

DETEKSI *TURNIP MOSAIC VIRUS* PADA JARINGAN BENIH DAN DAUN

Kartiningtyas¹ dan Sri Hendrastuti Hidayat²

ABSTRACT

Detection of Turnip mosaic virus in seed and leaf tissue. The study was conducted to test the seed transmission efficiency of Turnip mosaic virus (TuMV) on caisin (*Brassica rapa*) and the susceptibility of plant to the virus at different ages. Two detection techniques, ELISA and RT-PCR, were used to determine the more appropriate method for detection of TuMV. Two different sources of seeds involved those from farmer and commercial seeds were collected from West Java and Central Java. TuMV was inoculated on test plants at 2, 4, 6, 8, and 10 weeks after transplanting. Infected plants were confirmed using ELISA and RT-PCR techniques with specific antiserum and primer. TuMV was detected from farmer seeds originated from Ciherang and Cinangneng with percent infection of 15% and 2% , respectively. Plant growth and symptom development were affected by time of infection. In general, TuMV infection caused symptoms, mosaic, malformation, vein clearing, and blister on the leaf. The youngest plants were more susceptible and shown more severe symptoms. Absorbent value of ELISA from infected plants was in the range of 2.1 – 2.4. Specific DNA band, 800 bp, was amplified from infected plants.

Key words : *Brassica rapa*, ELISA, RT-PCR, *Turnip Mosaic Virus*.

PENDAHULUAN

Tanaman caisin yang berasal dari Cina telah dikenal sejak 2500 – 2000 SM, dan saat ini sudah sangat populer di masyarakat. Daun caisin umumnya digunakan sebagai bahan sayuran dan mengandung zat gizi yang cukup lengkap. Permintaan pasar akan jenis sayuran ini sangat besar, oleh karena itu caisin mempunyai nilai ekonomi tinggi baik di Indonesia maupun di dunia (Cahyono 2003). Pengembangan budidaya caisin mempunyai prospek yang baik, antara lain dapat mendukung peningkatan pendapatan petani, peningkatan gizi masyarakat, perluasan kesempatan kerja, pengembangan agribisnis, peningkatan pendapatan negara melalui pengurangan impor sehingga memacu pertumbuhan ekspor. Adanya gangguan hama dan penyakit dalam sistem budidaya caisin mengakibatkan pengembangan komoditi ini terganggu bahkan menurun.

Salah satu penyebab penyakit pada tanaman caisin adalah *Turnip mosaic virus* (TuMV). Dari hasil survei yang dilakukan peneliti pada bulan Februari 2005, TuMV telah mengakibatkan gagal panen pada lahan budi daya caisin di Desa Methuk, Kabupaten Boyolali, Jawa Tengah, dengan kejadian penyakit sebanyak 100 %. *Turnip mosaic virus* dapat menyerang tanaman pada fase pembibitan, pertumbuhan vegetatif, pembungaan, dan pembuahan

bagian tanaman. Infeksi TuMV pada tanaman caisin dapat menyebabkan produksi benih menurun, ukuran benih mengecil, bentuk benih mengalami malformasi, dan viabilitas benih akan menurun (Walsh & Tomlinson, 1985). Infeksi TuMV bisa terjadi bersamaan dengan infeksi virus lain seperti *Cucumber mosaic cucumovirus* dan *tobamovirus* (Chiu & Chang 1982). Di Eropa, TuMV sering menginfeksi bersamaan dengan *Cauliflower mosaic caulimovirus* (Hardwick *et al.* 1994; Zitter & Providenti 1984), *Broccoli necrotic yellows cytorhabdovirus* (Walsh & Tomlinson, 1985), dan *Beet western yellows luteovirus* (Hardwick *et al.* 1994). Gejala biasanya lebih parah bila tanaman terinfeksi secara bersamaan dengan virus lainnya (Sano & Kojima 1989).

Salah satu upaya untuk mencegah penyebaran penyakit adalah melalui deteksi virus secara dini. *Turnip mosaic virus* dapat dideteksi antara lain dengan menggunakan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Pengujian dengan ELISA didasarkan pada sifat selubung protein virus, sedangkan pengujian dengan RT-PCR didasarkan pada sifat RNA virus. Akurasi, kepekaan, dan keefektifan kedua teknik tersebut perlu dianalisis untuk menentukan metode deteksi yang terbaik untuk TuMV yang terbawa benih.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji

¹ Alumnus Jurusan Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

² Dosen Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper Kampus IPB Darmaga, Bogor

mempelajari pengaruh infeksi TuMV pada umur tanaman yang berbeda. Melalui penelitian akan dibandingkan dua teknik deteksi untuk TuMV yaitu ELISA dan RT-PCR. Hasil penelitian ini diharapkan akan memberikan informasi mengenai efisiensi penularan TuMV melalui benih. Hal tersebut dapat menjadi landasan dalam program sertifikasi benih terutama untuk menghindari penggunaan benih yang terinfeksi. Kajian terhadap teknik ELISA dan RT-PCR akan memberikan gambaran mengenai kelebihan dan kekurangan kedua teknik deteksi tersebut, sehingga teknik yang tepat untuk mendeteksi TuMV dapat diterapkan sesuai dengan tujuan dan kondisi yang ada.

