

Deteksi Dini Penyakit Daun Kipas (*Grapevine Fanleaf Virus*) dan Perbedaan Gejala Pada Tiga Varietas Anggur (*Early Detection of Leaf Curl Disease (Grapevine Fanleaf Virus) and Symptoms Differences on Three Grape Varieties*)

Widyaningsih, S¹⁾, Dwiastuti, ME¹⁾, dan Puspitasari, TK²⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika, Jln. Raya Tlekung No. 1, Junrejo, Batu 65301

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran Malang

E-mail: sri_wiwied@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 25 Juli 2012 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 18 November 2014

ABSTRAK. Penyakit daun kipas *grapevine fanleaf virus* (GFLV) merupakan penyakit yang sangat merugikan pada tanaman anggur, karena menghambat pertumbuhan dan menekan produktivitas tanaman. Penelitian bertujuan mengetahui cara deteksi dini, penyebab penyakit, dan perbedaan gejala penyakit GFLV pada tiga varietas anggur. Penelitian dilaksanakan di *Screen House* dan Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) pada bulan Januari sampai dengan April 2011. Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), terdiri atas enam perlakuan dan enam ulangan. Perlakuan terdiri atas tiga varietas tanaman anggur, yaitu Prabu Bestari, Kediri Kuning, dan Probolinggo Super. Masing-masing varietas diberi dua perlakuan yaitu diinokulasi dan tidak diinokulasi GFLV (sehat). Parameter pengamatan meliputi masa inkubasi, gejala serangan, kerusakan jaringan daun akibat infeksi GFLV, benda asing pada jaringan daun tanaman anggur akibat infeksi GFLV, dan pengujian serologi ELISA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa deteksi dini GFLV dapat dilakukan dengan pengamatan gejala visual, pengamatan kerusakan jaringan tanaman, dan benda asing pada jaringan daun serta dengan uji ELISA. Terdapat perbedaan gejala dan kerusakan jaringan antara tanaman yang terinfeksi GFLV dan tidak terinfeksi. Terdapat perbedaan gejala visual dan masa inkubasi GFLV pada varietas yang berbeda.

Katakunci: *Vitis vinifera*; Deteksi dini; *Grapevine fanleaf virus*

ABSTRACT. Grapevine fanleaf virus disease (GFLV) is very detrimental grape disease to the vines because they interfere crop growth and productivity. This research aimed to determine early detection the occurrence of the GFLV and to describe the different symptoms on the three varieties of grape. The study was conducted in *Screen House* and Integrated Laboratory of Indonesian Citrus and Subtropical Fruits Research Institute (ICSFRI) on January-April 2011. The research was conducted using a completely randomized design (CDR), consisted of six treatments with six replications. The treatments were three varieties of grapevine i.e. Prabu Bestari, Kediri Kuning, and Probolinggo Super. Each varieties was divided into infected and healthy plants with GFLV. Observation parameters were incubation period, symptom of GFLV, tissue damage was caused by GFLV infection, foreign substances in the tissue of GFLV infected leaves, and ELISA test on inoculated and uninoculated plants. The results showed that the early detection of GFLV in grapevine can be done using observation of external symptoms, tissue damage, foreign substances in the tissue of the leaves of the plants, and ELISA test. There are differences between GFLV infected plant and uninfected one on three varieties of grape. External symptoms and incubation period of GFLV were difference among the varieties tested.

Keywords: *Vitis vinifera*; Detection; Grapevine fanleaf virus

Tanaman anggur merupakan tanaman yang berasal dari negara subtropika dan sudah beradaptasi di Indonesia sejak tahun 1880. Anggur merupakan salah satu buah-buahan yang banyak disukai konsumen dalam bentuk segar maupun olahan. Tanaman anggur sudah cukup lama diusahakan oleh petani Indonesia terutama di daerah Jawa Timur sejak tahun 1882 (Winarno 1991). Saat ini komoditas anggur sangat potensial untuk dikembangkan mengingat impor buah-buahan subtropika membanjir di Indonesia. Pengembangan komoditas ini di Indonesia diharapkan akan menghemat devisa negara. Perkembangan neraca perdagangan kelompok buah segar secara umum mengalami defisit. Pada tahun 2008–2012 produksi buah anggur di Indonesia mengalami penurunan pertumbuhan sebesar 14,87% (Badan Pusat Statistik & Dirjen Hortikultura 2012).

Perkembangan anggur di Indonesia cukup potensial, jenis yang digemari adalah *Vitis vinifera* dan *V. labrusca*. Dalam pengembangan komoditas, organisme pengganggu tumbuhan (OPT) yang menggagalkan panen perlu dicermati. Akhir-akhir ini ditemukan gejala penyakit virus kipas pada tanaman anggur yang diduga disebabkan oleh *grapevine fanleaf virus* (GFLV). Gejala penyakit tersebut pernah ditemukan di sentra anggur Probolinggo dan Bali (Dwiastuti & Nurhadi 1986). Selain itu Purnomo (1987) menyatakan bahwa gejala penyakit GFLV ini ditemukan di berbagai sentra produksi anggur Indonesia. Menurut Andret-Link *et al.* (2004) penyakit ini menyebabkan penurunan hasil sampai 80%, memperpendek umur produksi, dan mempercepat kematian tanaman, dan menurut Sutic *et al.* (1999), penyakit ini mampu mengurangi kemampuan pengakaran dan kompatibilitas

sambungan. Menurut Bos (1983) GFLV tergolong dalam kelompok *nematode transmitted polyhedral virus* atau *nepovirus*. Hubungan antara nematoda dan virus yang ditularkannya bersifat sangat spesifik (Taylor & Brown 1997), tetapi tidak ditemukan korelasi antara insiden virus di lapangan dengan jumlah nematoda vektor potensial yang menyebabkan penyakit (Ploeg *et al.* 1996).

