam Imunologi III ed. Joseph A. Bellanti. Penerjemah: A Samik Wahab. Gadjah Mada University Press.
- Marhaeni JK, 2003. Analisis Protein Tanaman Jeruk (*Citrus Spp*) terserang penyakit CVPD (Citrus Vein Phloem Degeneration). Thesis Program Pascasarjana Universitas Udayana, Denpasar.
- Ohtsu Y, 1998. Recent Progress on Citrus Greening Research in Asia Including of Banana and Citrus Through the Use of Disease – Free Planting. Material Held in Davao City, Philippines. 14–10 Oct. P. 57–61.
- Ohtsu Y, Prommintara M, Okuda S, Goto T, Kano T, Nakashima K, Koizumi M, Imada J, dan Kawashima K, 2002. Partial Purification of Thai Isolate of Citrus Huanglongbing (Greening) Bacterium and Antiserum Production for Serological Diagnosis. *J. Gen. Plant Pathol.* 63: 372–377.
- Stacy R dan Aalen R, 2003. Isolation of Total Protein. <http://biologi.u10.no/molbiol/protocol/protein.htm>. diakses 12 juli 2003.
- Su H-J, 2001 Citrus Greening Disease. Plant Protection. No. 2001–2.
- Su HJ dan Hung TH, 2001 Detection of Greening Fastidiosa Bacteria (GFB) Causing Citrus Greening by Dot Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction (PCR) with DNA probes Plant Protection. No. 2001–7.
- Sulistiyowati L, 2003. Pemanfaatan Teknologi Molekuler dan Pengelolaan Penyakit Tanaman. Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia, Bandung, 6–8 Agustus.
- Wijaya N, 2003. *Diaphorina citri* KUH (Homoptera: Psyllidae): Bioteknologi dan Peranannya Sebagai Vektor Penyakit CVPD (*Citrus Vein Phloem Degeneration*) pada Tanaman Jeruk "Siem". Disertasi Program Pascasarjana IPB.
- Wirawan IGP, Sulistyowati L, dan Wijaya N, 2004 Penyakit CVPD pada Tanaman Jeruk Analisis Baru Berbasis Bioteknologi. Udayana University Press, 139.

Reviewer: **Prof. Dr. Sukarti Mulyopawiro**