Uji Kepekaan Antiserum Poliklonal untuk Deteksi Cepat CMV dengan Metode ELISA Tidak Langsung pada Tanaman Anthurium

Rahardjo I.B., E. Diningsih, dan Y. Sulyo

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

Naskah diterima tanggal 26 Juni 2006 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 15 Mei 2007

ABSTRAK. Virus mosaik ketimun (CMV) merupakan salah satu patogen penting pada berbagai tanaman hortikultura, termasuk tanaman anthurium. Untuk mengetahui secara dini infeksi virus pada tanaman, maka perlu dikembangkan metode deteksi cepat. Salah satu metode serologi yang paling banyak digunakan dewasa ini untuk deteksi virus secara cepat adalah ELISA. Penelitian ini bertujuan mengetahui konsentrasi optimal dari antiserum CMV untuk deteksi cepat pada tanaman anthurium. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung (1.100 m dpl.), dari bulan April sampai Juli 2005. Antiserum diproduksi dengan cara penyuntikan virus murni CMV secara bertahap pada kelinci dengan konsentrasi setiap penyuntikan sebesar 1 mg/ml yang dilakukan pada penelitian sebelumnya. **Konsentrasi antiserum diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm.** Pengujian kepekaan antiserum terhadap antigen dilakukan dengan metode ELISA tidak langsung. Hasil pengujian menunjukkan konsentrasi antiserum CMV dan pengenceran sampel yang optimal untuk deteksi CMV pada tanaman anthurium yang terinfeksi adalah masing-masing sebesar 1/1.000 dan 1/5, 1/1.000 dan 1/10.

Katakunci: *Anthurium* sp.; *Cucumber mosaic virus*; Antiserum poliklonal; ELISA tidak langsung; Sensitivitas antiserum.

ABSTRACT. Rahardjo, I.B., E. Diningsih, and Y. Sulyo. 2008. **Sensitivity Test of Cucumber Mosaic Virus Polyclonal Antisera for Rapid Detection of CMV with Indirect ELISA on Anthurium.** Cucumber mosaic virus is one of the major pathogens on some horticulture crops including Anthurium. A rapid detection method should be developed to support the evaluation of initial infection of the virus in crops. A serological method commonly used for rapid detection of plant viruses is ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). The objective of the experiment was to determine the optimum concentration of CMV antiserum for rapid detection on anthurium. The experiment was done in Virological Laboratory of Indonesia Ornament Crops Research Institute in Segunung (1.100 m asl.), from April to July 2005. A polyclonal CMV antiserum had been produced by injections of purified CMV into a rabbit with the concentration of 1 mg/ml each injection from previous research. Antiserum concentration was measured with the spectrophotometer at 280 nm wave length. The sensitivity tests of the antiserum was carried out with indirect ELISA method. The results showed that the optimum concentration of the antiserum and the optimum sample dilution for detection of CMV infected anthurium were 1/1,000 and 1/5, 1/1,000 and 1/10 respectively.

Keywords : *Anthurium* sp.; Cucumber mosaic virus; Polyclonal antiserum; Indirect ELISA; Antiserum sensitivity.

Anthurium (*Anthurium* sp.) merupakan salah satu tanaman hias yang menarik ditanam di pot. Bunga anthurium berwarna merah, merah muda, dan putih. Tanaman hias anthurium umumnya diperjualbelikan dalam bentuk bunga potong, ditanam di pot, atau berupa bibit.

Kebutuhan benih dan atau bibit tanaman hias, khususnya tanaman anthurium yang terus meningkat dari tahun ke tahun, menuntut penyediaan bibit bermutu yang bebas patogen sistemik, khususnya virus. Tanaman anthurium, diperbanyak secara vegetatif dan generatif melalui anakan dan biji. Jika bibit terinfeksi sejenis patogen sistemik yang laten (virus, viroid, dan fitoplasma) maka patogen tersebut akan

ditularkan ke bibit berikutnya atau ke tanaman sehat melalui vektor serangga.