Di Indonesia belum pernah dilakukan tindakan pengendalian terhadap penyakit GFLV meskipun kerugian akibat penyakit ini cukup besar, hal ini terjadi karena petani dan petugas pertanian kesulitan mendeteksi secara dini terhadap gejala penyakit ini. Hal ini disebabkan karena terjadinya kerancuan gejala dengan gejala keracunan senyawa kimia oleh pestisida atau gejala akibat serangan hama trips dan defisiensi unsur hara (Pearson & Goheen 1998). Metode deteksi yang dilakukan saat ini secara umum meliputi penularan virus dari tanaman terinfeksi ke tanaman sehat, melalui okulasi atau penyambungan atau dengan mengolesi permukaan daun yang sehat dengan cairan (*sap*) tanaman terinfeksi (Agrios 2005). Deteksi penyakit yang disebabkan oleh virus pada anggur juga dapat dilakukan melalui pengamatan terhadap batang atas yang telah berkayu, disambungkan pada batang bawah tanaman indikator dengan pengamatan selama periode deteksi sampai 3 tahun. Metode memerlukan waktu dan tenaga yang banyak. Metode deteksi secara molekuler telah dikembangkan menggunakan jaringan tanaman (Rowhani *et al.* 1993) atau menggunakan penanda probe untuk mendapatkan isolat spesifik GFLV pada nematoda vektor (Finetti-Sialer & Ciancio 2005), demikian juga deteksi melalui serologi menggunakan bagian tanaman terinfeksi atau nematoda vektor dengan Biotin-Avidin ELISA (Esmenjaud *et al.* 1993). Deteksi dengan metode-metode tersebut perkembangannya masih terbatas dengan biaya yang tinggi sehingga diperlukan metode lain yang cepat, akurat, sederhana, dan murah.

Metode deteksi dini yang relatif baru adalah dengan *green grafting*, yaitu penyambungan yang dikerjakan dengan batang bawah anggur yang diperoleh dari pertanaman sebelumnya (Jensen *et al.* 1998). Metode ini banyak dikembangkan untuk mengetahui infeksi penyakit pada hasil perbanyakan vegetatif anggur, karena mampu mendiagnosis gejala penyakit secara lebih cepat dibandingkan dengan indeksing lapangan menggunakan tanaman indikator berkayu. Menurut Rowhani (2005) belum ada metode deteksi penyakit virus pada anggur yang lengkap dan mendalam, masing-masing metode mempunyai kelemahan.

Di dalam perbanyakan bibit anggur, penangkar harus mengetahui gejala penyakit yang disebabkan oleh virus pada masing-masing varietas secara cermat. Hal

ini diperlukan untuk melakukan tindakan pengendalian secara tepat. Gejala penyakit yang disebabkan oleh virus bervariasi pada jenis dan kerusakan yang ditimbulkannya. Gejala infeksi virus terkait dengan jenis virus, kepekaan varietas, dan interaksi dengan lingkungan (tanah dan iklim) (Gambino *et al.* 2010). Gejala penyakit GFLV yang spesifik tiap varietas belum banyak diketahui.

Tujuan penelitian adalah mengetahui cara deteksi dini virus penyebab penyakit daun kipas GFLV dan perbedaan gejala akibat infeksi penyakit GFLV pada tiga varietas anggur. Hipotesis penelitian adalah metode deteksi dini yang digunakan diduga dapat mendiagnosis keberadaan penyakit GFLV dan penyakit GFLV diduga menyebabkan perbedaan gejala penyakit pada tiga varietas anggur yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai dengan April 2011 di *Screen House* dan Laboratorium Terpadu Balai Penelitian Tanaman Jeruk dan Buah Subtropika (Balitjestro) Tlekung, Kota Batu, dengan ketinggian tempat 950 m dpl.

Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah tanaman anggur varietas Probolinggo Super, Kediri Kuning, dan Prabu Bestari, yang sudah diinokulasi GFLV dan tanaman tidak terinfeksi GFLV berdasarkan pengujian dengan ELISA, kit antibodi, dan konjugat dari Agdia (USA), serta bibit anggur varietas Jestro Ag-60 sebagai batang bawah dalam proses penyambungan. Alat yang digunakan antara lain ELISA *reader*, mikropipet, *sentrifuge*, *microtube*, pisau okulasi, gunting pangkas, dan timbangan.

