

## Studi Pembuatan Antiserum Poliklonal untuk Deteksi Cepat Virus Mosaik Mentimun pada Krisan

Rahardjo, I.B., A. Muharam, dan Y. Sulyo

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciherang - Pacet, Cianjur 43253

Naskah diterima tanggal 5 November 2003 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 14 Februari 2005

**ABSTRAK.** Virus mosaik mentimun merupakan salah satu patogen penting pada berbagai tanaman hortikultura, termasuk tanaman krisan. Untuk mengetahui secara dini infeksi virus pada tanaman, maka perlu dikembangkan metode deteksi cepat. Penelitian ini bertujuan mendapatkan antiserum poliklonal untuk deteksi cepat virus mosaik mentimun pada krisan. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung dari bulan April sampai Desember 2000. Antiserum terhadap CMV pada tanaman krisan telah dihasilkan dengan cara penyuntikan virus murni CMV pada kelinci dengan konsentrasi setiap penyuntikan sebesar 1 mg/ml. Antiserum yang diuji terdiri dari enam periode pengambilan darah. Pengujian menggunakan metode ELISA tidak langsung. Hasil pengujian menunjukkan bahwa dari enam kali pengambilan darah ternyata bereaksi positif, yaitu dengan adanya konsentrasi antibodi dalam darah meningkat. Antiserum juga dapat digunakan untuk mendeteksi langsung terhadap ekstrak daun krisan yang terinfeksi CMV. Kepekaan antiserum tertinggi pada pengambilan darah ke empat dan ke enam dengan konsentrasi 1/100 dan 1/500 terhadap pengenceran sampel 1/10 dan 1/100.

Kata kunci: *Dendranthema grandiflora*; CMV; Antiserum; ELISA tidak langsung.

**ABSTRACT.** Rahardjo, I.B., A. Muharam, and Y. Sulyo. 2005. Study on developing of polyclonal antiserum for rapid detection of cucumber mosaic virus on chrysanthemum. Cucumber mosaic virus is one the major pathogens on some horticulture crops, including chrysanthemum. A rapid detection method should be developed to support the evaluation of initial infection of the virus in plants. The objective of this experiment was to obtain polyclonal antiserum to CMV on chrysanthemum for rapid detection. The experiment was conducted in Virology Laboratory of Indonesian Ornamental Plants Institute in Segunung from April to December 2000. A polyclonal CMV antiserum had been produced by injections of purified CMV into rabbits with concentration 1 mg/ml each injections. The antiserum from six bleeding periods were tested. An indirect ELISA method was used to determine the sensitivity of the antiserum. Results indicated that six bleeding periods had positive reaction, with concentration of the virus antibodies increased gradually from the first to the sixth bleedings. The antiserum can also be directly used to detect CMV from infected chrysanthemum plants. The highest antiserum sensitivity were the fourth and sixth bleedings with concentration 1/100 and 1/500 to sample dilution 1/10 and 1/100.

Keyword: *Dendranthema grandiflora*; CMV; Antiserum; Indirect ELISA.

Krisan (*Dendranthema grandiflora*) merupakan salah satu komoditas tanaman hias prioritas yang dewasa ini banyak dibudidayakan secara komersial di Indonesia. Kebutuhan benihnya yang

terus meningkat dari tahun ke tahun menuntut penyediaan benih bermutu yang bebas patogen sistemik, khususnya virus.

Untuk meningkatkan nilai jual bibit krisan, maka perlu ditingkatkan mutunya, baik secara kualitas maupun kuantitas. Dalam menghadapi era globalisasi produsen tanaman hias dituntut untuk menghasilkan produk yang prima, yaitu produk yang sehat tanpa cacat secara kualitas maupun kuantitas. Tuntutan konsumen tersebut mengacu pada standar ekolabel, yaitu *International Standard Organization* (ISO). ISO-9000, yang memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan mutu produk dan ISO-14000 memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan lingkungan.