METODE PENELITIAN

Uji Virus Terbawa Benih. Sampel benih tanaman caisin (*Brassica rapa*) dikumpulkan dari berbagai sumber, yaitu dari petani dan penyalur benih (toko bahan-bahan pertanian). Benih lokal yang digunakan berasal dari 2 lokasi di Jawa Barat yaitu dari Desa Cinangneng (Kabupaten Bogor) dan Desa Ciherang (Kabupaten Cianjur), serta 2 lokasi di Jawa Tengah yaitu dari Desa Methuk (Kabupaten Boyolali) dan Desa Kalisoro - Tawang Mangu (Kabupaten Karanganyar). Benih yang berasal dari penyalur benih adalah benih Sang Hyang Seri (Kabupaten Subang) dan Kwang Fu (Taiwan-Republik China).

Benih tersebut disemai pada baki persemaian dan jumlah benih yang diuji adalah 100 benih untuk setiap jenis sampel. Pertumbuhan benih diamati setiap hari untuk mengetahui timbulnya gejala. Setelah tanaman berumur 2 minggu dilakukan uji serologi dengan metode ELISA tidak langsung (I-ELISA). Banyaknya virus terbawa benih dihitung dengan rumus:

$$\text{Persentase virus terbawa benih} = \frac{\text{Jumlah bibit positif ELISA}}{\text{Jumlah total bibit}} \times 100\%$$

Infeksi TuMV pada Berbagai Umur Tanaman.

Tanaman uji yang digunakan adalah tanaman caisin varietas lokal yang berasal dari Desa Methuk. Sebanyak 100 benih disemai pada baki pembibitan. Setelah bibit berumur 2 minggu, bibit dipindahkan ke dalam *polybag* berukuran 20 cm X 25 cm dengan media tumbuh terdiri atas campuran tanah steril dan pupuk kandang steril dengan perbandingan 2 : 1, masing-masing *polybag* ditanami 1 bibit. Tanaman tersebut dipelihara dalam tempat kedap serangga

sampai siap diinokulasi. Sumber inokulum virus berasal dari daun tanaman caisin yang terinfeksi TuMV isolat Tumpangan (Kabupaten Malang-Jawa Timur), yang merupakan koleksi Laboratorium Virologi Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor.

Inokulasi mekanis dilakukan pada berbagai umur tanaman yaitu: 2 minggu setelah tanam (mst), 4 mst, 6 mst, 8 mst, dan 10 mst. Masing-masing minggu perlakuan digunakan 10 tanaman untuk diinokulasi dengan TuMV dan 5 tanaman untuk diinokulasi dengan larutan penyangga inokulasi (kontrol negatif). Inokulasi secara mekanis dilakukan dengan terlebih dahulu menyiapkan cairan perasan tanaman sakit. Cairan perasan tanaman tersebut disiapkan dengan menggerus daun tanaman sakit dalam mortar yang telah diberi larutan penyangga inokulasi, yaitu larutan penyangga fosfat, dengan perbandingan berat basah daun dan larutan penyangga inokulasi adalah 1 : 5 (b/v). Serbuk *carborundum* ditaburkan pada daun tanaman uji yang akan diinokulasi. Daun untuk inokulasi dipilih paling sedikit dua daun dari tiap tanaman. Pengolesan cairan perasan tanaman sakit dilakukan dengan salah satu jari tangan yang dibungkus dengan plastik. Tanaman yang telah diinokulasi kemudian ditempatkan pada kurungan kedap serangga.

Deteksi Virus dengan Metode I-ELISA. Sebelum memulai prosedur I-ELISA, disiapkan terlebih dahulu *coating buffer* yang diperoleh dengan mencampurkan 0,159g *sodium carbonate (anhydrous)*, 0,293g *sodium bicarbonate*, 0,02g *sodium azide*, *aquadest* sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga volume akhir larutan menjadi 100 ml, selanjutnya pH larutan diatur hingga mencapai pH 9,6. Daun tanaman yang akan diuji digerus dalam *coating buffer* dengan perbandingan 1 : 10 (b/v) untuk memperoleh cairan perasan tanaman. Untuk pencucian plat mikrotiter disiapkan *phosphate buffer saline tween* (PBST) yang merupakan campuran dari 8,0g *sodium chloride*, 1,15 g *sodium phosphate dibasic*, 0,2g *potassium chloride*, 0,5 g *Tween-20*, dilarutkan dalam *aquadest* hingga volume mencapai 1000 ml dengan pH 7,4. Antibodi dan konjugat dilarutkan dalam *ECl buffer* (pH 7,4) yang terdiri dari 0,2 *bovine serum albumin* (BSA), 2,0 g *polyvinylpyrrolidone* (PVP), 0,02g *sodium azide*, dan 100 ml PBST. Antibodi yang digunakan adalah antibodi TuMV, sedangkan konjugat yang digunakan adalah *Anti-Rabbit IgG (Alkaline Phosphatase Conjugate*, Sigma USA). Antibodi dan konjugat masing-masing diencerkan dalam *ECl buffer* dengan

