

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**PENGEMBANGAN METODE IMUNODIAGNOSIS PENYAKIT
MOSAIK TEBU MENGGUNAKAN ANTIBODI UNTUK
REKOMBINAN PROTEIN KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS***



OLEH :

N U R M A L A S A R I

NIM : 081417027315

PROGRAM STUDI S3 MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI

UNIVERSITAS AIRLANGGA

SURABAYA

2017

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

DISERTASI

**PENGEMBANGAN METODE IMUNODIAGNOSIS PENYAKIT
MOSAIK TEBU MENGGUNAKAN ANTIBODI UNTUK
REKOMBINAN PROTEIN KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS***



OLEH :

**NURMALASARI
NIM : 081141019**

**PROGRAM STUDI S3 MATEMATIKA DAN ILMU
PENGETAHUAN ALAM
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
SURABAYA
2017**

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

**PENGEMBANGAN METODE IMUNODIAGNOSIS PENYAKIT
MOSAIK TEBU MENGGUNAKAN ANTIBODI UNTUK
REKOMBINAN PROTEIN KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS***

DISERTASI

**Untuk memperoleh GELAR Doktor pada
Program Studi S3 MIPA Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga**

OLEH :

**NURMALASARI
NIM : 081141019**

**PROGRAM STUDI S3 MATEMATIKA DAN ILMU
PENGETAHUAN ALAM
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
SURABAYA
2017**

Lembar Pengesahan

**DISERTASI TELAH DIUJI
PADA TANGGAL : 11 Agustus 2017**

Oleh :

Promotor



Prof. Win Darmanto, Ph.D
NIP: 196106161987011001

Ko Promotor



Prof. Bambang Sugiharto, Ph.D
NIP: 195510221982121001

Mengetahui
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga, Surabaya



Prof. Win Darmanto, Ph.D
NIP: 196106161987011001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai
oleh panitia penguji ujian tertutup pada
Program Studi S3 MIPA Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Airlangga Surabaya**

Pada tanggal : 11 Agustus 2017

Panitia Penguji,

Ketua : Dr. Edy Setiti Wida Utami, M.Si

Penguji :

- 1. Prof. Win Darmanto, Ph.D**
- 2. Prof. Bambang Sugiharto, Ph.D**
- 3. Dr. Alfiah Hayati, M.Si**
- 4. Dr. Sri Puji Astuti W., M.Si**
- 5. Dr. Sri Sumarsih, M.Si**
- 6. Dr. Ir. Popy Hartatie Hardjo, M.Si**

Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga
tentang Panitia Penguji Disertasi
Nomor : 4910/UN3.1.8/KD/2017
Tanggal 7 Agustus 2017

DAFTAR ISI

Halaman JUDUL	ii
Halaman PENGESAHAN	iii
Halaman DAFTAR ISI	v
Halaman PRAKATA	viii
Halaman UCAPAN TERIMA KASIH	ix
Halaman DAFTAR GAMBAR	xi
Halaman DAFTAR TABEL	xiii
Halaman DAFTAR LAMPIRAN	xiv
Halaman DAFTAR SINGKATAN	xv
Halaman INTISARI	xvii
Halaman ABSTRACT	xviii
BAB I. PENGANTAR	
1.1 Latar belakang masalah	1
1.2 Rumusan masalah	3
1.3 Tujuan penelitian	3
1.4 Manfaat penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Sugarcane Mosaic Virus	5
2.1.1 Organisasi genom dan replikasi virus.....	6
2.1.2 Penyakit mosaik tebu.....	9
2.2 Kloning Gen	10
2.2.1 Kloning dengan pustaka DNA	11
2.2.2 Kloning dengan produk PCR	11
2.3 Plasmid sebagai vektor DNA	12
2.3.1 Vektor kloning dan ekspresi	12
2.3.2 Transformasi pada sel bakteri	14
2.4 Antibodi	15
2.4.1 Struktur dan reaktifitas antibodi	15
2.4.2 Produksi protein rekombinan dan pembuatan antibodi poliklonal	17