Salah satu kendala yang dihadapi dalam pem-

budayaan jenis tanaman hias adalah masalah penyakit yang disebabkan oleh virus. Menurut Smith (1978) paling sedikit ada 14 jenis virus yang dapat menyerang tanaman krisan, antara lain *chrysanthemum latent virus*, *chrysanthemum ringspot virus*, *chrysanthemum rosette virus*, dan *chrysanthemum stunt virus*. Berdasarkan penelitian terdahulu, diketahui bahwa ada dua jenis virus yang dijumpai pada tanaman krisan di sekitar Cipanas (Cianjur), yaitu virus B krisan (*chrysanthemum virus B*) dan virus mosaik mentimun (*cucumber mosaic virus* = CMV). Di Eropa disyaratkan bahwa bibit beberapa tanaman hias seperti krisan, lily, gladiol, pelargonium, dan narcissus harus bebas dari beberapa virus/viroid. Virus yang cukup penting menginfeksi tanaman hias di antaranya adalah virus mosaik mentimun

(Anonymous 1993).

Virus mosaik mentimun merupakan patogen utama pada berbagai jenis tanaman sayuran, khususnya cabai dan tomat (Duriat *et al.* 1992). Lebih dari 75 strain tercakup dalam CMV (Kaper & Waterworth 1981). Virus tersebut dapat menyerang berbagai jenis tanaman yang tercakup lebih dari 1.000 spesies dari 100 famili (monokotil dan dikotil) dan ditularkan oleh 86 spesies aphid secara nonpersisten (Douine *et al.* 1979; Flasiniski *et al.* 1995). Di Taiwan, CMV menyebabkan kerugian ekonomis yang berarti pada paprika, tomat, gladiol, dan pisang (Hsu *et al.* 1989).

Pengaruh infeksi CMV terhadap produksi pada komoditas krisan di Indonesia belum pernah dilaporkan. Walaupun demikian, virus tersebut diduga ikut berperan sebagai penyebab adanya degenerasi pada tanaman krisan karena diperbanyak secara vegetatif terus menerus.

Tanaman krisan diperbanyak secara vegetatif melalui stek pucuk. Infeksi patogen yang bersifat sistemik, khususnya CMV, biasanya diturunkan dari induk keturunannya melalui stek pucuk. Jika tanaman sumber stek sudah terinfeksi oleh virus, maka stek-stek yang dihasilkan dari tanaman tersebut akan terinfeksi pula oleh virus.

Penggunaan benih krisan bebas virus tentunya akan meningkatkan produktivitas tanaman, sesuai dengan potensi kultivar yang dibudidayakan. Keberadaan virus pada tanaman induk dan stek pucuk perlu diketahui secara dini untuk mencegah penularan dari satu generasi ke generasi lain. Dengan demikian, metode pengujian keberadaan virus pada tanaman secara dini dan cepat sangat diperlukan untuk menunjang pengadaan benih bebas virus. Cara deteksi yang sekarang banyak digunakan adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang pertama kali dikembangkan untuk virus tanaman oleh Clark & Adams (1977). Antiserum poliklonal digunakan pada perangkat uji ELISA untuk mendeteksi virus pada tanaman. Hipotesis yang diuji dalam penelitian ini adalah terdapat paling sedikit satu periode pengambilan darah yang memberikan nilai absorbansi antiserum poliklonal yang tinggi dan bereaksi positif terhadap CMV pada tanaman krisan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan antiserum poliklonal terhadap CMV pada krisan untuk deteksi cepat.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, sejak April sampai dengan Desember 2000. Penelitian mencakup kegiatan di rumahkaca dan laboratorium.

### Sumber inokulum dan isolasi CMV

Sumber inokulum adalah tanaman krisan yang terinfeksi oleh CMV. Ekstrak daun krisan diinokulasikan secara mekanik pada tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* untuk isolasi virus dengan cara lesio lokal tunggal. Selanjutnya, lesio tunggal diinokulasikan pada *Nicotiana tabacum* Xanthi dan *Nicotiana glutinosa*. Uji serologi dengan metode ELISA dilakukan terhadap isolasi CMV asal krisan dengan antiserum CMV yang tersedia.