perbandingan antibodi / konjugat : *ECl buffer* adalah 1 : 1000. Substrat enzim yang digunakan adalah *P-nitrophenil phosphate* (PNP), yang terdiri dari *PNP buffer* dan tablet PNP (Agdia Inc, Elkhart, Indiana, USA).

Secara berurutan, tahapan uji I-ELISA adalah:

- 1) Mengisi lubang sumuran pada plat mikrotiter dengan cairan perasan tanaman yaitu 100 µl tiap lubang sumuran;
- 2) Plat mikrotiter ditutup dengan kertas lembab dan disimpan dalam kotak plastik yang telah diberi alas kertas basah agar cairan tidak mudah menguap atau kering, dan diinkubasi selama semalam pada suhu 4 °C atau dalam suhu ruang selama 2 – 4 jam;
- 3) Plat mikrotiter dicuci sebanyak 4 – 8 kali dengan PBST;
- 4) Plat mikrotiter diisi antibodi TuMV sebanyak 100 µl tiap lubang sumuran, diinkubasi selama semalam pada suhu 4°C atau dalam suhu ruang selama 2 – 4 jam;
- 5) Plat mikrotiter dicuci dengan PBST sebanyak 4 – 8 kali;
- 6) Ke dalam tiap lubang sumuran ditambahkan 100 µl enzim konjugat dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 2 – 4 jam;
- 7) Plat mikrotiter dicuci kembali dengan PBST sebanyak 4 – 8 kali;
- 8) Plat mikrotiter diisi dengan enzim substrat (PNP) yaitu 100 µl tiap lubang sumuran dan diinkubasikan selama 30 – 60 menit pada suhu ruang, sambil diamati perubahan warna yang muncul;
- 9) Setelah terjadi perubahan warna menjadi kuning, reaksi segera dihentikan dengan menambahkan 3M Sodium hidroksida. Analisis hasil I-ELISA secara kuantitatif dilakukan menggunakan ELISA *reader* pada panjang gelombang A 405 nm (Vicaino & Alvarez 1987).

Deteksi Virus dengan Metode RT-PCR. Tahapan RT-PCR berturut-turut adalah: ekstraksi RNA total dari jaringan daun, amplifikasi RT-PCR, dan visualisasi DNA.

Ekstraksi RNA Total dari Jaringan Daun. Ekstraksi RNA total dari sampel tanaman mengikuti metode Chomczynski & Sacchi (1987). Daun tanaman sakit 0,05g digerus dengan nitrogen cair hingga menjadi bubuk, ditambah 500 µl trizol, dimasukkan ke dalam tabung ependorf, setelah itu ditambah *chloroform*, divorteks, diinkubasi pada suhu 15°C – 30°C selama 10 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil (kurang lebih 400 µl) dan ditambahkan 250 µl isopropanol, divorteks, diinkubasi pada suhu 15°C – 30°C selama 10 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Setelah itu supernatan

dibuang, dan pelet dicuci dengan etanol 70%, dikocok sampai pelet lepas dari dasar tabung, disentrifugasi 7.000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang. Pelet yang diperoleh dikeringanginkan selama 15 – 20 menit kemudian diresuspensi dengan 10 µl *diethylpyrocarbonate* (DEPC) *water*. Suspensi tersebut dapat langsung digunakan untuk reaksi RT-PCR atau disimpan pada suhu 4°C.

Amplifikasi DNA dengan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Metode yang dilakukan dalam reaksi RT-PCR adalah dengan menggunakan *Ready To-Go RT-PCR Beads* (Amersham Pharmacia Biotech, USA). Dalam setiap tabung RT-PCR terdapat satu butir campuran yang mengandung 2,5 unit *Pure Taq DNA polymerase*, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 pada suhu ruangan), 50 Mm KCl, 1,5 Mm MgCl₂, 200 µM dNTP, stabilisator, BSA. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan 5 µl RNA hasil ekstraksi, 2 µl oligo dT, 2 µl primer TuMV-*F* (8705-8726) 5'-CAA-GCA-ATC-TTT-GAG-GAT-TAT-G-3' 10 pmol / µl, 2 µl primer TuMV-*R* (9690-9669) 5'-TAT-TTC-CCA-TAA-GCG-AGA-ATA-C-3' 10 pmol / µl, dan 39 µl ddH₂O sehingga volume total reaksi mencapai 50 µl. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin GeneAmp: PCR System 9700 Perkin Elmer. Program amplifikasi terdiri atas reaksi transkripsi balik (RT) (merubah RNA menjadi cDNA) dan siklus PCR (amplifikasi cDNA). Reaksi RT dilakukan pada suhu 42°C selama 1 jam, sedangkan PCR terdiri atas : satu siklus inisiasi untuk denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit; 30 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 50°C selama 30 detik, dan sintesis DNA pada suhu 72°C selama 1 menit; serta satu siklus lanjutan pada suhu 72°C selama 5 menit. Suhu pada akhir siklus dipertahankan pada 4°C sampai sampel siap digunakan.