Untuk meningkatkan nilai jual tanaman anthurium 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, memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan mutu produk dan ISO-14000 memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan lingkungan.

Salah satu kendala untuk meningkatkan mutu produksi, baik secara kualitas maupun kuantitas, adalah adanya infeksi yang disebabkan oleh penyakit virus mosaik ketimun (CMV = *cucumber mosaic virus*). Dalam usaha tani tanaman hias, khususnya tanaman anthurium, virus tanaman seperti virus mosaik ketimun merupakan salah satu penyakit yang belum banyak diperhitungkan jika dibandingkan dengan penyakit tanaman lainnya seperti cendawan dan bakteri. Hal ini disebabkan karena walaupun infeksi virus dapat menyebabkan tanaman tidak menghasilkan bahkan mematikan, akan tetapi kadang-kadang serangan tidak serentak, sehingga seolah-olah kerugian tidak begitu dirasakan. 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 (Anonim 1993). Berdasarkan penelitian terdahulu (Rahardjo et al. 2001, Hanudin et al. 2005, Rahardjo et al. 2004, Maryam ABN. et al. 2001), diketahui bahwa terdapat beberapa tanaman hias seperti krisan, anthurium, tapak dara, alpinia, costus, curcuma, dan zingiber, terinfeksi oleh CMV.

Virus mosaik ketimun merupakan patogen utama pada berbagai jenis tanaman sayuran, khususnya cabai dan tomat (Duriat et al. 1992). Virus tersebut dapat menyerang berbagai jenis tanaman yang tercakup lebih dari 1.000 spesies dari 100 famili (monokotil dan dikotil) dan dapat ditularkan oleh 86 spesies apid secara *nonpersisten* (Flasinski 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 tanaman hias di Indonesia, belum pernah dilaporkan. Walaupun demikian, virus tersebut diduga ikut berperan sebagai penyebab degenerasi pada tanaman hias karena diperbanyak secara vegetatif terus menerus. Di Eropa dilaporkan oleh Ammirato et al. (1990) CMV dapat menyebabkan pengurangan ukuran bunga 5%, dan pengurangan panjang batang 11% pada tanaman krisan. Tidak semua spesies tanaman hias yang terinfeksi virus tersebut menunjukkan gejala. Untuk mengetahui tanaman hias sudah terinfeksi atau belum,

diperlukan adanya perangkat deteksi yang akurat, peka, mudah, dan murah.

Gejala yang tampak pada tanaman anthurium yang terinfeksi CMV bervariasi bergantung berat atau lemahnya strain virus yang menginfeksi dan kerentanan tanaman. Pada tanaman anthurium yang bergejala berat, daun-daun tampak mosaik, karena distribusi perkembangan hijau daun yang tidak merata yang disebabkan oleh perkembangan virus. Kadang-kadang terjadi malformasi dengan bentuk daun yang tumbuh tidak normal atau bentuknya seperti menggulung. Lebih parah lagi jika bentuk dan warna spathe menjadi tidak normal. Pada tanaman anthurium yang bergejala ringan atau lemah, daun-daun tampak mosaik lemah dan bentuk bunga masih normal. Pada tanaman anthurium yang terinfeksi CMV dengan gejala pada daun tampak mosaik berat, seolah-olah memang memperlihatkan keindahan, padahal CMV akan menghambat pertumbuhan tanaman, umur tanaman menjadi relatif pendek, dan yang tidak kalah pentingnya adalah dapat menjadi sumber inokulum bagi tanaman lainnya.

Pada tanaman yang dibudidayakan, khususnya tanaman anthurium, virus sering sukar untuk dideteksi. Virus yang menginfeksi inang kadang-kadang tanpa memperlihatkan gejala yang jelas, atau memperlihatkan gejala yang mirip gangguan fisiologi (seperti defisiensi unsur hara), dan kelainan genetik. Dengan demikian, jika tanaman anthurium yang menampakkan gejala pada daun mosaik, maka perlu dicurigai bahwa tanaman terinfeksi virus.

