

Sensitivitas Metode Serologi dan *Polymerase Chain Reaction* untuk Mendeteksi *Bean Common Mosaic Potyvirus* pada Kacang Panjang

Sensitivity of Serology and Polymerase Chain Reaction Methods for Detection of *Bean Common Mosaic Potyvirus* in Yard Long Bean

Sherli Anggraini, Sri Hendrastuti Hidayat*
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit mosaik kacang panjang yang disebabkan *Bean common mosaic potyvirus* (BCMV) merupakan penyakit penting yang berpengaruh pada produksi tanaman. Metode umum untuk mendeteksinya ialah dengan serologi dan *polymerase chain reaction* (PCR). Penelitian ini bertujuan mengevaluasi tiga metode deteksi, yaitu *indirect enzym-linked immunosorbent assay* (I-ELISA), *dot immunobinding assay* (DIBA), dan *reverse transcription* (RT)-PCR yang sensitif sebagai metode diagnosis BCMV pada kacang panjang. Sampel yang digunakan adalah isolat BCMV asal Cirebon yang dipelihara pada tanaman kacang panjang di rumah kaca. Batas sensitivitas masing-masing metode diuji melalui pengenceran cairan perasan tanaman dan antiserum untuk I-ELISA dan DIBA serta cDNA sebagai *template* pada RT-PCR. Batas sensitivitas masing-masing metode berbeda-beda, metode I-ELISA ialah pada tingkat pengenceran cairan perasan 10^{-3} dan pengenceran antiserum 10^{-2} , metode DIBA ialah pada tingkat pengenceran cairan perasan 10^{-5} , dan metode RT-PCR pada pengenceran cDNA 10^{-4} .

Kata kunci: *enzym-linked immunosorbent assay*, *dot immunobinding assay*, *reverse transcription-polymerase chain reaction*

ABSTRACT

Mosaic disease in yard long bean is caused by *Bean common mosaic potyvirus* (BCMV) and has been reported to affect yield. Common method to detect infection of BCMV involves serological assay and *polymerase chain reaction* (PCR). The aims of this research is to assess the sensitivity of three methods, i.e. *Indirect Enzym-Linked Immunosorbent Assay* (I-ELISA), *Dot Immunobinding Assay* (DIBA), and *reverse transcription* (RT)-PCR as detection method for BCMV infection in yard long bean. Sensitivity level of the methods was evaluated by diluting plant extract and antisera for I-ELISA and DIBA, and cDNA as template in RT-PCR. Virus isolate from Cirebon was maintained in yard long bean in greenhouse and used for the assessment. Absorbance value of ELISA showed that dilution end point for I-ELISA was reached at 10^{-3} and 10^{-2} of plant extract and antisera dilution, respectively. Positive infection was still detected using DIBA when the plant extract was diluted up to 10^{-5} based on development of color intensity on nitrocellulose membrane. Specific viral DNA fragment was still amplified when cDNA was diluted up to 10^{-4} , indicated higher sensitivity level of RT-PCR method.

Key words: *enzym-linked immunosorbent assay*, *dot immunobinding assay*, *reverse transcription-polymerase chain reaction*

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus Darmaga, Bogor 16680
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: srihendrastutihidayat@gmail.com

PENDAHULUAN

Bean common mosaic potyvirus (BCMV) termasuk dalam famili *Potyviridae*, kelompok virus tumbuhan yang terbesar. Virus ini terbawa benih yang dapat ditularkan secara mekanis melalui cairan perasan tanaman dan ditularkan secara nonpersisten oleh beberapa jenis kutudaun termasuk *Aphis craccivora* (Nalini *et al.* 2006). Penyakit mosaik yang disebabkan oleh BCMV merupakan penyakit penting pada tanaman kacang-kacangan karena dapat menyebabkan kehilangan hasil hingga 98% (Verma dan Gupta 2010). Sejak tahun 2008 persentase insidensi penyakit mosaik kacang panjang dilaporkan di beberapa daerah di Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Banten meningkat. Damayanti *et al.* (2009) melaporkan bahwa salah satu virus yang berasosiasi dengan penyakit mosaik tersebut ialah *Bean common mosaic potyvirus*.