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

2.5 Diagnosis penyakit virus tanaman	20
BAB III. HIPOTESIS DAN KONSEP ILMIAH	
3.1 Kerangka konsep ilmiah	22
3.2 Hipotesis	24
BAB IV. METODE PENELITIAN	
4.1 Jenis penelitian	26
4.2 Kerangka operasional penelitian	28
4.3 Bahan penelitian	27
4.3.1. Bahan kimia	27
4.3.2. Varietas tebu	29
4.3.1. Strain bakteri Escherichia coli	29
4.3.2. Hewan untuk pembuatan antibodi poliklonal PK-SCMV	29
4.4. Alat penelitian	29
4.5. Pelaksanaan penelitian	29
4.5.1. Penentuan sampel tebu bergejala penyakit mosaik untuk memperoleh sumber gen PK-SCMV	29
4.5.2. Analisa molekuler sampel tebu bergejala penyakit mosaik metode RT-PCR	30
4.5.3. Kloning molekuler gen PK-SCMV	32
4.5.4. Induksi, ekstraksi dan purifikasi protein rekombinan PK-SCMV	34
4.5.5. Pembuatan antibodi poliklonal PK-SCMV	37
4.5.6. Uji spesifitas antibodi dengan metode AGPT, Western blot dan ELISA	39
4.5.7. Pengembangan metode Indirect Elisa	41
BAB V. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
5.1. Penentuan sampel tebu bergejala penyakit mosaik untuk memperoleh sumber gen PK-SCMV	43
5.2. Analisa molekuler sampel tebu metode RT-PCR	46
5.3. Kloning molekuler gen PK-SCMV	50
5.4. Induksi, ekstraksi dan purifikasi rekombinan PK-SCMV	55

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

5.5. Pembuatan antibodi poliklonal PK-SCMV	60
5.6. Pengembangan metode Indirect Elisa	66
BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN	
6.1. Kesimpulan	70
6.2. Saran	70
DAFTAR PUSTAKA	71
LAMPIRAN	78

PRAKATA

Ucapan syukur atas berkah dan rahmatNya sehingga penelitian dan penulisan disertasi yang berjudul “Pengembangan metode imunodiagnosis penyakit mosaik tebu menggunakan antibodi untuk rekombinan protein kapsid *Sugarcane Mosaic Virus*” ini dapat diselesaikan. Topik penelitian ini menarik minat penulis karena saat ini teknologi biologi molekuler banyak diperlukan untuk penanganan cepat penyakit tanaman di lapang. Dengan berkembangnya biologi molekuler tentang metode deteksi penyakit virus yang cepat dan akurat, membuka wacana metode imunodiagnosis secara molekuler. Melalui imunodiagnosis secara molekuler, dapat diperoleh metode deteksi penyakit virus yang cepat, akurat dan spesifik sehingga penanganan dan pengendalian penyakit dapat segera dilaksanakan dengan tepat dibandingkan dengan deteksi secara visual yang hanya mengandalkan gejala fisik di daun. Dari penelitian ini, penulis berharap dapat memperoleh banyak pengetahuan, ilmu, ketrampilan dan teknik laboratorium maupun dalam berpikir logis dan analisis, dan banyak hal lainnya yang sangat bermanfaat dalam pengembangan profesi penulis sebagai peneliti sekaligus praktisi perkebunan. Disamping itu penulis juga berharap hasil penelitian ini memberikan sumbangan pemikiran ilmiah yang bermanfaat bagi para peneliti di bidang fitopatologi molekuler, khususnya tebu.

Penelitian disertasi ini didanai oleh PT Perkebunan Nusantara XI (PTPN XI), Hibah Insentif Riset Sinas Universitas Jember 2014-2016 (a/n Prof Bambang Sugiharto) dan Hibah Penelitian Kompetisi Perguruan Tinggi Universitas Airlangga 2016 (a/n Prof Win Darmanto). Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Jember, Universitas Airlangga dan pemerintah Indonesia atas pendanaan penelitian diatas, juga kepada instansi tempat penulis bekerja, PTPN XI, atas kesempatan menempuh pendidikan pasca sarjana yang telah diberikan sehingga dapat mengikuti program Doktor di Universitas Airlangga. Semoga karya ini dapat menjadi pertanggungjawaban yang layak kepada pemerintah dan masyarakat Indonesia, dan terutama kepada Allah Swt yang merupakan sumber dari segalanya.