Tahapan Penelitian

Penyiapan batang bawah tanaman anggur dan pemeliharaan

Bibit anggur batang bawah Jestro Ag-60 dipindah ke polibag berukuran 25 cm x 25 cm sekaligus ditambah dengan media tanah agar pertumbuhan tanaman lebih optimal. Bibit dipelihara dan dipupuk dengan NPK 5 g bergantian dengan Urea 2,5 g. Pemberian pupuk dilakukan dengan cara dilarutkan ke dalam 5 l air, kemudian diaduk dan disiramkan ke tanaman sebanyak 50 cc per tanaman.

Seleksi sumber inokulum GFLV

Pemilihan tanaman sebagai sumber inokulum GFLV dilakukan pada tanaman koleksi plasma nutfah

anggur milik Balitjestro. Pemilihan berdasarkan gejala yang tampak pada tiga varietas tanaman anggur. Daun bergejala GFLV diambil untuk dilakukan identifikasi status penyakit dengan menggunakan metode serologi ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*). Tanaman yang diambil daunnya sebagai sampel ditandai untuk memudahkan pelacakan kembali apabila tanaman tersebut terpilih sebagai sumber inokulum. Pelaksanaan uji ELISA dilakukan di laboratorium pengujian terakreditasi.

Inokulasi GFLV

Inokulasi GFLV dilakukan dengan menyambungkan sampel dari lapangan yang dicurigai terinfeksi GFLV dan sampel yang sehat dari varietas Prabu Bestari, Kediri Kuning, dan Probolinggo Super masing-masing pada benih anggur Jestro AG-60 yang sehat sebagai batang bawah. Penyambungan dinyatakan berhasil setelah pertumbuhan tanaman melewati waktu 3 minggu hingga 1 bulan. Penelitian dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), terdiri atas enam perlakuan dan enam ulangan. Perlakuannya adalah tiga varietas tanaman anggur, yaitu Prabu Bestari, Kediri Kuning, dan Probolinggo Super. Masing-masing varietas terdiri atas dua perlakuan yaitu tanaman yang diinokulasi dan yang tidak diinokulasi GFLV (sehat).

Peubah

Pengamatan dilakukan terhadap masa inkubasi, gejala serangan, kerusakan jaringan, keberadaan benda asing (*inclusion body*), dan luas serangan. Masa inkubasi yaitu periode waktu dari inokulasi (penyambungan) sampai munculnya gejala pada tanaman anggur. Pengamatan dilakukan setelah inokulasi hingga munculnya gejala pertama pada semua perlakuan. Gejala serangan merupakan perubahan pada tanaman yang mengarah pada pengurangan kualitas dan kuantitas akibat serangan virus. Gejala diamati pada bagian daun, daun yang bergejala dibandingkan dengan daun yang tidak bergejala (sehat) sehingga dapat dibandingkan perbedaannya. Paramater kerusakan jaringan dan keberadaan benda asing diamati di bawah mikroskop pada perbesaran 400x dibandingkan dengan tanaman yang sehat pada varietas yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Masa Inkubasi GFLV

Masa inkubasi penyakit GFLV pada tanaman anggur yang diuji diamati mulai hari pertama pada saat tanaman diinokulasi sampai muncul gejala. Masa inkubasi tanaman anggur setelah diinokulasi GFLV pada varietas Probolinggo Super berkisar antara 65–67 hari, varietas Prabu Bestari antara

60–64 hari, dan varietas Kediri Kuning 53–57 hari. Rerata masa inkubasi GFLV tercepat adalah 55 hari, yaitu pada varietas Kediri Kuning dan rerata masa inkubasi terlama adalah 65,67 hari, yaitu pada varietas Probolinggo Super, sedangkan pada varietas Prabu Bestari sebesar 62,17 hari.

Perbedaan masa inkubasi pada setiap perlakuan dimungkinkan oleh keberhasilan virus berkembang dan menyebar di dalam jaringan tanaman yang berbeda sehingga menimbulkan masa inkubasi yang berbeda. Selain itu virus akan berhasil menginfeksi tanaman inang apabila virus dapat berpindah dari sel yang satu ke sel yang lain dan dapat memperbanyak diri di dalam sel tanaman. Bos (1983) menyatakan bahwa gejala tanaman yang terinfeksi virus ditentukan oleh keberhasilan virus bermultiplikasi dalam jaringan inang. Menurut Takács *et al.* (2014) virus menggunakan sistem pengangkutan pada inang untuk pergerakannya. Ketika virus masuk ke dalam jaringan floem, maka virus akan bergerak dengan kecepatan yang sebanding dengan pergerakan fotoasimilat. Keberadaan virus juga mengimbas perubahan fisiologis pada tanaman, meskipun virus tidak mempunyai fungsi fisiologis.