### Perbanyakan CMV

Isolat CMV diperbanyak pada *N. glutinosa*. Penularan CMV dilakukan secara mekanik yaitu daun *N. glutinosa* yang bergejala sistemik mosaik dihancurkan dalam penyangga fosfat  $K_2HPO_4$  1% yang mengandung 0,1% sodium sulfat pada 50 tanaman. Daun-daun yang bergejala sistemik mosaik selanjutnya digunakan untuk pemurnian CMV.

### Pemurnian CMV

Pemurnian virus dilakukan secara parsial, seperti yang diuraikan oleh Maeda (*dalam* Wahyuni & Sulyo 1996). Sebanyak 100 g daun tanaman *N. glutinosa* yang terinfeksi CMV dihancurkan dalam 200 ml larutan penyangga sitrat (0,5 M Na-sitrat, 0,005 M EDTA pH 6,5, mengandung 2% TGA, dan 100 ml karbon tetraklorida). Ekstrak daun selanjutnya disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit dengan alat sentrifugasi. Pellet dibuang dan supernatan ditambah 1% triton X-100, 8% PEG-6000, dan 0,05 M NaCl, diaduk selama 30 menit pada 4°C, kemudian disentrifus lagi pada 10.000 rpm selama 25 menit. Supernatan dibuang, pellet dilarutkan dalam larutan penyangga borat (0,005 M Na-tetraborat, 0,005 M EDTA, pH 9,0). Larutan selanjutnya disentrifus pada 10.000 rpm selama 10 menit. Pellet dibuang dan supernatan ditambah 1% triton X-100, 8% PEG-6000, dan 0,05 M NaCl, diaduk selama 30 menit pada 4°C dan disentrifus pada 10.000 rpm selama 25

menit. Pellet dilarutkan dalam penyangga borat dan diklarifikasi dengan sentrifus pada 10.000 rpm selama 5 menit. Larutan virus selanjutnya disimpan pada  $-20^{\circ}\text{C}$  dengan penambahan 50% gliserol. Konsentrasi virus dideteksi dengan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dengan spektrofotometer.

### Penyuntikan pada kelinci untuk produksi antiserum CMV

Kelinci disuntik setiap minggu dengan larutan CMV hasil pemurnian. Untuk penyuntikan pertama, sebanyak 1 ml larutan virus murni (konsentrasi 1 mg/ml) ditambah 1 ml *freund complete adjuvant* (1:1 v/v) dan distirer sampai terjadi emulsi kemudian disuntikkan pada kelinci melalui paha kaki. Penyuntikan selanjutnya dilakukan sebanyak enam kali dengan cara yang sama, tetapi menggunakan *freund incomplete adjuvant* (1:1 v/v). Pengambilan darah pertama dilakukan pada 3 minggu setelah penyuntikan pertama. Pengambilan darah selanjutnya dilakukan setiap minggu selama enam kali. Antiserum ditambah 0,02%  $\text{NaN}_3$  dan disimpan pada  $4^{\circ}\text{C}$  (Wahyuni & Sulyo 1996).

### Uji kepekaan antiserum CMV

Uji kepekaan antiserum dilakukan dengan metode ELISA tidak langsung mengikuti Hobbs *et al.* (1987) dan Mowatt & Dowson (1987). Empat macam sampel yaitu larutan CMV murni dengan pengenceran 1/10 dan 1/100, tanaman krisan yang terinfeksi CMV dengan pengenceran 1/10 dan 1/100, tanaman krisan sehat (kontrol) dan PBST (kontrol). Tahapan kerja adalah sebagai berikut (1) empat macam sampel di atas, sesuai pengenceran yang digunakan. Sampel tanaman krisan terinfeksi CMV dan sampel tanaman krisan sehat masing-masing ditimbang 0,2 g, kemudian dihancurkan dalam penyangga ekstraksi; (2) plate ELISA diisi dengan ekstrak sampel sesuai dengan pengenceran masing-masing 100  $\mu\text{l}$  per lubang (*direct antigen coating*); (3) kemudian plate ELISA diinkubasi 1 malam dalam lemari pendingin dengan suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ; (4) plate ELISA dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali sambil digoyang, masing-masing selama 3 menit; (5) *blocking* (dilarutkan 1% BSA atau *albumin egg powder* dalam PBS 1x). Kemudian dimasukkan 200  $\mu\text{l}$  ke dalam masing-masing lubang plate