Metode yang umum dilakukan untuk mendeteksi infeksi virus pada tanaman adalah uji serologi yang didasarkan pada reaksi antara antigen (virus) dan antibodi, seperti metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Nalini *et al.* 2006; Verma dan Gupta 2010), metode *gel double-diffusion test*, *dot immunobinding assay* (DIBA), *immuno-blotting* atau *western blotting* (Xie *et al.* 2013). Metode deteksi lain yang sering digunakan dewasa ini ialah metode deteksi molekuler *polymerase chain reaction* (PCR) yang memanfaatkan sifat spesifik urutan nukleotida virus. Pemilihan metode deteksi yang tepat sangat menentukan hasil deteksi karena metode yang kurang baik akan menyebabkan kesalahan pada identifikasi penyebab penyakit.

Penelitian bertujuan mengevaluasi tiga metode deteksi virus, yaitu ELISA, DIBA dan RT-PCR sebagai metode yang sensitif untuk mendeteksi infeksi BCMV pada kacang panjang.

BAHAN DAN METODE

Sumber Inokulum Virus

Isolat BCMV yang digunakan berasal dari Cirebon yang merupakan koleksi Laboratorium

Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Isolat tersebut diperbanyak pada tanaman kacang panjang varietas Parade melalui penularan secara mekanis.

Metode *Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

Sampel daun tanaman terinfeksi BCMV digerus dalam *buffer coating* dengan perbandingan 1:100 (b:v). Cairan perasan tanaman hasil gerusan sebanyak 100 μ L dimasukkan ke dalam masing-masing sumur pada plat mikrotiter ELISA dan diinkubasi pada suhu 4 °C selama 24 jam. Sap tanaman dibuang dan sumur dicuci dengan *phosphate buffer saline tween-20* (PBST) sebanyak 7 kali. Anti serum BCMV dilarutkan dalam bufer ECL (2 g *bovine serum albumin*, 20 g PVP, 0.2 g NaN_3) dengan perbandingan 1:200 (b:v), selanjutnya sebanyak 100 μ L antiserum BCMV dimasukkan ke dalam sumur plat mikrotiter ELISA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 2 jam. Sumur dicuci kembali dan kemudian diisi dengan 100 μ L konjugat yang dilarutkan dalam bufer ECL dengan perbandingan 1:1000 (b:v) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Sumuran dicuci kembali sebanyak 7 kali dengan PBST, selanjutnya diisi dengan 100 μ L PNP yang dilarutkan dalam bufer PNP. Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit pengamatan dilakukan secara kuantitatif menggunakan *ELISA reader* (Bio-RAD 550) pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi dihentikan dengan cara menambahkan larutan NaOH 3 M dalam masing-masing sumur. Pada setiap pengujian disertakan kontrol negatif, yaitu tanaman sehat dan bufer.

Evaluasi metode I-ELISA dilakukan untuk menentukan batas sensitivitas, yaitu dengan mengencerkan sap tanaman dan antiserum. Sap tanaman diencerkan secara berseri sampai 10^{-6} dan antiserum diencerkan hingga 10^{-5} .

Metode *Dot Immunobinding Assay*

Metode DIBA dilakukan berdasarkan metode Mahmood *et al.* (1997). Membran nitroselulosa direndam dalam metanol 100%

selama 10 detik dan dikeringanginkan. Jaringan daun tanaman terinfeksi BCMV digerus dalam *tris buffer saline* (TBS:Tris-HCl 0.02 M dan NaCl 0.15 M, pH 7.5) dengan perbandingan 1:10 (b/v). Sebanyak 10 μ L cairan perasan tanaman diteteskan di atas membran nitroselulosa. Setelah tetesan sampel kering, membran direndam di dalam 10 mL larutan *blocking non-fat milk* 2% dalam TBS yang mengandung *Triton X-100* dengan konsentrasi akhir 2%. Membran kemudian diinkubasi pada suhu ruang sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm selama 2 jam dengan menggunakan *EYELA multi shaker* MMS. Membran kemudian dicuci 5 kali dengan dH_2O , setiap pencucian berlangsung 5 menit sambil digoyang dengan kecepatan 100 rpm. Membran selanjutnya direndam dalam 5 mL TBS yang mengandung antibodi 5 μ L ditambah *non-fat milk* dengan konsentrasi akhir 2% dan kemudian membran diinkubasi semalam pada suhu kamar sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm. Membran kemudian dicuci sebanyak 5 kali dengan *Tween* 0.05% dalam TBS (TBST). Membran selanjutnya direndam dalam 5 mL TBS yang mengandung 5 μ L konjugat (*goat anti rabbit-IgG*, Sigma, USA) ditambah *non-fat milk* dengan konsentrasi akhir 2% dan kemudian membran diinkubasi selama 60 menit sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm. Membran selanjutnya dicuci kembali dengan TBST dan direndam selama 5 menit dalam 10 mL bufer substrat (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M dan MgCl_2 5 mM) yang mengandung 66 μ L *nitro blue tetrazolium* (NBT) dan 30 μ L *bromo chloro indolil phosphate* (BCIP). Bila reaksi positif akan terjadi perubahan warna putih menjadi ungu pada membran nitroselulosa yang telah ditetesi cairan perasan tanaman dan reaksi dapat dihentikan dengan merendam membran dalam dH_2O .