Penggunaan benih/bibit tanaman hias termasuk tanaman anthurium bebas virus tentunya akan meningkatkan produktivitas tanaman sesuai dengan potensi kultivar yang dibudidayakan. Keberadaan virus pada tanaman induk dan benih perlu diketahui secara dini untuk mencegah penularannya dari satu generasi ke generasi berikutnya. Dengan demikian, metode pengujian keberadaan virus pada tanaman secara dini dan cepat sangat diperlukan untuk menunjang pengadaan benih bebas virus. Ada beberapa metode deteksi virus/viroid yang saat ini tersedia, seperti tanaman indikator, serologi, hibridisasi asam nukleat, mikroskop elektron, dan *polymerase chain reaction*. Cara deteksi yang dewasa ini banyak digunakan adalah ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) yang

mula-mula dikembangkan untuk deteksi virus tanaman oleh Clark dan Adam (1977). Hasil penelitian mengenai produksi antiserum CMV dapat digunakan untuk deteksi cepat dengan metode ELISA tidak langsung (Rahardjo *et al.* 2001). Uji kepekaan antiserum poliklonal CMV perlu dilakukan untuk pengembangan deteksi cepat dengan metode ELISA. Hipotesis yang diuji dalam penelitian ini adalah terdapat paling sedikit 1 konsentrasi antiserum dan pengenceran sampel yang optimum memberikan nilai absorbansi antiserum poliklonal yang tinggi yang bereaksi positif terhadap CMV pada tanaman anthurium yang terinfeksi CMV.

Tujuan penelitian adalah mengetahui konsentrasi optimal antiserum CMV untuk deteksi cepat pada tanaman anthurium.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Pacet, Cianjur, Jawa Barat (1.100 m dpl), dari bulan April sampai dengan Juli 2005.

Tanaman Anthurium

Tanaman anthurium yang digunakan sebagai sampel adalah tanaman anthurium yang terinfeksi CMV dengan menampilkan gejala mosaik pada daun dan terjadi malformasi pada helaian daunnya.

Antiserum CMV

Antiserum merupakan koleksi Balai Penelitian Tanaman Hias yang diproduksi dengan cara menyuntikkan CMV murni yang berasal dari cabai secara bertahap pada kelinci dengan konsentrasi setiap penyuntikan sebanyak 1 mg/ml yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Rahardjo *et al.* 2001). Antiserum kasar ditentukan pada pengambilan darah yang diduga cukup tinggi konsentrasinya. Dari beberapa kali pengukuran konsentrasi antiserum kasar pada panjang gelombang 280 nm menggunakan spektrofotometer diketahui konsentrasi cukup tinggi, yaitu 1 mg/ml pada pengambilan darah keempat sampai kesembilan dari 9 kali pengambilan darah. Pada penelitian

ini digunakan antiserum kasar dari pengambilan darah kesembilan untuk uji kepekaan antiserum CMV.