ELISA dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar; (6) pencucian seperti tahap 4; (7) penyangga antibodi disiapkan: 2% BSA dilarutkan dalam PBS 1x. Selanjutnya dilarutkan antiserum dalam penyangga antibodi dengan pengenceran 1:500; (8) antiserum diabsorpsi terlebih dahulu dengan ekstrak daun krisan sehat dalam penyangga antibodi dengan perbandingan 1:20. Kemudian dicampurkan penyangga antibodi ke dalam ekstrak daun sehat, dengan pengenceran 1:10. Setelah itu ditambahkan antiserum sesuai pengenceran yaitu 1/100 dan 1/500, dibiarkan selama 4 sampai 5 menit (antiserum yang digunakan adalah antiserum dari enam kali periode pengambilan darah), 100  $\mu\text{l}$  larutan antiserum dimasukkan ke dalam tiap lubang plate ELISA; (9) plate ELISA diinkubasi selama 2 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ ; (10) dilakukan pencucian seperti tahap 4; (11) dilarutkan goat *anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate* dalam penyangga antibodi (SIGMA no. A-3937) (pengenceran 1:5.000), 100 ml dimasukkan ke dalam tiap lubang plate ELISA. Kemudian diinkubasi selama 1 malam dalam lemari pendingin dengan suhu  $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ; (12) pencucian seperti tahap 4; (13) ditambah p-nitrofenil fosfat dalam penyangga substrat (1 mg/ml). Sebanyak 100 ml ke dalam tiap lubang plate ELISA. Plate ELISA diinkubasi selama 60 menit atau sampai cairan dalam lubang ada yang berubah menjadi berwarna kuning jelas pada suhu ruang; (14) dihentikan reaksinya dengan penambahan 25 ml NaOH 3M ke dalam tiap lubang plate ELISA; dan (15) diamati reaksinya diukur absorbansinya dengan alat pembaca ELISA (dynatech lab. minireader II) dengan filter  $\text{Abs}_{405}$  nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi CMV

Isolasi CMV didapatkan dari tanaman krisan yang terinfeksi oleh CMV setelah dideteksi dengan metode ELISA. Ekstrak daun krisan tersebut diinokulasikan secara mekanik pada tanaman indikator *C. amaranticolor* untuk isolasi virus dengan cara lesio lokal tunggal. Selanjutnya, lesio tunggal diinokulasikan pada *N. tabacum* Xanthi dan *N. glutinosa*. Gejala pada tanaman *N. tabacum* Xanthi dan *N. glutinosa* adalah sistemik mosaik, yang merupakan ciri khas tanaman tembakau yang terinfeksi CMV. Selanjutnya tanaman

tembakau yang terinfeksi CMV akan digunakan untuk propagasi.

**Propagasi CMV**

Propagasi atau perbanyakn CMV dilakukan pada tanaman tembakau *N. glutinosa* yang menunjukkan gejala sistemik mosaik. Ekstrak CMV dari tembakau *N. glutinosa* diinokulasikan pada 50 tanaman tembakau *N. glutinosa*. Setelah 6-7 hari tanaman tembakau yang diinokulasi CMV akan menunjukkan gejala sistemik mosaik. Setelah tanaman tembakau seluruh daunnya menunjukkan gejala sistemik mosaik, maka dilanjutkan pemanenan daun yang bergejala sistemik mosaik untuk diproses pemurnian CMV.