Visualisasi DNA. DNA hasil amplifikasi kemudian dianalisis dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa (1,5 %). Gel agarosa disiapkan dengan mencampurkan 0,3g agarosa dalam 20 ml *Tris-acatae* (TAE) 1 X, kemudian ditambah 2 µl etidium bromida. Estimasi ukuran DNA dilakukan dengan menggunakan penanda DNA 1 kb *ladder* (Sigma, USA). Campuran 8 µl DNA hasil PCR dan 2 µl pewarna dimasukkan ke dalam sumuran gel menggunakan pipet mikro kemudian dielektroforesis

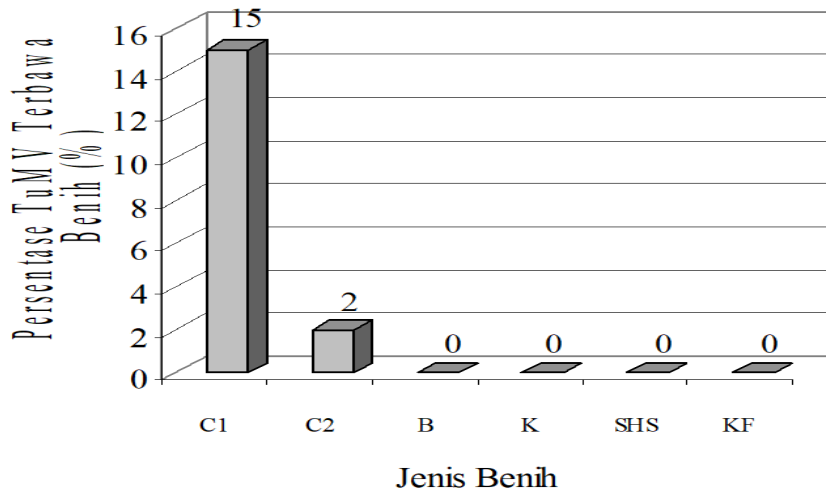
pada tegangan 70 Volt selama 90 menit. Setelah itu gel divisualisasi dengan UV *Transluminator* (Sambrook *et al.* 1989).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji Virus Terbawa Benih. Hasil uji serologi dengan teknik deteksi I-ELISA dari 6 jenis benih yaitu benih Ciherang, benih Cinangneng, benih Methuk, benih Kalisoro, benih Sang Hyang Seri, dan benih Kwang Fu dilakukan pada saat bibit caisin berumur 2 MST. Terdapat sampel benih yang menunjukkan hasil positif terhadap antiserum TuMV yaitu benih Ciherang (15 % terinfeksi) dan benih Cinangneng (2 % terinfeksi) yang keduanya merupakan benih yang dihasilkan sendiri oleh petani. Benih Methuk, benih Kalisoro, benih Sang Hyang Seri, dan benih Kwang Fu bereaksi negatif (Gambar 1). Benih yang bereaksi positif pada uji I-ELISA belum memperlihatkan gejala pada saat dilakukan pengujian (2 MST). Hal tersebut membuktikan bahwa infeksi virus tidak selamanya menunjukkan gejala dan teknik I-ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi adanya virus terbawa benih.

wawancara dengan petani penghasil benih lokal, penentuan tanaman yang akan menjadi sumber benih hanya berdasarkan pada penampakan luar. Umumnya tanaman yang dipilih adalah tanaman caisin yang berdaun bulat dengan pertumbuhan tanaman yang bagus. Tanaman caisin tersebut kemudian dipindahkan ke dalam satu petak khusus dan dipelihara sampai menghasilkan polong. Polong yang sudah masak (berwarna kecoklatan) kemudian dipanen dan dijemur pada nampan, setelah kering kemudian dirontokkan agar diperoleh biji caisin. Biji tersebut kemudian disimpan dalam botol dan ditanam pada musim tanam berikutnya tanpa dilakukan pengujian benih. Lahan yang digunakan untuk budidaya caisin ditanami caisin terus menerus, tanpa adanya rotasi tanaman dan pemberaan tanah, sehingga inokulum virus yang tertinggal pada sisa-sisa tanaman ataupun yang menyerang gulma dan tanaman lain di sekitar pertanaman caisin dapat mengakibatkan terdapatnya inokulum virus dari waktu ke waktu.