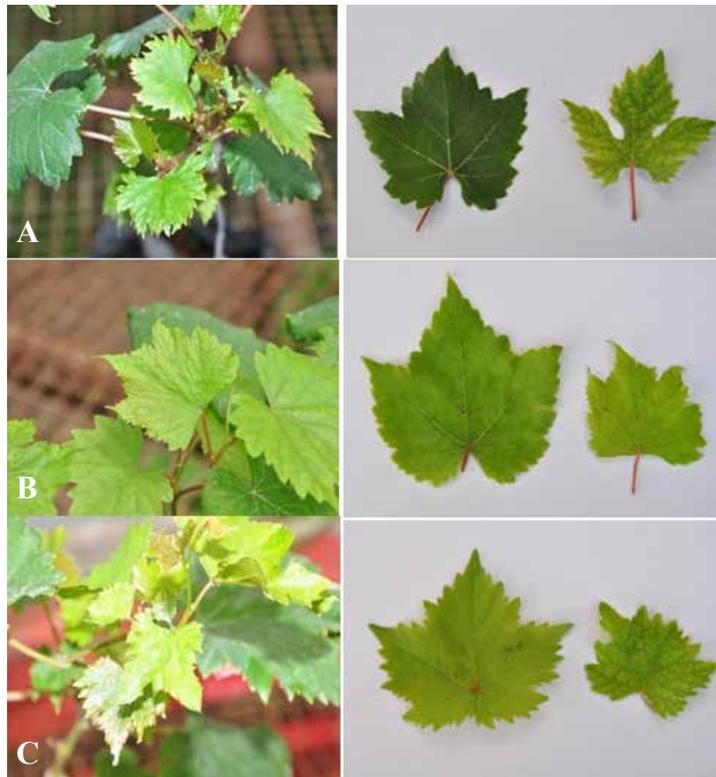
Gejala Serangan GFLV pada Tiga Varietas Anggur

Gejala serangan pada tanaman anggur akibat infeksi GFLV berbeda pada tiap varietas yang diuji yang tercantum pada Tabel 1 dan Gambar 1. Sutic *et al.* (1999) menyatakan bahwa gejala serangan pada tanaman anggur akibat infeksi GFLV yaitu terdapat perubahan warna pada daun (variasi klorotik), warna kuning pada daun dan spot mosaik dengan bentuk yang berbeda, urat daun mengkerut dan seakan-akan menyerupai kipas yang terbuka. Menurut Takács *et al.* (2014), infeksi virus pada tanaman akan menyebabkan pengurangan jumlah kloroplas, penurunan kadar klorofil, deformasi plastids, dan lain-lain. Infeksi virus yang menyebabkan klorosis atau nekrosis jaringan daun yang terinfeksi mengakibatkan serangkaian perubahan struktural dan metabolik yang terkait dengan keparahan gejala dan jenis interaksi inang dan patogen.

Flaherty (1992) menyatakan tanaman anggur yang terinfeksi GFLV akan mengalami deformasi *fanleaf* yang berarti sisi-sisi lekukan daun menjadi tidak simetris atau tidak beraturan serta daun yang terinfeksi akan lebih kecil dibandingkan daun yang tidak terinfeksi. Semangun (2004) dan Creasy & Creasy (2009) menyatakan bahwa gejala GFLV akan menyebabkan daun-daun muda lebih kecil daripada biasa dan mempunyai gambaran mosaik dengan bermacam-macam corak. Lekukan helaian daun di dekat tangkai (*petiolar sinus*) menjadi lebih lebar dibanding daun yang sehat. Bentuk daun berubah dan menjadi mirip dengan kipas yang setengah menutup.

Tabel 1. Perbedaan gejala serangan GFLV pada tiga varietas anggur (*Symptoms differences of GFLV on three grape varieties*)

Bagian tanaman (Part of plant)	Gejala serangan GFLV (<i>Symptoms of GFLV</i>)		
	Probolinggo Super	Prabu Bestari	Kediri Kuning
Daun (<i>Leaf</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Penyempitan daun (<i>Leaf indentation</i>) • Helaian daun berjarak sangat dekat dengan tulang daun (<i>Distorted of blade</i>) • Terdapat spot mosaik (<i>Mosaic spot</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ukuran daun lebih kecil (<i>Size of the leaf is smaller</i>) • Sisi-sisi tepi daun tidak simetris (seperti kipas) (<i>Asymmetrical leaf margin</i>) (<i>resembling fan</i>) • Bagian daun berkerut dan keriput (<i>Cupped and puckered of leaf</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ukuran daun lebih kecil (<i>Size of the leaf is smaller</i>) • Helaian daun tidak simetris (<i>Asymmetrical blade</i>) • <i>Blotching</i>, mosaik (<i>Mosaic</i>)
Jaringan tulang daun (<i>Vein tissue</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Tulang daun berukuran lebih kecil (<i>Size of vein is smaller</i>) • Jumlah jaringan pembuluh daun lebih sedikit (<i>Less vascular tissue</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tulang daun berukuran lebih kecil dan sempit (<i>Size of vein is smaller and narrow</i>) • Jumlah jaringan pembuluh lebih sedikit (<i>Less vascular tissue</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Tulang daun berukuran lebih kecil dan sempit (<i>Size of vein is smaller and narrow</i>) • Terdapat perubahan jaringan floem (bentuk rusak, letak tidak beraturan) (<i>Phloem distortion: injury of shape, displacement of the phloem</i>)



Gambar 1. Gejala serangan GFLV pada tanaman anggur dan perbedaan antara daun yang sehat (kiri) dan daun yang sakit (kanan) (A) varietas Probolinggo Super, (B) varietas Prabu Bestari, dan (C) varietas Kediri Kuning [*Symptom of GFLV on grape and differences between healthy leaf (left) and infected leaf (right)*]