Surabaya, 5 Agustus 2017

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Disertasi ini tersusun atas berkah dan rahmat Allah Swt, yang telah mengijinkan penulis menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi Program Doktor Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga.

Setiap tahap penyusunan disertasi ini tidak terlepas dari dukungan, bimbingan dan saran dari Prof Win Darmanto, Ph.D selaku Promotor, dan Prof Bambang Sugiharto, Ph.D selaku Ko Promotor, yang dengan lapang hati berkenan membimbing dan memberikan kepercayaan kepada penulis dalam menuntaskan penelitian dan studi, di tengah segala keterbatasan dan hambatan.

Penelitian disertasi dan pendidikan program doktor ini juga tidak dapat terselesaikan tanpa bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu pada kesempatan ini penulis menghaturkan ucapan terima kasih dan penghargaan yang tinggi kepada :

1. Prof Win Darmanto, Ph.D selaku Promotor dan Prof Bambang Sugiharto, Ph.D selaku Ko Promotor yang telah meluangkan waktu berharga mereka, dengan penuh kesabaran dan integritas telah membimbing penelitian dan penulisan disertasi penulis.
2. Prof Bambang Sugiharto, Ph.D yang telah memberikan kepercayaan kepada penulis untuk menjadi bagian dari riset berkelanjutan penyakit mosaik tebu, serta atas dukungan dana dan fasilitas penelitian, dukungan semangat dan motivasi maupun diskusi keilmuan yang tidak terputus meskipun terkendala jarak dan kesibukan.
3. Dr Alfiah Hayati, M.Si; Dr Dwi Winarni, M.Si; Dr Sri Sumarsih, M.Si sebagai para penguji pada ujian kualifikasi, proposal disertasi, kelayakan, tertutup dan terbuka, yang telah memberi masukan, saran dan koreksi dalam penyusunan proposal disertasi, penyelesaian penelitian dan perbaikan naskah disertasi.
4. Rektor Universitas Airlangga, Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi dan Ketua Program Studi S3 Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, para staf pengajar dan para staf administrasi atas bantuan, kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan pada program doktor.
5. Para dosen Program Studi S3 MIPA Fakultas Sains dan Teknologi atas perluasan wawasan keilmuan sesuai bidang kepakaran masing-masing.

6. Direksi dan Para Kepala Divisi terkait di PT Perkebunan Nusantara XI, atas ijin dan kesempatan memperdalam keilmuan, melaksanakan penelitian dan mengaplikasikan hasil penelitian di kalangan stake holder PTPN XI.
7. Ketua CDAST (Center of Development and Applied Science Technology) Universitas Jember, Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga dan Dekan Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya, atas ijin dan kesempatan melaksanakan penelitian dan menggunakan fasilitas penelitian serta bantuan teknis dan laboran yang penuh dedikasi.
8. Rekan-rekan kerja yang terlibat dalam proyek penelitian ini, para peneliti dan teknis di Laboratorium Bioteknologi PTPN XI serta para mahasiswa dan teknis di CDAST Universitas Jember atas bantuan, dukungan dan kerjasama yang penuh semangat.
9. Kakakku, Sitasari Darsono dan adikku, Adi Noertjahjo, ibunda tercinta dan ibu mertua, serta seluruh keluarga besar yang senantiasa memberikan dukungan doa dan semangat bagi penulis untuk segera menyelesaikan studi.
10. Inspirasiku, almarhum ayah, Darsono Ariadi dan almarhum kakak, Puspitasari Darsono, yang telah memberiku kasih sayang yang menginspirasi.
11. Suamiku tercinta, Doni Hendrawan Setijanto, serta putra putri kami, Mazaya Zahrina dan Radifan Darari, atas doa, kasih sayang, pengorbanan, perhatian dan pengertian yang tidak terhingga kepada penulis selama menyelesaikan studi.
12. Semua pihak yang berperan dalam penyelesaian penelitian maupun pendidikan program S3 yang tidak dapat disebutkan satu persatu dalam bagian ini.

Secara keseluruhan naskah ini masih jauh dari sempurna, sehingga saran dan masukan dari para pembaca sangat diharapkan untuk perbaikan naskah disertasi maupun karya-karya kelompok penelitian kami di masa mendatang.