Produsen benih pada umumnya menanam tanaman sumber benih pada lahan khusus yang terisolasi. Selain itu tanaman yang digunakan sebagai penghasil benih memang khusus ditanam untuk



Gambar 1. Persentase TuMV terbawa benih pada 6 jenis benih yang berbeda.

C1 : Ciherang; C2 : Cinangneng; B : Methuk; K : Kalisoro; SHS : Sang Hyang Seri; KF : Kwang Fu

Hasil uji benih ini membuktikan bahwa benih yang dihasilkan petani mempunyai kemungkinan terinfeksi TuMV lebih tinggi daripada benih yang berasal dari produsen benih. Menurut hasil

diambil benihnya serta dilakukan pengawasan produksi benih di lapang yang meliputi pengawasan saat fase vegetatif, pengawasan fase generatif, dan pengawasan pasca panen. Setelah benih-benih

tersebut dipanen, selanjutnya dilakukan pengujian benih berdasarkan acuan ISO / IEC 17025 (SNI-19-17025-2000) dan ISTA (*International Seed Testing Association*) Rules yang sudah diakui secara internasional (Direktorat Jenderal Bina Produksi Tanaman Pangan 2004). Pengujian benih tersebut meliputi kegiatan-kegiatan: a) Pengambilan contoh benih; b) Penetapan kadar air benih; c) Analisis kemurnian; d) Pengujian daya kecambah; e) Pengujian viabilitas benih secara biokhemis; f) Penetapan berat 1000 butir; g) Penetapan heterogenitas; h) Pengujian kesehatan benih; i) Pengujian verifikasi/keaslian varietas; j) Pengujian vigor benih (Direktorat Jenderal Bina Produksi Tanaman Pangan 2004). Dengan adanya pengawasan produksi benih dan pengujian benih, maka benih yang tidak lolos pengujian akan disisihkan sehingga kemungkinan adanya TuMV terbawa benih semakin kecil.

Infeksi TuMV pada Berbagai Umur Tanaman.

Inokulasi TuMV secara mekanis dilakukan secara terpisah pada berbagai umur tanaman, yaitu saat umur tanaman 2 mst, 4 mst, 6 mst, 8 mst, dan 10 mst. Tanaman yang diinokulasi pada saat berumur 2 mst akan mati dalam waktu 2 hari setelah inokulasi, baik tanaman yang diinokulasi TuMV maupun tanaman yang hanya diinokulasi dengan larutan penyangga inokulasi. Perbedaan pertumbuhan tanaman antara tanaman yang diinokulasi dengan TuMV dengan tanaman yang hanya diinokulasi dengan larutan penyangga inokulasi terlihat jelas pada tanaman yang diinokulasi saat berumur 4 mst, 6 mst, dan 8 mst, sedangkan pada 10 mst tidak terdapat perbedaan pertumbuhan tanaman. Tanaman yang diinokulasi TuMV pada saat berumur 4 mst akan mengalami gangguan pertumbuhan sehingga tanaman menjadi kerdil, bahkan 3 tanaman mati pada saat 2 minggu setelah inokulasi.

Masa inkubasi TuMV pada tanaman yang diinokulasi saat 4, 6, 8 mst adalah 8 – 10 hari, sedangkan masa inkubasi pada tanaman yang diinokulasi saat 10 mst adalah 9 – 10 hari. Gejala yang terbentuk pada umumnya tampak pada bagian daun berupa mosaik, malformasi, *vein clearing*, melepuh. Tanaman yang diinokulasi saat 4 mst juga memperlihatkan gejala kerdil, serta ukuran daun yang kecil. Tanaman yang diinokulasi saat 6 dan 8 mst daunnya dapat membesar tetapi tidak mencapai ukuran normal, sedangkan tanaman yang diinokulasi pada umur 10 mst kejadian malformasi hanya terdapat pada tunas yang baru muncul, tidak terdapat gejala

pelepuhan, dan pertumbuhan tanaman yang diinokulasi dengan TuMV hampir sama dengan tanaman yang hanya diinokulasi dengan larutan penyangga inokulasi.