Perbedaan gejala antarvarietas anggur yang terinfeksi GFLV tersebut diduga akibat perbedaan virulensi virus dan ketahanan tanaman. Triharso (1994) menyatakan bahwa intensitas gejala bergantung pada virulensi (tingkat keganasan), kepekaan (ketahanan) inang terhadap infeksi virus, dan kesiagaan virus untuk menginfeksi dan menyerang inang serta memperbanyak

diri, sedangkan Pathak (1976) menyatakan bahwa variasi gejala GFLV bergantung juga pada musim. Menurut Rowhani (2005) varietas *V. rupestris* St. George menghasilkan gejala khas dalam menanggapi infeksi oleh GFLV. Singh (1978) menyatakan bahwa gejala berbeda yang disebabkan oleh virus menunjukkan perbedaan penyebaran dalam tanaman inang, sedangkan

Narayanasamy (2011) menyatakan bahwa virus mengimbas gejala makroskopik (gejala eksternal) dan mikroskopis (gejala internal) yang merupakan karakteristik dari infeksi. Pengamatan variasi fungsi fisiologis pada tanaman sehat dan terinfeksi virus sangat penting agar infeksi virus dapat segera terdeteksi sehingga dapat dilakukan tindakan pengendalian penyakit atau pencegahan agar tanaman terinfeksi tidak menjadi sumber inokulum bagi tanaman sehat.

Kerusakan Jaringan Daun Tanaman Anggur Akibat Infeksi GFLV

Dari hasil pengamatan dengan irisan melintang menunjukkan terdapat perbedaan antara jaringan daun yang terinfeksi dan jaringan daun yang sehat pada ketiga varietas anggur tersebut (Gambar 2). Hal tersebut akibat infeksi virus yang masuk ke jaringan tanaman, kemudian memperbanyak diri sehingga menyebabkan perubahan pada jaringan tanaman.

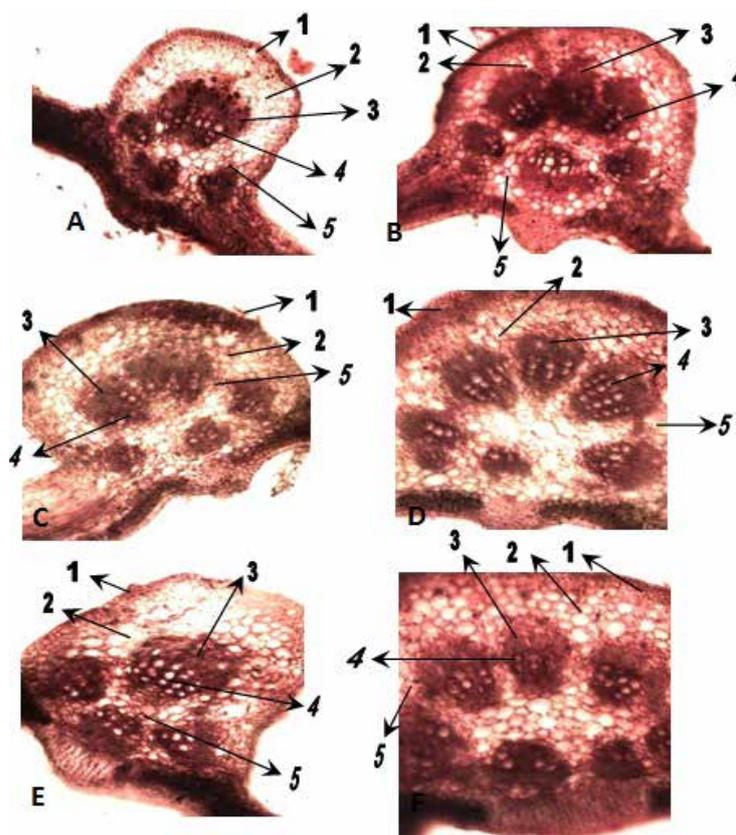
Daun tanaman anggur varietas Probolinggo Super yang terinfeksi GFLV menunjukkan jaringan tulang

daun berukuran lebih kecil dibandingkan dengan varietas Probolinggo Super yang sehat. Penampakan lain yang lebih jelas adalah jumlah jaringan pembuluh daun anggur varietas Probolinggo Super yang terinfeksi GFLV jauh lebih rendah dibanding dengan varietas Probolinggo Super yang tidak terinfeksi GFLV (Gambar 2).

Gejala mosaik pada daun anggur tampak pada ketiga varietas yang diuji. Gejala tersebut muncul akibat infeksi GFLV yang masuk ke dalam jaringan tanaman. Bos (1983), menyatakan bahwa virus hanya dapat memperbanyak diri dalam sel-sel inangnya. Proses perbanyakannya sering mengacaukan fisiologi inang dan dapat mengakibatkan penyakit.