Surabaya, 5 Agustus 2017

Penulis

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1. Virus golongan potyvirus (visualisasi elektron mikroskop).....	5
Gambar 2.2. (A) Struktur virus mosaik	6
(B) Molekul virus berbentuk filamen	6
Gambar 2.3. Organisasi genom potyvirus	7
Gambar 2.4. Pola replikasi ss(+) RNA	9
Gambar 2.5. (A) Daun tebu sehat	10
(B) Daun tebu terserang mosaik	10
Gambar 2.6. Plasmid kloning pJET1.2	13
Gambar 2.7. Plasmid pET-28a untuk vektor ekspresi bakteri	14
Gambar 2.8. Struktur dasar molekul antibodi	16
Gambar 2.9. Prinsip produksi antibodi poliklonal pada mamalia	20
Gambar 2.10. Model ikatan antigen antibodi pada metode ELISA	21
Gambar 3.1.1. Kerangka konseptual penelitian	25
Gambar 4.1. Kerangka operasional penelitian	28
Gambar 5.1. Gejala visual tebu terserang penyakit mosaik	44
Gambar 5.2. Perbandingan corak mosaik tebu yang ditulari virus mosaik	45
Gambar 5.3. Hasil RT-PCR sampel tebu bergejala mosaik	46
Gambar 5.4. Hasil peruntutan nukleotida sampel tebu Ps 881	47
Gambar 5.5. Pohon filogenetik SCMV isolat Jember	49
Gambar 5.6. Hasil PCR dengan primer gen lengkap PK-SCMV	51
Gambar 5.7. Peta vektor plasmid pJET1.2	51
Gambar 5.8. Hasil PCR koloni <i>E.coli</i> DH5 α transforman dengan primer gen lengkap PK-SCMV	52
Gambar 5.9. Hasil PCR koloni <i>E.coli</i> DH5 α transforman dengan primer daerah lestari gen PK-SCMV	53
Gambar 5.10. Hasil PCR koloni <i>E.coli</i> BL21 transforman	53

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

Gambar 5.11.	Hasil perunutan nukleotida 925 pb dalam vektor pET-28a	54
Gambar 5.12.	Hasil analisa SDS PAGE, ekspresi rekombinan PK-SCMV yang diinduksi IPTG	56
Gambar 5.13.	Peta konstruksi vektor ekspresi pET-28a dengan sisipan gen daerah lestari PK-SCMV	57
Gambar 5.14.	Hasil analisa SDS PAGE, ekspresi rekombinan PK-SCMV pada berbagai perlakuan <i>inducer</i> IPTG	58
Gambar 5.15.	Hasil analisa SDS PAGE, rekombinan PK-SCMV yang dipurifikasi dengan kromatografi afinitas	59
Gambar 5.16.	Hasil analisa SDS PAGE, rekombinan PK-SCMV yang dipurifikasi secara elektro elusi	60
Gambar 5.17.	Hasil analisa SDS PAGE, rekombinan PK-SCMV yang dipekatkan	60
Gambar 5.18.	Hasil uji AGPT antibodi kelinci jantan dan betina	61
Gambar 5.19.	Hasil uji AGPT dan aglutinasi langsung antibodi ayam kampung	62
Gambar 5.20.	Hasil uji western blot antibodi kelinci jantan dan betina	63
Gambar 5.21.	Hasil uji western blot antibodi ayam kampung	64
Gambar 5.22.	Hasil uji western blot antibodi kelinci betina dan ayam kampung dengan antigen dari cairan daun	65

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1. Jadwal imunisasi hewan kelinci	37
Tabel 4.2. Jadwal imunisasi hewan ayam kampung	37
Tabel 5.1. Tingkat kejadian penyakit mosaik tebu di Kebun Bibit Nenek wilayah kerja PT Perkebunan Nusantara XI	43
Tabel 5.2. Urutan homologi dari perbandingan SCMV isolat Jember dengan 15 isolat kerabat dekat	48
Tabel 5.3. Rekapitulasi hasil uji AGPT dan aglutinasi langsung pada hewan kelinci dan ayam kampung	62
Tabel 5.4. Hasil pembacaan absorbansi Indirect Elisa dengan sampel yang disolubelisasi	66
Tabel 5.5. Hasil pembacaan absorbansi Indirect Elisa dengan sampel tanpa solubelisasi	66
Tabel 5.6. Hasil pembacaan absorbansi Indirect Elisa dengan metode modifikasi Gulathi-Sakhuja <i>et al.</i> ,2009	68