Uji Kepekaan Antiserum CMV

Uji kepekaan antiserum terhadap antigen dilakukan dengan metode ELISA tidak langsung (Hobbs *et al.* 1987), Mowatt dan Dowson (1987). Tiga macam sampel, yaitu tanaman anthurium terinfeksi CMV dengan pengenceran 1/5, 1/10, 1/50, dan 1/100, tanaman sehat (kontrol 1) dan PBST 1x (kontrol), dengan tahapan sebagai berikut. (1) 3 macam sampel di atas sesuai pengenceran yang digunakan, yaitu jaringan tanaman anthurium terinfeksi CMV dan jaringan tanaman anthurium 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 µl per lubang (*direct antigen coating*), (3) kemudian *plate* ELISA diinkubasi 1 malam dalam lemari pendingin dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$, (4) selanjutnya *plate* ELISA dicuci dengan PBST sebanyak 3 kali sambil digoyang, masing-masing selama 3 menit, (5) kemudian dilakukan *blocking* (dilarutkan 1% BSA atau *egg albumin powder* dalam PBS 1x). Sebanyak 200 µl larutan *blocking* ke dalam masing-masing lubang *plate* ELISA dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar, (6) lakukan pencucian seperti tahap 4, (7) penyangga antibodi disiapkan 2% BSA dilarutkan dalam PBS 1x, (8) antiserum CMV diabsorpsi terlebih dahulu dengan ekstrak daun tembakau sehat dalam penyangga antibodi dengan perbandingan 1:20, kemudian campurkan penyangga antibodi ke dalam ekstrak daun sehat dengan pengenceran 1:10, selanjutnya ditambahkan antiserum CMV sesuai pengenceran, yaitu 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/5.000, dan 1/10.000, larutan dibiarkan selama 4-5 menit. Sebanyak 100 µl larutan antiserum CMV dimasukkan ke dalam tiap lubang *plate* ELISA, (9) *plate* ELISA diinkubasi selama 1 malam dalam lemari pendingin dengan suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$, (10) lakukan pencucian seperti tahap 4, (11) larutkan *goat anti-rabbit alkaline phosphatase conjugate* (SIGMA no. A-3937) dalam penyangga antibodi pengenceran 1:5.000. Masukkan 100 µl ke dalam tiap lubang *plate* ELISA. Setelah itu *plate* diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C ,

(12) lakukan pencucian seperti tahap 4, (13) tambahkan p-nitrofenil fosfat ke dalam penyangga substrat (1 mg/ml) sebanyak 100 µl ke dalam tiap lubang *plate* ELISA. *Plate* ELISA diinkubasi selama 1 jam atau sampai cairan dalam lubang ada yang berubah menjadi berwarna kuning jelas pada suhu ruang, (14) reaksi dihentikan dengan penambahan 25 µl NaOH 3M ke dalam tiap lubang *plate* ELISA, dan (15) perubahan warna diukur absorbansinya menggunakan alat pembaca ELISA (Dynatech Lab. minireader II) dengan filter Abs₄₁₀ nm.

Peubah yang Diamati

Peubah yang diamati meliputi (1) nilai absorbansi pada konsentrasi pengenceran sampel tanaman anthurium (1/5, 1/10, 1/50, dan 1/100), dan (2) nilai absorbansi pada konsentrasi pengenceran antiserum CMV (1/100, 1/500, 1/1.000, 1/5.000, dan 1/10.000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Kepekaan Antiserum CMV

Nilai absorbans hasil uji kepekaan antiserum CMV dengan metode ELISA tidak langsung terdapat pada Tabel 1. Sampel yang diuji disebut positif jika nilai absorbans lebih besar atau sama dengan 2 kali absorbans sampel sehat. Nilai absorbans pada sampel sehat yang tertinggi 0,03. Nilai absorbans paling tinggi pada konsentrasi antiserum CMV 1/100 dengan pengenceran sampel sakit 1/10, yaitu 0,35 (positif). Nilai absorbans yang paling rendah untuk sampel

sakit pada konsentrasi antiserum CMV 1/5.000-1/10.000 dengan pengenceran sampel sakit 1/50 dan konsentrasi antiserum CMV 1/1.000-1/10.000 dengan pengenceran sampel sakit 1/100, yaitu 0,00 (negatif). Pada Tabel 1 juga dapat dilihat bahwa konsentrasi antiserum CMV 1/100 memberikan reaksi positif terhadap seluruh pengenceran sampel 1/5-1/100, yaitu 0,33-0,17. Konsentrasi antiserum CMV 1/500 memberikan reaksi positif terhadap pengenceran sampel 1/5-1/10 yaitu 0,33-0,31. Konsentrasi antiserum CMV 1/1.000 memberikan reaksi positif terhadap pengenceran sampel 1/5-1/10 yaitu 0,29-0,27. Konsentrasi antiserum CMV 1/5.000 memberikan reaksi positif terhadap pengenceran sampel 1/5-1/10, yaitu 0,15-0,11. Konsentrasi antiserum CMV 1/10.000 memberikan reaksi negatif terhadap seluruh pengenceran sampel 1/5-1/100, yaitu 0,06-0,00. Dari Tabel 1 diketahui bahwa pengenceran semakin besar pada konsentrasi antiserum dan sampel sakit, maka nilai absorbans yang terbaca semakin kecil.