Partikel Virus dan Pembentukan Benda Asing di Dalam Sel Terinfeksi GFLV

Menurut Agrios (2005) deteksi virus dapat dilakukan dengan mengamati jaringan muda yang terinfeksi dengan mikroskop untuk melihat sel benda asing (*inclusion body*). Benda asing tersebut diproduksi



Gambar 2. Irisan melintang jaringan daun tanaman anggur pada perbesaran 100x (A) Kediri Kuning terinfeksi GFLV, (B) Kediri Kuning sehat, (C) Prabu Bestari terinfeksi GFLV, (D) Prabu Bestari sehat, (E) Probolinggo super terinfeksi GFLV, dan (F) Probolinggo Super sehat, (1) epidermis, (2) kolenkim, (3) sel-sel kayu, (4) *phloem*, dan (5) xilem [Cross section of leaf tissue grape plant on 100x magnification, (A) Kediri Kuning infected by GFLV, (B) healthy Kediri Kuning, (C) Prabu Bestari infected by GFLV, (D) healthy Prabu Bestari, and (E) Probolinggo Super infected by GFLV, and (F) healthy Probolinggo Super]

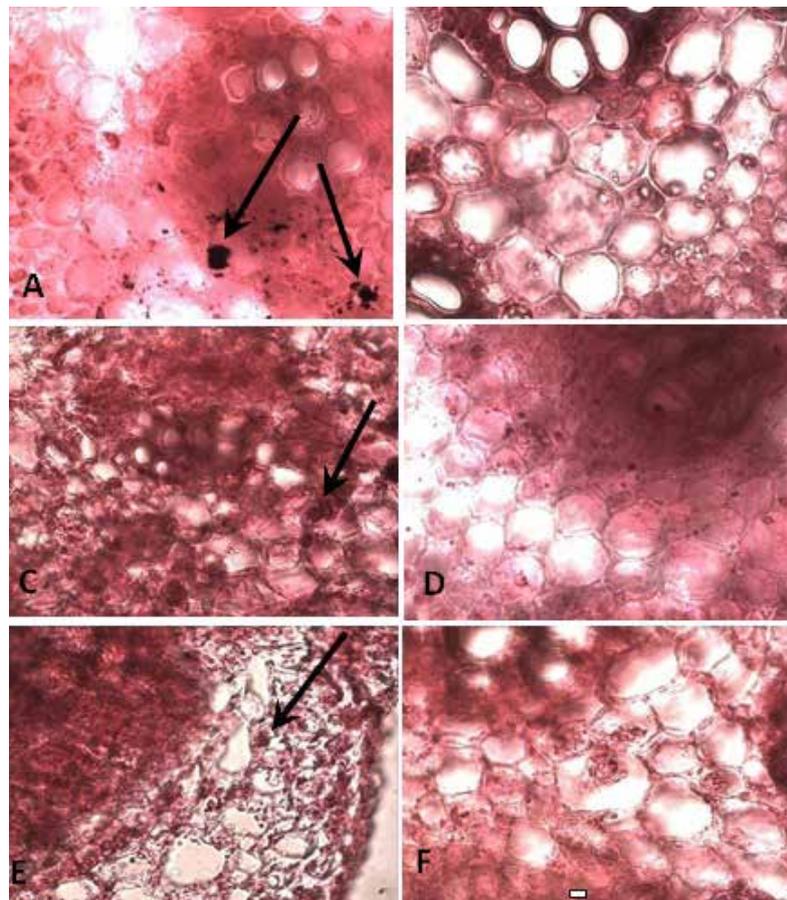
oleh sel tanaman sebagai reaksi terhadap infeksi virus tertentu. Berdasarkan pengamatan, terdapat benda asing pada jaringan daun anggur yang sakit yang tidak ditemukan pada jaringan anggur yang sehat (Gambar 3).

Pada tiga varietas anggur, jaringan daun yang terinfeksi GFLV ditemukan bercak berwarna gelap, berbentuk seperti kubus yang ditunjukkan oleh tanda panah yang merupakan sel benda asing (Gambar 3A dan 3E). Berbeda dengan pada jaringan daun anggur Probolinggo Super yang tidak terinfeksi GFLV tidak terdapat bercak (Gambar 3B). Jaringan daun anggur Probolinggo Super yang tidak terinfeksi GFLV ini juga terlihat bersih dan sehat (Gambar 3D). Benda asing yang terbentuk akibat infeksi GFLV merupakan struktur sitopatik intraselular yang dikenal sebagai benda asing vakuola vesikel (*vesiculate-vacuolate inclusion bodies*) yang sering berlawanan dengan inti

sel. Benda asing berasal dari proliferasi membran, reorganisasi, dan redistribusi serta menunjukkan tempat pengolahan poliprotein virus dan replikasi RNA (Martelli & Boudon-Padieu 2006). Menurut penelitian Valat *et al.* (2006), akibat infeksi GFLV pada klon *grapevine* transgenik juga mampu mengespresikan mantel protein atau pergerakan gen protein melalui elektroporasi protoplas.

Pengamatan benda asing memerlukan teknik pewarnaan khusus, yaitu suatu teknik pewarnaan azure A. Menurut Brlansky (1988), teknik pewarnaan azure A merupakan suatu teknik pewarnaan yang dapat digunakan untuk mendeteksi benda asing pada daun jeruk terinfeksi virus Tristeza dengan cara irisan melintang di bawah mikroskop dengan pembesaran 250x.