**Pemurnian CMV**

Pemurnian CMV dilakukan terhadap daun-daun tembakau *N. glutinosa* yang bergejala sistemik mosaik seberat ± 100 g. Larutan CMV murni sebanyak 20 ml diperoleh dari proses pemurnian tersebut. Pengukuran absorbansi CMV murni diencerkan 10 kali dengan larutan penyangga fosfat. Pada panjang gelombang 230–300 nm. Absorbansi pada panjang gelombang 260 nm adalah 1,098. Berdasarkan nilai absorbansi tersebut, maka konsentrasi CMV dalam larutan dapat dihitung dengan rumus (Abs. 260)/5 x 10. Angka 5 adalah absorbansi pada 260 nm untuk larutan CMV dengan konsentrasi 1 mg/ml. Konsentrasi hasil pemurnian CMV pada penelitian ini adalah 1,098/5 x 10 = 2,196 mg/ml.

**Uji kepekaan antiserum CMV**

Tabel 1. Uji kepekaan antiserum CMV dengan metode ELISA tidak langsung (*Sensitivity test of CMV antiserum with indirect ELISA*).

Antiserum (Antibody)		Nilai absorbansi (A <sub>260nm</sub> )					
		Virus control (Positif virus)		Takaran 10-1000 (Dilusi) CMV (Konsentrasi antiserum di farmasi unit CMV)		Takaran standar (Antibody pair)	
Fraksi antibodi darah (Sampel)	Konsentrasi (Zona reaktif)	1:10	1:100	1:10	1:100	1:10	1:100
I	1:100	0,17	0,17	0,16	0,17	0,01	0,01
	1:200	0,17	0,16	0,16	0,16	0,01	0,01
II	1:100	0,18	0,16	0,16	0,16	0,01	0,01
	1:200	0,12	0,11	0,10	0,10	0,01	0,01
III	1:100	0,17	0,20	0,16	0,17	0,01	0,01
	1:200	0,10	0,10	0,10	0,09	0,01	0,01
IV	1:100	0,20	0,21	0,21	0,22	0,01	0,01
	1:200	0,19	0,20	0,19	0,20	0,01	0,01
V	1:100	0,21	0,21	0,09	0,09	0,01	0,01
	1:200	0,10	0,09	0,08	0,07	0,01	0,01
VI	1:100	0,20	0,21	0,20	0,22	0,01	0,01
	1:200	0,18	0,17	0,19	0,22	0,01	0,01

Pada Tabel 1 disajikan nilai absorbansi uji kepekaan antiserum CMV. Pada sampel CMV murni dengan pengenceran 1/10 dan 1/100, rata-rata nilai absorbansi pada antiserum pengambilan darah pertama dengan pengenceran 1/100 adalah 0,17 dan pengenceran 1/500 adalah 0,17 dan 0,16. Pada antiserum pengambilan darah keenam dengan pengenceran 1/100 adalah 0,20 dan 0,21; dan pengenceran 1/500 adalah 0,17 dan 0,18. Pada sampel tanaman krisan terinfeksi CMV dengan pengenceran 1/10 dan 1/100, rata-rata nilai absorbansi pada antiserum pengambilan darah pertama dengan pengenceran 1/100 adalah 0,16 dan 0,17; dan pengenceran 1/500 adalah 0,16. Pada antiserum pengambilan darah keenam dengan pengenceran 1/100 adalah 0,20 dan 0,22; dan pengenceran 1/500 adalah 0,19 dan 0,22. Pada sampel tanaman krisan sehat, rata-rata nilai absorbansi pada antiserum pengambilan darah pertama dengan pengenceran 1/100 adalah 0,03, dan pengenceran 1/500 adalah 0,00. Pada antiserum pengambilan darah keenam dengan pengenceran 1/100 adalah 0,03 dan pengenceran 1/500 adalah 0,04. Pada sampel PBST, rata-rata nilai absorbansi pada antiserum pengambilan darah pertama dengan pengenceran 1/100 adalah 0,00; dan pengenceran 1/500 adalah 0,00. Pada antiserum pengambilan darah keenam dengan pengenceran 1/100 adalah 0,00 dan pengenceran 1/500 adalah 0,00.