Tahap absorbans terhadap antiserum dengan ekstrak daun anthurium sehat ternyata cukup efektif untuk menghilangkan reaksi nonspesifik yang sering terjadi pada aplikasi ELISA tidak langsung. Hal tersebut ditunjukkan dengan adanya reaksi yang negatif antara antiserum yang diabsorpsi dan sampel sehat yang nilai absorbansnya lebih kecil dari 0,1. Dari Tabel 1 dapat dilihat bahwa konsentrasi antiserum CMV dan pengenceran sampel yang optimal untuk deteksi CMV pada tanaman anthurium yang terinfeksi adalah masing-masing sebesar 1/1.000 dan 1/5-1/10, 1/500 dan 1/10. Konsentrasi

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

Konsentrasi antiserum (<i>Concentration of antiserum</i>)	Nilai absorbans pada 405 nm (<i>Absorbance at 405 nm</i>)					
	Sampel (<i>Sample</i>) ³⁾					
	Tanaman sakit (<i>Infected plants</i>) ¹⁾				Tanaman sehat (<i>Healthy plants</i>) ²⁾	Penyangga (<i>Buffer</i>)
	1/5	1/10	1/50	1/100		
1/100	0,33	0,35	0,31	0,17	0,03	0,00
1/500	0,33	0,31	0,04	0,03	0,02	0,00
1/1.000	0,29	0,27	0,01	0,00	0,02	0,00
1/5.000	0,15	0,11	0,00	0,00	0,01	0,00
1/10.000	0,06	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00

¹⁾ Daun anthurium terinfeksi CMV (*CMV infected anthurium leaves*)

²⁾ Daun anthurium bebas virus (*virus free anthurium leaves*).

³⁾ Diulang 2 kali (*two replications (duplo)*)

antiserum CMV dan pengenceran sampel 1/100 dan 1/50 menunjukkan nilai absorbans yang tinggi, tetapi penggunaan konsentrasi antiserum CMV 1/100 kurang ekonomis dibandingkan dengan konsentrasi antiserum CMV 1/500 dan 1/1.000. Menurut Wisler *et al.* (1982), nilai absorbansi yang optimal akan diperoleh dengan penggunaan konsentrasi antiserum yang tepat.

KESIMPULAN

Hasil pengujian kepekaan antiserum poliklonal CMV untuk deteksi CMV pada tanaman anthurium yang terinfeksi dengan uji ELISA tidak langsung menunjukkan bahwa konsentrasi antiserum CMV dan pengenceran sampel yang optimal adalah masing-masing sebesar 1/1.000 dan 1/5, 1/1.000 dan 1/10.

PUSTAKA

1. Ammirato, P.V., D.A. Evans, W.R. Sharp, and Y.P.S. Bajaj. 1990. *Handbook of Plant Cell Culture (Ornamental Species)* Volume 5. Mc Graw-Hill Publishing Company. New York. USA. 833p.
2. Anonim. 1993. Certification Scheme : Pathogen-tested Material of Chrysanthemum. *EPPO Bull.* 23(2):239-247.
3. 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.
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., S. W. Scott, O. W. Barnett, and C. Sun. 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., F. Z. Lin, C. C. Hu, and S.C. Yin. 1989. Host Reaction, Serology and RNA Pattern of Cucumber Mosaic Virus Isolates. *Plant Prot. Bull.* 31:51-59.
8. Rahardjo, I.B., A. Muharam, dan Y. Sulyo. 2001. Studi Pembuatan Antiserum Poliklonal Untuk Deteksi Cepat Virus Mosaik Mentimun Pada Krisan. *J. Hort.* 15(2):124-128.
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. Wisler, G.C., F.W. Zettler, and D.F. Purcifull. 1982. A Serodiagnostic Technique for Detecting Cymbidium Mosaic and Odontoglossum Ringspot Viruses. *Phytopathol.* 72:835-837.