Penghambatan pertumbuhan tanaman caisin juga dipengaruhi oleh suhu di rumah kaca yang terlalu tinggi, yaitu berkisar antara 27°C – 35°C. Menurut Rubatzky & Yamaguchi (1998), pertumbuhan optimum tanaman caisin tercapai pada suhu antara 15°C – 20°C. Pada kisaran suhu tersebut kualitas produk terbaik tanaman caisin dapat tercapai. Suhu yang lebih tinggi dari 25°C umumnya menekan pertumbuhan dan menunda pembungaan. Menurut Cahyono (2003) tanaman caisin berbunga pada umur 40 hari setelah semai, tetapi karena adanya infeksi TuMV dan suhu yang terlalu tinggi di rumah kaca, mengakibatkan tertundanya pembungaan, bahkan sebagian besar tanaman tidak dapat berbunga. Tanaman yang hanya diinokulasi dengan larutan penyangga inokulasi rata-rata berbunga saat berumur 68 hari. Tanaman yang diinokulasi TuMV pada umur 4, 6, 8 MST tidak dapat berbunga. Hanya satu dari 10 tanaman yang diinokulasi TuMV pada saat 10 MST dapat berbunga dan berpolong, tetapi kemudian bunga gugur dan polongnya mengering sebelum terbentuk biji, dan akhirnya tanaman mati.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa seluruh stadia pertumbuhan atau sepanjang umur tanaman caisin rentan terhadap infeksi TuMV. Umur tanaman saat terjadinya infeksi sangat berpengaruh terhadap pertumbuhan tanaman. Semakin cepat tanaman terinfeksi, maka tanaman akan semakin rentan dan gejala yang terjadi akan semakin parah. Sebaliknya bila infeksi terjadi pada tanaman yang sudah tua maka tanaman akan lebih tahan dan gejala yang terjadi semakin ringan. Perbedaan pertumbuhan tanaman antara kontrol positif dengan kontrol negatif terlihat jelas pada tanaman yang diinokulasi saat berumur 4 MST, 6 MST, dan 8 MST, sedangkan pada 10 MST tidak terdapat perbedaan pertumbuhan tanaman.

Deteksi TuMV dengan Teknik I-ELISA. Hasil I-ELISA untuk tanaman yang diinokulasi pada umur 4, 6, 8, dan 10 mst menunjukkan nilai absorbansi yang berkisar antara 2,1 – 2,4 (dibaca pada panjang gelombang A 405 nm). Apabila dibandingkan dengan nilai absorbansi larutan penyangga (yaitu sekitar 0,2) dan kontrol negatif (berkisar antara 0,3 – 0,5), maka tanaman uji tersebut positif terinfeksi TuMV karena nilainya telah melebihi 2 kali kontrol negatif (data tidak ditampilkan). Meskipun terdapat perbedaan

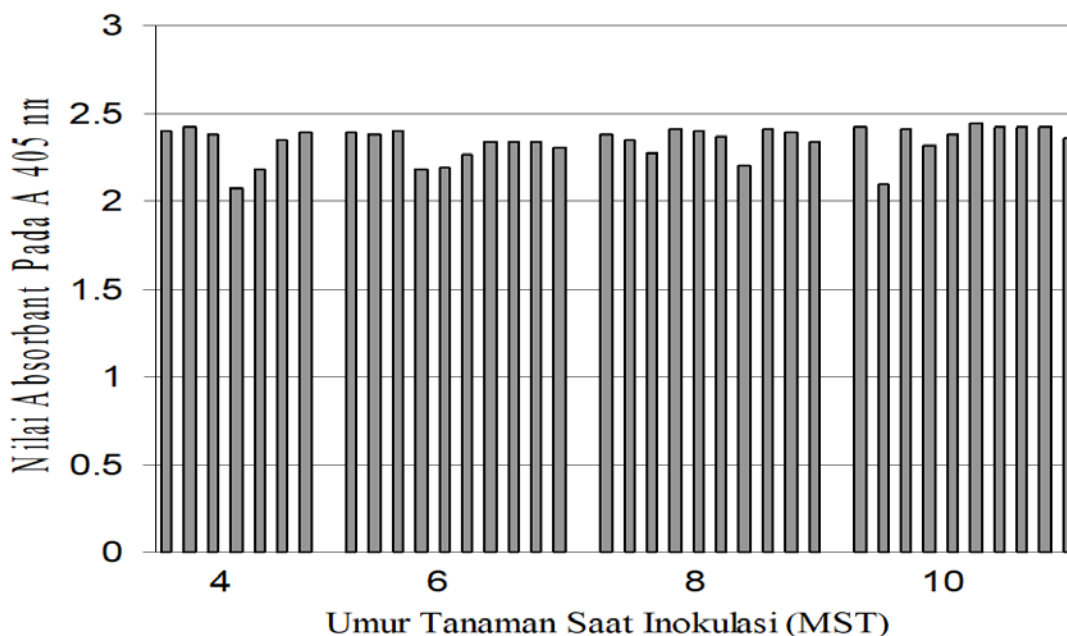
pertumbuhan tanaman dan keparahan gejala pada tanaman yang diinokulasi saat 4, 6, 8, dan 10 mst, tetapi berdasarkan hasil uji I-ELISA, tidak terdapat banyak perbedaan besarnya nilai absorbansi antara tanaman-tanaman tersebut (Gambar 2). Hal ini membuktikan bahwa nilai absorbansi tidak dipengaruhi oleh umur tanaman saat inokulasi, kandungan virus, maupun keparahan gejala.