Evaluasi metode DIBA dilakukan dengan perlakuan pengenceran sap tanaman hingga 10^{-6} dan penggunaan dua membran yang berbeda, yaitu Amersham *HybondTM-P* dan Nitropure GE untuk menentukan sensitivitas metode deteksi.

Metode *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*

Tahapan metode deteksi BCMV menggunakan metode RT-PCR terdiri atas tahapan ekstraksi RNA total, transkripsi balik, dan amplifikasi cDNA. Metode ekstraksi RNA dilakukan menggunakan *NucleoSpin RNA Plant mini kit* dan hasil ekstrak disimpan pada suhu -80°C sampai akan digunakan.

Reaksi transkripsi balik (10 μ L) terdiri atas 2.2 μ L *water free nuclease*, 2 μ L bufer RT 10x, 0.35 μ L dNTP 10 mM, 0.75 μ L oligo d(T) 10 μ M, 0.35 μ L RNase Inhibitor, 0.35 μ L MmULV RT, dan 2 μ L RNA. Reaksi transkripsi balik dilakukan menggunakan *thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700) dengan kondisi yang telah diatur sebagai berikut: 25°C selama 5 menit, 37°C selama 90 menit dan 70°C selama 15 menit. Hasil akhir reaksi transkripsi balik adalah produk cDNA yang akan digunakan pada reaksi selanjutnya, yaitu amplifikasi.

Amplifikasi dilakukan menggunakan pasangan primer BIC-cpF (5'-TCA GGA ACT GGG CAG CCG CAA C-3') dan BIC-cpR (5'-CTG CGG GGA ACC CAT GCC AAG-3') (Damayanti *et al.* 2009). Reaksi amplifikasi (25 μ L) terdiri atas 16.3 μ L *water free nuclease*, 2.5 μ L PCR buffer, 0.2 μ L dNTP 2.5 mM, 2.5 μ L *sucrose creasol*, masing-masing 1 μ L primer BIC-F dan BIC-R (masing-masing 10 μ M), 1 μ L *taq polymerase*, 1 μ L cDNA hasil RT. Semua bahan tersebut diisi ke dalam tabung mikro, selanjutnya tabung mikro tersebut dimasukkan ke dalam *thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700). Amplifikasi BCMV dilakukan sebanyak 35 siklus mengikuti metode Udayashankar *et al.* (2010) melalui beberapa tahapan: pemisahan utas DNA pada suhu 94°C selama 2 menit, penempelan primer pada DNA 68°C selama 1 menit dan sintesis DNA pada suhu 72°C selama 1 menit. Khusus untuk siklus terakhir ditambah tahapan sintesis selama 10 menit, kemudian siklus berakhir dengan suhu 4°C .

Evaluasi metode RT-PCR dilakukan dengan perlakuan pengenceran cDNA hingga 10^{-5} untuk menentukan batas cDNA yang dapat digunakan untuk deteksi BCMV.