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pembuatan berbagai reagen kimia	74
Lampiran 2. Kurva standar BSA (metode Lowry)	77
Lampiran 3. Kurva standar BSA (metode Bradford)	78

DAFTAR SINGKATAN

Istilah/Singkatan	Kepanjangan/Definisi singkatan
6x-HisTag	: <i>6x histidin tagging</i>
AGPT	: <i>agar gel precipitation test</i>
AP	: <i>alkaline phosphatase</i>
BLAST	: <i>basic local alignment search tool</i>
BSA	: <i>bovine serum albumin</i>
CBB	: <i>coomassie brilliant blue</i>
cDNA	: <i>complementary deoxyribose nucleic acid</i>
DAS ELISA	: <i>double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay</i>
DNA	: <i>deoxyribose nucleic acid</i>
DTT	: <i>dithiothreitol</i>
EDTA	: <i>ethylene diamine tetra acetic acid</i>
ELISA	: <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
KBN	: Kebun Bibit Nenek
kDa	: kilo Dalton
LB	: Luria Bertani
IgG	: <i>immunoglobulin G</i>
IPTG	: <i>isopropylthiogalactosidase</i>
MCS	: <i>multiple cloning site</i>
Ni-NTA	: <i>nickel nitriloacetic</i>
nos	: <i>nopaline synthase</i>
OD	: <i>optical density</i>
pb	: pasangan basa
PBS	: <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
PK-SCMV	: protein kapsid Sugarcane Mosaic Virus
PVP	: <i>polyvinylpyrrolidone</i>
rpm	: <i>rotation per minutes</i>
RT-PCR	: <i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

SDS	: <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TBS	: <i>Tris Buffer Saline</i>
YTA	: <i>yeast tryptone agar</i>

INTISARI

**PENGEMBANGAN METODE IMUNODIAGNOSIS PENYAKIT MOSAIK
TEBU MENGGUNAKAN ANTIBODI UNTUK REKOMBINAN PROTEIN
KAPSID *SUGARCANE MOSAIC VIRUS***

Nurmalasari¹, Win Darmanto², dan Bambang Sugiharto³

¹Urusan Penelitian, PT Perkebunan Nusantara XI, Surabaya

²Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya

³Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Jember, Jember

Metode ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) adalah uji serologi yang banyak digunakan untuk deteksi penyakit tanaman karena preparasi sampel mudah, dapat dikerjakan pada laboratorium sederhana dan tidak memerlukan banyak tenaga ahli. Metode deteksi berbasis serologi memanfaatkan kemampuan antibodi, yang dibuat pada hewan coba, dalam mengenali protein tertentu dari virus sasaran. Faktor pembatas metode serologi adalah diperlukan antibodi deteksi yang tidak bereaksi silang dengan protein tanaman. Untuk meningkatkan akurasi deteksi berbasis serologi diperlukan antibodi dengan sensitivitas dan spesifitas tinggi yang diperoleh melalui penggunaan antibodi monoklonal dan antibodi rekombinan. Penelitian ini dimaksudkan untuk memperoleh antibodi poliklonal spesifik untuk uji deteksi cepat penyakit mosaik tebu yang disebabkan oleh *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV).