Deteksi TuMV dengan Teknik RT-PCR. Hasil RT-PCR divisualisasi pada gel elektroforesis dengan penanda DNA (1 kb) sebagai alat untuk mengestimasi ukuran DNA produk RT-PCR. Pita DNA TuMV berhasil teramplifikasi dari tanaman yang diinokulasi virus pada ukuran 800 bp (Gambar 3). Produk tersebut sesuai dengan yang diharapkan bila menggunakan primer TuMV-F (8707 – 8726) dan TuMV-R (9690 – 9669) (Nicolas & Laliberte 1992). Dari sampel tanaman sehat (kontrol negatif) tidak diperoleh pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan bersifat spesifik.

Pita DNA produk RT-PCR dari tanaman yang diinokulasi TuMV isolat Tumpangan yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan ukuran yang sama

dengan hasil amplifikasi DNA dari tanaman yang diinokulasi TuMV isolat Cinangneng dan Cipanas yang dilakukan oleh Firdaus (2005). Teknik RT-PCR terbukti dapat digunakan untuk mendeteksi terjadinya infeksi TuMV pada tanaman caisin.

Perbandingan Teknik Deteksi I-ELISA dan RT-PCR. Perbandingan pada beberapa faktor utama yang diperhatikan dalam penentuan deteksi virus bertujuan untuk mengetahui kelebihan dan kekurangan teknik I-ELISA dan RT-PCR untuk mendeteksi TuMV (Tabel 1). Kedua teknik ini merupakan teknik deteksi yang sering digunakan untuk pengujian TuMV (Jenner 1999). Sensitivitas RT-PCR lebih tinggi daripada I-ELISA, karena jumlah sampel daun minimal yang dapat digunakan untuk pengujian adalah 0,005 g, sedangkan I-ELISA membutuhkan 0,01 g sampel daun. Dari segi ketepatan hasil deteksi, kedua teknik deteksi tersebut dapat memberikan akurasi hasil yang tinggi. Hasil I-ELISA dapat diketahui menggunakan ELISA *reader* dan hasil merupakan data kuantitatif. Hasil RT-PCR dapat



Gambar 2. Nilai absorbansi hasil uji I-ELISA pada A 405 nm dari tanaman yang diinokulasi TuMV pada umur 4,6,8, dan 10 MST.

Gambar 3. Gel elektroforesis hasil RT-PCR TuMV yang berasal dari sampel tanaman yang diinokulasi TuMV pada umur 4 dan 8 minggu setelah tanam (MST).
M = penanda DNA (1 Kb *ladder*); 1 & 3 = sampel tanaman yang di-inokulasi 4 MST; 2 & 4 = sampel tanaman yang diinokulasi 8 MST; 5 = sampel daun caisin dari tanaman sehat (kontrol negatif).

Tabel 1. Perbandingan antara teknik I-ELISA dan Teknik RT-PCR dalam deteksi TuMV

Faktor Perbandingan	I-ELISA	RT-PCR
Sensitivitas	0,01 g sampel daun	0,005 g sampel daun
Ketepatan	Sedang-Tinggi	Tinggi
Kemungkinan pengujian pada kondisi lapang	Sedang	Tidak
Penggunaan alat bantu otomatis	Banyak	Banyak
Biaya tiap sampel	Rp 5.500,-	Rp 103.000,-
Kapasitas tiap pengujian	45 – 93 sampel	1 – 3 sampel
Kecepatan diagnosa	22 – 26 jam	6,5 jam

dilihat dengan elektroforesis pada gel agarosa dan *UV transiluminator*. Pita DNA yang tampak pada ukuran yang diharapkan merupakan bukti bahwa virus ada dalam jaringan tanaman sakit.

Deteksi TuMV langsung di lapang menggunakan teknik I-ELISA lebih memungkinkan untuk dilakukan. Tahapan dasar I-ELISA yaitu pengisian sumuran pada plat mikrotiter, inkubasi, pencucian plat mikrotiter, dan pembacaan hasil pengujian dapat dilakukan tanpa menggunakan peralatan yang canggih. Pengisian plat mikrotiter dapat dilakukan dengan pipet mikro. Inkubasi pada suhu 37 °C dapat dilakukan pada penangas air. Pencucian plat mikrotiter dapat dilakukan secara manual dengan mengisikan PBST ke dalam tiap lubang sumuran. Hasil uji I-ELISA dapat ditentukan dengan membandingkan warna substrat antara sampel, kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan penyangga. Sebaliknya, RT-PCR tidak dapat dilakukan di lapang karena memerlukan peralatan yang canggih.

Biaya I-ELISA lebih rendah daripada RT-PCR, karena bahan-bahan untuk I-ELISA lebih murah. Perhitungan biaya I-ELISA dan RT-PCR menunjukkan bahwa untuk 1 sampel uji yang dilakukan secara duplo, teknik I-ELISA hanya membutuhkan biaya RP 5.500,- sedangkan tiap sampel uji RT-PCR membutuhkan biaya sekitar Rp 103.000,-. Biaya untuk melakukan RT-PCR lebih tinggi karena bahan-bahan yang digunakan harganya lebih mahal.