HASIL

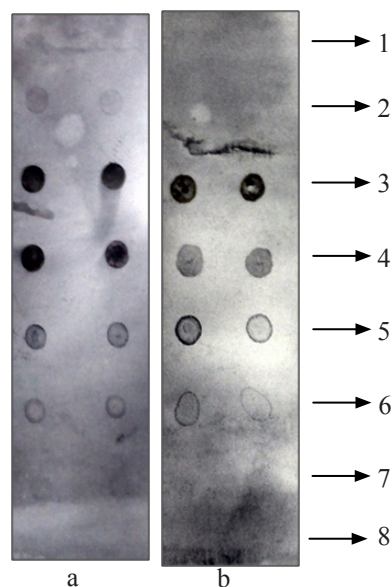
Deteksi BCMV

Pengamatan pada metode ELISA secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada plat mikrotiter ELISA menunjukkan perbedaan intensitas warna kuning. Warna kuning terlihat sangat jelas pada pengenceran sap dengan konsentrasi 10^{-2} dan warna kuning semakin berkurang dengan semakin tingginya pengenceran sap tanaman. Demikian pula dengan pengenceran antiserum, semakin tinggi pengenceran maka intensitas warna kuning akan semakin berkurang. Nilai absorbansi ELISA (NAE) pada 405 nm untuk pengenceran sap dengan konsentrasi 10^{-2} dapat mencapai lebih dari 6 kali NAE kontrol negatif bila konsentrasi antiserum yang digunakan ialah 10^0 dan 10^{-1} (Tabel 1). Nilai absorbansi tersebut menurun mengikuti faktor pengenceran antiserum. Nilai absorbansi ELISA pada pengenceran sap dengan konsentrasi 10^{-3} dapat mencapai lebih dari 2 kali NAE kontrol negatif untuk konsentrasi antiserum 10^0 dan 10^{-1} dan NAE akan menurun mengikuti faktor pengenceran antiserum. Batas sensitivitas pengujian dengan metode I-ELISA ialah pada tingkat pengenceran sap tanaman dengan konsentrasi 10^{-3} dengan pengenceran antiserum 10^{-2} .

Metode DIBA menggunakan membran *HybondTM-P* Amersham dan *Nitropure science* GE memberikan reaksi positif yang ditandai dengan adanya perubahan warna ungu pada membran (Gambar 1). Reaksi positif yang ditunjukkan oleh warna ungu yang sangat tebal terlihat pada tingkat pengenceran sap dengan

konsentrasi 10^{-2} namun semakin melemah pada tingkat pengenceran berikutnya. Reaksi positif pada membran *HybondTM-P* Amersham dapat terlihat sampai tingkat pengenceran sap 10^{-5} , sementara pada membran *Nitropure science* GE reaksi positif terlihat sampai tingkat pengenceran sap 10^{-4} .

Amplifikasi RT-PCR menggunakan pasangan primer BIC-cpF/BIC-cpR menghasilkan produk yang berukuran sekitar 850 pb (Gambar 2). Pengenceran bertingkat terhadap

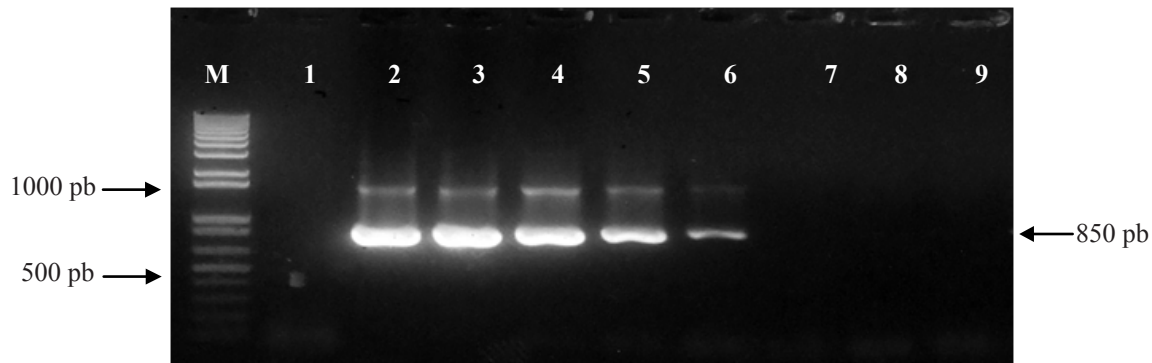


Gambar 1 Reaksi perubahan warna pada metode DIBA dengan berbagai tingkat pengenceran cairan perasan tanaman sakit: a, menggunakan membran *HybondTM-P* Amersham; b, *Nitropure science* GE. Sampel pada masing-masing membran terdiri atas: 1, bufer; 2, daun tanaman sehat; 3, daun tanaman terinfeksi; 4 sampai 8, daun tanaman bergejala berturut-turut dengan konsentrasi 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , dan 10^{-6} .