Teknik pewarnaan tersebut merupakan salah satu teknik dari 49 kriteria untuk mengelompokkan virus.



Gambar 3. Benda asing pada jaringan daun anggur (perbesaran 400x) (A) Probolinggo Super terinfeksi GFLV, (B) Probolinggo Super sehat, (C) Prabu Bestari terinfeksi GFLV, (D) Prabu Bestari sehat, (E) Kediri Kuning terinfeksi GFLV, (F) Kediri Kuning sehat, dan (→) bercak hitam diduga benda asing [*Inclusion body on grape leaf tissue, 400x magnification, (A) Probolinggo Super infected by GFLV, (B) healthy Probolinggo Super, (C) Prabu Bestari infected by GFLV, (D) healthy Prabu Bestari, (E) Kediri Kuning infected by GFLV, (F) healthy Kediri Kuning*), and (→) black spot was predicted as inclusion body]

Tabel 2. Rerata hasil uji ELISA 5 minggu setelah penyambungan (Mean of ELISA test result, 5 weeks after grafting)

Sampel (<i>Sample</i>)	Nilai absorbansi (<i>Absorbance value</i>)	Hasil (<i>Result</i>)
Kontrol positif (<i>Positive control</i>)	140,5	(+)*
Kontrol negatif (<i>Negative control</i>)	0,012	(-)
Probolinggo Super terinfeksi (<i>Infected</i>)	0,133	(+)
Probolinggo Super sehat (<i>Healthy</i>)	0,0035	(-)
Kediri Kuning terinfeksi (<i>Infected</i>)	0,1395	(+)
Kediri Kuning sehat (<i>Healthy</i>)	0,01	(-)
Prabu Bestari terinfeksi (<i>Infected</i>)	0,12	(+)
Prabu Bestari sehat (<i>Healthy</i>)	0,011	(-)

* Sampel dikatakan positif terinfeksi apabila hasil perhitungan nilai absorbansi menunjukkan 2x kontrol negatif

Jika dalam sel tampak benda asing yang diduga merupakan zarah virus maka benda asing dari GFLV bentuknya mengarah isometris. Hal ini sesuai dengan pernyataan Semangun (2004) dan Sutic *et al.* (1999), bahwa virus GFLV mempunyai zarah berbentuk isometris dengan garis tengah lebih kurang 30 nm.

Hasil Pengujian Dengan Elisa

Hasil pengamatan berdasarkan gejala visual pada tanaman uji yang diduga terinfeksi GFLV, menunjukkan hasil positif GFLV berdasarkan pengujian ELISA pada tiga varietas anggur (Tabel 2). Pada tanaman uji yang tidak menunjukkan gejala terinfeksi GFLV, hasil uji berdasarkan pengujian ELISA menunjukkan hasil negatif. Menurut Gambino (2010) deteksi GFLV dengan ELISA hasilnya akurat dan pengujian dapat dilakukan dengan mudah sehingga merupakan salah satu pilihan untuk deteksi rutin virus-virus pada anggur.

Hasil tersebut menunjukkan gejala visual yang teramati dari hasil *grafting* dapat sebagai dasar deteksi keberadaan penyakit GFLV sehingga tidak diperlukan pengujian dengan ELISA, yang membutuhkan biaya tinggi dan juga untuk kepraktisan pengamatan gejala di lapangan. Meskipun menurut penelitian Pathirana & Marian (2005) penampakan gejala berdasarkan kemunculan warna merah, penggulangan daun dan, perubahan warna pada tulang daun berkaitan dengan sensitivitas batang bawah yang digunakan. Misalnya pada batang bawah *C. sauvignon* lebih sensitif dibandingkan LN33 dengan 80% sambungan menunjukkan gejala dalam 3–4 minggu dan 90% menunjukkan gejala dalam 12 minggu. Kelemahan yang lain adalah 18,2% hasil *grafting* dinyatakan positif secara visual, tetapi ketika dikonfirmasi dengan DAS ELISA ternyata menunjukkan hasil yang negatif. Hasil deteksi yang lebih akurat dan terpercaya dapat diperoleh dari pengamatan secara visual yang disertai dengan pengujian secara serologi.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Deteksi dini penyakit GFLV dapat dilakukan dengan mengamati gejala visual pada tanaman, kerusakan jaringan daun, keberadaan benda asing atau pengujian dengan ELISA.
2. Terdapat perbedaan gejala luar dan masa inkubasi pada tiga varietas anggur yang diuji responnya terhadap infeksi GFLV.