Keunggulan lain dari teknik I-ELISA adalah memiliki kapasitas sampel yang lebih banyak dalam satu kali pengujian. Satu plat mikrotiter I-ELISA terdiri atas 96 lubang sumuran, sehingga dalam satu kali pengujian sampel dapat diuji 45 sampel (bila dilakukan duplo) sampai 93 sampel (tidak duplo). Sumuran pada plat mikrotiter tidak semuanya dapat digunakan untuk sampel yang diuji, karena diperlukan tempat untuk larutan penyangga, kontrol positif, dan kontrol negatif sebagai pembanding. Sebaliknya, banyaknya sampel dalam setiap kali pengujian dengan RT-PCR tergantung pada alat dan kapasitas mesin PCR yang digunakan.

Teknik RT-PCR memiliki keunggulan di bidang kecepatan diagnosis. Waktu yang dibutuhkan dalam teknik RT-PCR adalah sekitar 6,5 jam, sedangkan untuk teknik I-ELISA sekitar 11 – 15 jam (bila dilakukan secara *overnight* akan memakan waktu selama 22 – 26 jam).

Teknik RT-PCR memiliki tingkat kesulitan yang lebih tinggi daripada teknik I-ELISA. Untuk mendapatkan hasil yang akurat, dibutuhkan ketrampilan yang tinggi. Ketrampilan dalam melakukan berbagai pengujian dapat diperoleh melalui latihan yang intensif sehingga hasil pengujian yang diperoleh akan optimal.

SIMPULAN

Infeksi TuMV pada benih caisin dapat terdeteksi melalui teknik I-ELISA, yaitu berkisar antara 2 – 15 %. Benih lokal lebih rentan terhadap infeksi TuMV karena sistem budidaya tanaman dan produksi benihnya kurang memadai. Seluruh umur tanaman caisin rentan terhadap infeksi TuMV. Semakin awal infeksi TuMV maka gejala yang terbentuk semakin berat.

Teknik I-ELISA dan RT-PCR dapat digunakan untuk mendeteksi TuMV pada jaringan daun. Teknik I-ELISA memiliki keunggulan, antara lain memerlukan biaya yang lebih sedikit, mempunyai kapasitas pengujian yang besar, dan waktu pengujian tidak terlalu lama. Dibandingkan dengan teknik I-ELISA, pengujian dengan teknik RT-PCR lebih sensitif dan hasilnya dapat lebih cepat diperoleh, namun biayanya mahal.

DAFTAR PUSTAKA

- Cahyono B. 2003. *Teknik dan Strategi Budi Daya Sawi Hijau (Pai-Tsai)*. Yayasan Pustaka Nusantara. Yogyakarta. Yogyakarta.
- Chiu W.F. & Y.H. Chang. 1982. Advances of science of plant protection in the People's Republic of China. *Annual Review of Phytopathology* 20: 71-92.
- Chomczynski & Sacchi. 1987. *Acid - guanidin thiocyanate – phenol - chloroform RNA Purification*. Department of Biochemistry, University of Nottingham. Nottingham.
- Direktorat Jenderal Produksi Tanaman Pangan. 2004. *Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura*. Balai Pengembangan Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura. Depok.

- Firdaus. 2005. *Deteksi dan Karakterisasi Turnip mosaic virus penyebab penyakit mosaik pada tanaman caisin (Brassica campestris L. subsp. chinensis (Rupr.) Olsson)*. Tesis. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Hardwick N.V., J.M.L. Davies, & D.M. Wright. 1994. The incidence of three virus diseases of winter oilseed rape in England and Wales in the 1991/92 and 1992/93 growing seasons. *Plant Pathology* 43(6): 1045-1049.
- Jenner C.E., G.J. Keane, J.E. Jones, & J.E. Walsh. 1999. Serotypic variation in turnip mosaic virus. *Plant Pathology* 48: 101-108.
- Nicolas O., & J.F. Liberte. 1991. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 73(11): 2785-2793.
- Rubatzky V.E., & M. Yamaguchi. 1998. *Sayuran Dunia: Prinsip, Produksi, dan Gizi*, Jilid 2. Bandung: Penerbit ITB. Terjemahan dari: World Vegetables: Principles, Production, and Nutritive Values 2nd.
- Sambrook J., E.F. Fitch, & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sano Y., & M. Kojima. 1989. Increase in cucumber mosaic virus concentration in Japanese radish plants co-infected with turnip mosaic virus. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 55: 296-302.
- Vicaino S.J.M., & M.C. Alvarez. 1987. *Enzyme Immunoassay Techniques, ELISA, in Animal and Plant Diseases*. Paris (France): Office International Des Epizooties.
- Walsh J.A., & J.A. Tomlinson. 1985. Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Annals of Applied Biology* 107(3): 485-495.
- Zitter A., & Providenti. 1984. Virus Diseases of Crucifers. *Vegetable Crops*: 730-732.