Tabel 1 Deteksi BCMV menggunakan metode I-ELISA pada berbagai konsentrasi cairan perasan tanaman dan antiserum

Konsentrasi cairan perasan tanaman terinfeksi	Konsentrasi antiserum					
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
10^{-2}	++++	++++	++	-	-	-
10^{-3}	++	++	-	-	-	-
10^{-4}	-	-	-	-	-	-
10^{-5}	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	-	-	-	-

-, absorban < 2 kali kontrol negatif; +, nilai absorban 2 kali kontrol negatif; ++, nilai absorban > 2 - 4 kali kontrol negatif; +++, nilai absorban > 4 - 6 kali kontrol negatif; +++++, nilai absorban > 6 kali kontrol negatif.



Gambar 2 Hasil amplifikasi RT-PCR dari tanaman kacang panjang terinfeksi BCMV dengan cDNA yang diencerkan bertingkat menggunakan primer BIC-F dan BIC-R. M, penanda DNA 1 kb; 1, tanaman sehat; 2–9, sampel cDNA yang diencerkan bertingkat berturut-turut 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} .

cDNA yang digunakan sebagai DNA cetakan pada tahap amplifikasi menunjukkan bahwa semakin banyak cDNA yang digunakan maka hasil amplifikasi akan semakin jelas. Produk amplifikasi DNA berhubungan dengan konsentrasi cDNA. Pita DNA masih terbentuk pada pengenceran cDNA 10^{-4} dan pita tidak terbentuk lagi pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} .

PEMBAHASAN

Deteksi dan identifikasi virus dapat dilakukan berdasarkan karakter biologi dan molekuler. Deteksi virus berdasarkan karakter biologi dapat dilakukan dengan pengujian tanaman indikator, penularan, dan bentuk partikel. Deteksi dan identifikasi menggunakan karakter molekuler umumnya dilakukan berdasarkan sifat protein misalnya dengan uji serologi dan sifat asam nukleat dengan hibridisasi DNA, dan PCR/RT-PCR. Metode ELISA dan DIBA merupakan metode serologi yang banyak digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus tumbuhan. Dalam metode ini antiserum dikonjugasikan dengan enzim sehingga bila ditambahkan substrat enzim maka kompleks antigen-antibodi dalam jumlah yang sedikit saja dapat tervisualisasi. Analisis hasil ELISA dapat dilakukan secara kuantitatif dengan spektrofotometer (ELISA reader), sementara hasil DIBA hanya dapat dianalisis secara kualitatif. Keuntungan metode ELISA ialah sensitivitas yang sangat

tinggi sehingga dapat mendeteksi virus pada konsentrasi rendah ($1-10 \text{ ng mL}^{-1}$), dapat menguji sampel dalam jumlah banyak secara cepat, menggunakan antiserum sedikit, memperoleh data secara kualitatif dan kuantitatif, dan tahapan pengujian yang mudah.

Deteksi serologi dengan metode I-ELISA memberi hasil positif untuk BCMV sampai pengenceran sap 10^{-3} dan pengenceran antiserum 10^{-3} . Tingkat pengujian yang lebih sensitif diperoleh dengan metode DIBA yang mampu memberikan hasil positif sampai pengenceran sap 10^{-5} . Batas sensitifitas sap DIBA lebih tinggi dibandingkan dengan metode I-ELISA dan hanya memerlukan antiserum yang lebih sedikit dibandingkan dengan I-ELISA untuk pengujian dengan sampel yang sama.

Saat ini metode deteksi yang banyak digunakan ialah metode deteksi berdasarkan sifat molekuler virus. Metode ini lebih sensitif, akurat, dan lebih efisien dalam penggunaan waktu dan tenaga. Hasil visualisasi elektroforesis menunjukkan bahwa metode RT-PCR berhasil mengamplifikasi BCMV dengan konsentrasi *template* cDNA yang rendah. Hal tersebut menunjukkan keunggulan teknik PCR yang mampu mendeteksi virus dari jaringan tanaman dengan konsentrasi virus yang rendah.