Pada hasil pengujian antiserum pengambilan darah pertama sampai pengambilan darah keenam

sudah bereaksi positif terhadap virus murni (CMV) ataupun pada jaringan tanaman krisan yang terinfeksi CMV pada pengenceran antiserum 1/100 dan 1/500. Tetapi hanya pada pengambilan darah ketiga dan kelima pada pengenceran 1/500 terhadap jaringan tanaman krisan yang terinfeksi CMV pada pengenceran 1/100 dengan angka absorbansi 0,05 dan 0,07 yang agak rendah. Hal ini diduga terkait dengan pembacaan angka absorbansi yang kurang tepat. Tidak tampak perbedaan nilai absorbansi karena pengenceran pada uji kepekaannya terhadap virus murni. Reaksi antiserum terhadap ekstrak jaringan tanaman krisan yang terinfeksi CMV menunjukkan reaksi positif (nilai absorbansi berkisar 0,05 – 0,22). Tidak tampak perbedaan nilai absorbansi, karena pengenceran pada uji kepekaan terhadap ekstrak jaringan tanaman krisan yang terinfeksi CMV. Tahapan absorbansi dengan ekstrak daun tanaman krisan sehat terhadap antiserum cukup efektif untuk menghilangkan adanya antibodi terhadap protein tanaman sehat. Hal ini dicirikan dengan tidak adanya reaksi positif terhadap ekstrak daun tanaman krisan sehat. Antiserum tersebut perlu dikembangkan lebih lanjut, melalui pemurnian immunoglobulin G untuk uji ELISA.

## KESIMPULAN

Hasil pengujian menunjukkan bahwa dari keenam pengambilan darah ternyata bereaksi positif, dengan konsentrasi antibodi dalam darah yang tidak selalu meningkat. Antiserum juga dapat digunakan untuk mendeteksi langsung terhadap ekstrak daun krisan yang terinfeksi CMV. Kepekaan antiserum tertinggi adalah pengambilan darah ke empat dan ke enam dengan konsentrasi 1/100 dan 1/500 terhadap pengenceran sampel 1/10 dan 1/100.

## PUSTAKA

1. Anonymous. 1993. Certification scheme: Pathogen-tested material of chrysanthemum. *EPPO Bull.* 23 (2):239-247.
2. Clark, M.F. and A.N. Adam. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*

34:475-483.

3. Douine, L., Quiot, J.B., Marchoux, G. and P. Archange. 1979. Recensement des especes vegetale sensibles au virus de la mosaïque du comcombre (CMV). *Ann. Phytopathol.* 11:439-475.
4. Duriat, A.S., Y. Sulyo, R. Sutarya, A. Muharam, E. Korlina dan A.A. Asandhi. 1992. Evaluasi penggunaan vaksin CARNA-5 pada tanaman cabai. *Bul. Penel. Hort.* 22(4):41-50.
5. Flasiński, S., Scott, S.W., Barnett, O.W. and Sun, C. 1995. Diseases of Peperomia, Impatiens, and Hibbertia caused by cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 79(8):843-848.
6. Hobbs, H.A., D.V. Reddy, R. Rajeshwari and A.S. Reddy. 1987. Use of direct antigen coating and protein A coating ELISA procedures for detection of three peanut viruses. *Plant Dis.* 71:747-749.
7. Hsu, Y.H., Lin, F.Z., Hu, C.C. and Yin, S.C. 1989. Host reaction, serology and RNA pattern of cucumber mosaic virus isolates. *Plant Prot. Bull.* 31:51-19.
8. Kaper, J.M. and H.E. Waterworth. 1981. Cucumovirus. Pp.257-332. In *Handbook of plant virus infections: Comparative diagnosis*. E. Kurstak (ed.). Biomedical Press. Elsevier/North Holland. Amsterdam, The Netherlands.
9. Mowatt, W.P. and S. Dowson. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *J. Virol. Methods* 15:233-247.
10. Wahyuni, W.S. and Y. Sulyo. 1996. Identification and classification of sixteen CMV isolates from Java. *RUT Res. Report*.
11. Smith, K.M. 1978. *A textbook of plant virus diseases*. 3<sup>rd</sup> ed. Longman Ltd. London. 684p.