Penelitian dimulai dengan pencarian sumber gen protein kapsid SCMV (PK-SCMV) dengan melakukan survey di lima wilayah kebun bibit tebu di Jawa Timur. Sampel-sampel daun tebu yang menunjukkan gejala visual penyakit mosaik dianalisa secara molekuler metode RT-PCR. Kloning molekuler diawali dengan mengkloning gen PK-SCMV pada vektor kloning dan inang *E.coli* DH5 α untuk penyimpanan dan memperbanyak sumber gen dan sub kloning pada vektor ekspresi dan inang *E.coli* BL21 untuk memproduksi protein rekombinan. Protein rekombinan digunakan sebagai antigen dalam menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal. Uji spesifitas crude antibodi dilakukan menggunakan metode Agar Gel Precipitation Test (AGPT), aglutinasi langsung dan Western blot. Crude antibodi digunakan untuk pengembangan metode imunodiagnosis melalui metode Indirect ELISA.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa gen PK-SCMV isolat Jember, yang diperoleh dari sampel tebu bergejala penyakit mosaik, dikelompokkan dalam *subgroup* yang berbeda dari *database* SCMV di *Gene Bank*. Gen PK-SCMV mempunyai kekerabatan dengan isolat SCMV dari Argentina, China dan Kamerun. Teknik kloning gen PK-SCMV untuk produksi protein rekombinan menggunakan vektor ekspresi pET-28a dan inang *E.coli* BL21. Rekombinan PK-SCMV dapat menginduksi terbentuknya antibodi poliklonal pada hewan coba yaitu kelinci galur *New Zealand White* jantan dan betina serta ayam kampung betina. Antibodi poliklonal PK-SCMV dari hewan kelinci betina mempunyai sensitivitas dan spesifitas tertinggi dibandingkan kelinci jantan dan ayam kampung. Antibodi poliklonal PK-SCMV dapat digunakan untuk pengembangan metode imunodiagnosis dengan *indirect Elisa* (modifikasi) sebagai metode deteksi cepat penyakit mosaik tebu.

Kata kunci : gen PK-SCMV, protein rekombinan, antibodi poliklonal, ELISA

ABSTRACT

**DEVELOPMENT METHOD OF SUGARCANE MOSAIC DISEASE
IMUNODIAGNOSTIC USING ANTIBODY FOR RECOMBINANT COAT
PROTEIN OF *SUGARCANE MOSAIC VIRUS***

Nurmalasari¹, Win Darmanto², dan Bambang Sugiharto³

¹Research Affairs, PT Perkebunan Nusantara XI, Surabaya

²Biologi Department, Sains dan Technology Faculty, Universitas Airlangga, Surabaya

³Biologi Department, Mathematics and Natural Science Faculty, Universitas Jember, Jember

Serology-based detection method (e.g ELISA) utilizing the ability of antibodies, which are made in animals, recognized specific protein of virus targeted. ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) is a widely used serological test for detection of plant disease because of easy preparation, can be done in a simple laboratory and no need expertise. Limiting factor of serological methods is providing specific antibody which has no cross reaction to plant protein. Improving accuracy and specificity of serological antibody could be acquired through using monoclonal antibodies and recombinant antibodies. This study aimed to obtain polyclonal antibodies specific for rapid detection test to sugarcane mosaic disease caused by *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV).

The study begins with searching for capsid protein gene of *SCMV* (CP-SCMV) by conducting survey in five areas of sugar cane nursery in East Java (Magetan, Madiun, Lumajang, Jember and Bondowoso region). Sugarcane leaf samples that show visual symptoms of mosaic disease analyzed by molecular methods of RT-PCR (reverse transcriptase PCR) using degenerate primers CP-SCMV. From this observation SCMV Jember isolate had been obtained, which is different from existing SCMV isolates in Gene Bank. The next stage is to find the complete gene sequences of CP-SCMV by designing a complete primer for CP-SCMV gene. Then, further research is redesigned conserved region primers with restriction enzyme sequences for cutting side marker at the stage of molecular cloning.

Molecular cloning begins with cloning in *E.coli* DH5α host for storage and reproduction of gene sources. Sub cloning was done on expression vector and *E.coli* BL21 as host to produce recombinant proteins. Recombinant proteins produced from *E. coli* BL21 by inducer IPTG (*isopropyl thiogalactosidase*) to produce recombinant proteins. After isolation and purification, recombinant CP-SCMV ready for use as antigens to induced antibodies in rabbit and chicken.

Animals immunized with recombinant antigens produced polyclonal antibodies as raw material for serological testing. Crude antibodies were tested for specificity and titer using Agar Gel Precipitation Test (AGPT), direct agglutination and Westen blot. Development of immunodiagnosis methods using crude antibodies were done successfully through Indirect ELISA method.

Keywords: PK-SCMV gene, recombinant proteins, polyclonal antibodies, ELISA