Metode deteksi I-ELISA, DIBA, dan PCR, memiliki kelebihan dan kekurangan (Tabel 2). Ditinjau dari segi kemudahan pelaksanaan

Tabel 2 Perbandingan metode I-ELISA, DIBA, dan RT-PCR untuk mendeteksi BCMV pada kacang panjang

Faktor Perbandingan	Metode		
	I-ELISA	DIBA	RT-PCR
Bobot sampel daun (g)	0.01	0.001	0.0002
Akurasi	Sedang-tinggi	Sedang-tinggi	Tinggi
Waktu (jam)	10-30	10-30	3-6.5
Kapasitas (sampel)	45-90	45-90	96
Biaya	Sedang-tinggi	Rendah -Sedang	Tinggi

pengujian metode I-ELISA dan DIBA dalam menentukan hasil termasuk metode yang mudah dilakukan dan tidak memerlukan alat yang canggih. Hal ini disebabkan hasil I-ELISA dan DIBA dapat ditentukan dengan membandingkan warna substrat antarsampel, kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan penyangga. Sebaliknya, RT-PCR tidak dapat dilakukan pada kondisi lapangan karena memerlukan peralatan yang canggih. Teknik RT-PCR memiliki keunggulan pada aspek kecepatan diagnosis. Waktu yang dibutuhkan dalam teknik RT-PCR ialah sekitar 6,5 jam, sedangkan untuk teknik I-ELISA dan DIBA sekitar 10–15 jam. Teknik RT-PCR memiliki tingkat kesulitan yang lebih tinggi daripada teknik I-ELISA dan untuk mendapatkan hasil yang akurat dibutuhkan keterampilan yang tinggi. Berdasarkan kebutuhan biaya pengujian I-ELISA dan DIBA memerlukan biaya lebih rendah dibandingkan RT-PCR karena bahan-bahan untuk I-ELISA dan DIBA relatif lebih murah (Kartiningtyas *et al.* 2006).

Ketersediaan metode deteksi virus yang sangat beragam perlu disikapi dengan tepat dan bijaksana, terutama untuk menetapkan metode yang akan digunakan. Kriteria yang perlu diperhatikan untuk memilih metode deteksi yang akan digunakan ialah sensitivitas, spesifikasi, waktu pengerjaan, dan biaya (Figueira *et al.* 1997).

DAFTAR PUSTAKA

- Damayanti TA, Alibi OJ, Naidu RA, Rauf A. 2009. Severe outbreak of a yellow mosaic disease on the yard long bean in Bogor, West Java. *Hayati J Biosci.* 16: 78–82. DOI: <http://dx.doi.org/10.4308/hjb.16.2.78>.
- Figueira AR, Domier LL, D'Arcy CJ. 1997. Comparison of Technique for Detection of *Barley yellow dwarf virus-PAV-IL*. *Plant Dis.* 81(11):1236–1246. DOI: [10.1094/PDIS.1997.81.11.1236](https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1236)
- Kartiningtyas, Hidayat SH. 2006. Deteksi *Turnip mosaic virus* (TuMV) pada benih dan jaringan daun. *J HPT Tropica.* 6:32–40.
- Mahmood T, Hein GL, French RC. 1997. Development of serological procedures for rapid and reliable detection of *Wheat streak mosaic virus* in a single wheat curl mite. *Plant Dis.* 81:250–253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.3.250>.
- Nalini MS, Shylaja MD, Prakash HS, Shetty HS. 2006. Production of polyclonal antibody to *Bean common mosaic virus* and its application in seed health testing. *Indian J Microbiol.* 46:97–108.
- Udayashankar AC, Nayaka SC, Kumar HB, Mortensen CN, Shetty HS, Prakash HS. 2010. Establishing inoculum threshold levels for *Bean common mosaic virus* strain blackeye cowpea mosaic infection in cowpea seed. *African J Biotech.* 9(53): 8958–8969. DOI: [10.5897/AJB09.1066](https://doi.org/10.5897/AJB09.1066).
- Verma P, Gupta UP. 2010. Immunological detection of *Bean common mosaic virus* in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Indian J Microbiol.* 50: 263–265. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-010-0019-8>.
- Xie Y, Jiao X, Zhou X, Liu H, Ni Y, Wa J. 2013. Highly sensitive serological methods for detecting *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato plants and whiteflies. *Virol J.* 10:142. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-10-142>.