DAFTAR PUSTAKA

1. Andret-Link, P, Laporte, C, Valat, L, Ritzenthaler, C, Demangeat, G, Vigne, E, Laval, V, Pfeiffer, P, Stussi-Garaud, C & Fuchs, M 2004, 'Grapevine fanleaf virus: Still a major threat to the grapevine industry', *J. Plant Pathol.*, vol. 86, pp. 183-95.
2. Agrios, GN 2005, *Plant pathology*, fifth editions, Elsevier Academic Press, New York, pp. 922.
3. Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jendral Hortikultura 2012, *Produksi buah-buahan di Indonesia*, diunduh 26 Agustus 2012, <<http://www.deptan.go.id/infoeksekutif/horti/ATAP-HORTI2012/prod-buah.pdf>>.
4. Bos, L 1983, *Introduction of plant virology*, Center for Agriculture Publishing and Documentation, Wageningen, pp. 225.
5. Brlansky, RH 1988, *Detection of citrus tristeza inclusion bodies using azure a staining and in situ immunofluorescence*, Citrus Research and Education Center, University of Florida (Lake Alfred), United States of America, pp. 264.
6. Creasy, GL & Creasy, LL 2009, *Grapes*, CAB International, USA, 295 pp.
7. Dwiastuti, ME & Nurhadi 1986, 'Inventarisasi penyakit penting pada tanaman anggur di beberapa sentra produksi', *Hortikultura*, vol. 20, hlm. 660-3.
8. Esmenjaud, D, Walter, B, Minot, JC, Voisin, R & Cornuet, P 1993, 'Biotin-avidin ELISA detection of grapevine fanleaf virus in the vector nematode *Xiphinema index*', *Journal of Nematology*, vol. 25, no. 3, pp. 401.

9. Finetti-Sialer, MM & Ciancio, A 2005, 'Isolate-specific detection of grapevine fanleaf virus from *Xiphinema index* through DNA-based molecular probes', *Phytopathology*, vol. 95, pp. 262-8.
10. Flaherty, L, Christensen, DP, Lanini, LT, Marois, WJ, Philips, AA, Phil & Wilson, TL 1992, *Grape pest management*, second edition, Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, 1003 pp.
11. Gambino, G, Angelini, E & Gribaudo, I 2010, 'Field assessment and diagnostic methods for detection of grapevine viruses', in Delrot, S, Medrano, H, Or, E, Bavaresco, L & Grando, S (eds.), *Methodologies and results in grapevine research*, Springer, New York, 448 pp.
12. Jensen, F, Bailey, M & Lynn, C 1998, *Grafting grapevines*, University of California, Pub. GV6-98.
13. Martelli, GP & Boudon-Padieu, E 2006, 'Infectious degeneration (grapevine fanleaf virus)', in *Directory of infectious diseases of grapevines and viruses and virus-like diseases of the grapevine : Bibliographic reports 1998-2004, Options Mediterraneennes*, seri B, no. 55, CIHEAM, 279 pp.
14. Narayanasamy, P 2011, 'Microbial plant pathogen-detection and disease diagnosis : Viral and viroid pathogens', vol. 3. Springer, New York, 285pp.
15. Pathak, VN 1976, *Diseases of fruit crops*, Oxford and IBH Public Co, New Delhi, 309 pp.
16. Pathirana, R & Marian, JM 2005, 'A modified green-grafting technique for large-scale virus indexing of grapevine (*Vitis vinifera* L.)', *Scientia Horticulturae*, vol. 107, pp. 97-102.
17. Pearson, RC & Goheen, AC 1998, *Compendium of grape diseases*, APS Press, USA, pp. 48-9.
18. Ploeg, AT, Zoon, FC, De Bree, J & Asjes, CJ 1996, 'Analysis of the occurrence and distribution of tobacco rattle virus in field soil and disease in a subsequent tulip crop', *Annals of Applied Biology*, vol. 129, pp. 461-9.
19. Purnomo, S 1987, 'Prospek pengusahaan anggur di Indonesia', *Jurnal Penelitian Pengembangan Pertanian*, vol. 6, hlm. 66-72.
20. Rowhani, A, Chay, C, Golina, DA & Falk, BW 1993, 'Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of grapevine fanleaf virus in grapevine tissue', *Phytopathology*, vol. 83, pp. 749-53.
21. Rowhani, A, Uyemoto, JK, Golino, DA & Martelli, GP 2005, 'Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species', *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 43, pp. 61-278.
22. Semangun, H 2004, *Penyakit-penyakit tanaman hortikultura di Indonesia*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, pp 307-9.
23. Singh, SR 1978, *Plant diseases*, Oxford and IBH Publishing, New Delhi, 564 pp.
24. Sutic, DD, Ford, RE & Tomic, MT 1999, *Handbook of plant virus diseases*, CRC Press, New York, 553 pp.
25. Takács, A, Horváth, J, Gáborjányi, R & Kazinczi, G 2014, 'Virus-induced physiologic changes in plants', in Gaur, S, Hohn, T & Sharma, P (eds.), *Plant virus-host interaction : Molecular approaches and viral evolution*, Academic Press, UK, 408pp.
26. Taylor, CE & Brown, DJF 1997, *Nematode vectors of plant viruses*, CAB International, London, 286 pp.
27. Triharso 1994, *Dasar-dasar perlindungan tanaman*, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hlm. 109.
28. Valat, L, Fuchs, M & Burrus, M 2006, 'Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of *Grapevine fanleaf virus*: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation', *Plant Science*, vol. 170, pp. 739-47.
29. Winarno 1991, 'Asal usul tanaman anggur dan penyebarannya', *dalam Budidaya Tanaman Anggur*, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, Jakarta, pp. 99.