

Deteksi *Citrus Psorosis Virus* pada Tanaman Jeruk BSIP Jestro dengan Metode ELISA

Hanif Nabila Rahmi^{*1}, Dina Agustina², Eli Hendrik Sanjaya³

UM, Jl. Semarang 5 (0341)551312

¹Departemen Sains Terapan, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Malang

²BSIP Jestro

³Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Universitas Negeri Malang

e-mail: *hanif.nabila.2103436@students.um.ac.id

Abstrak

Sebesar 20% kerugian pada berbagai komoditas pertanian ditimbulkan akibat virus dan menjadi lebih besar lagi pada komoditas jeruk. Psorosis menyebabkan kerugian tahunan sekitar 5% dan penurunan progresif pohon dengan mempengaruhi jaringan konduktif. Identifikasi dini yang efektif untuk mendiagnosis infeksi dan penyebaran virus dengan cepat menjadi penting untuk mengurangi kerusakan yang ditimbulkannya terhadap kebun buah-buahan dan industri pertanian. Metodologi ELISA dapat menjadi alat untuk mendeteksi antigen virus dan sering digunakan dalam deteksi virus tumbuhan. Prinsip metode ELISA adalah dengan mendeteksi patogen pada reaksi antibodi dan antigen. Antibodi diikat dengan enzim spesifik sebagai penanda. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi dan observasi tanaman jeruk positif *Citrus Psorosis Virus* di screen house positif kontrol BSIP Jestro. Hasil dari beberapa percobaan terdapat sampel daun yang memiliki absorbansi di atas Positive control namun Positive control (PC) seharusnya memiliki nilai di atas absorbansi yang didapatkan hal ini menjadi tantangan tersendiri dalam penelitian yang dilakukan.

Kata kunci: ekstraksi, ELISA, *Citrus psorosis virus*, jeruk, BSIP

1. PENDAHULUAN

Salah satu tantangan dalam dunia pertanian adalah hama dan penyakit karena berpengaruh pada penurunan kualitas pertanian hingga kerugian. Sebesar 20% kerugian pada berbagai komoditas pertanian ditimbulkan akibat virus dan menjadi lebih besar lagi pada komoditas jeruk. Bahkan penyakit yang disebabkan oleh virus jeruk pernah menyebabkan kerugian sebesar 23 milyar/tahun pada eratahun 1990-an. Penyakit akibat virus merupakan *silent killer* karena penyakit ini menyerang sistem jaringan pengangkut tanaman jeruk (floem dan atau xilem). Kerusakan sistem jaringan tersebut pada awalnya tidak terlihat nyata. Namun jika tidak dicegah, sulit disembuhkan, bahkan dapat menyebabkan kematian. Terdapat beberapa penyakit sistemik jeruk diantaranya penyakit *Citrus vein phloem degeneration* (CVPD), Tristeza atau *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus vein enation virus* (CVEV), exocortis atau *Citrus exocortis viroid* (CEVd) dan Psorosis atau *Citrus psorosis virus*

(CPsV). Sifat serangan kelima penyakit tersebut sistemik, yaitu tanaman yang sudah terinfeksi cenderung menyebar ke seluruh bagian tanaman, menyebabkan seluruh sistem fisiologi bagian tanaman rusak atau memberikan gejala pada seluruh bagian tanaman. Penyakit ini sulit disembuhkan dibanding penyakit yang bersifat lokal, seperti layu perubahan warna atau bentuk daun, kerdil, tumor, dan epinasti. Namun demikian, gejala tanaman yang terinfeksi virus tidak langsung terlihat dengan cepat setelah tanaman tertular. Adanya penyakit ini perlu ditangani membatasi penyebaran penyakit dan dilakukan sebagai usaha meningkatkan produksi dan kualitas tanaman jeruk [2].

Psorosis adalah penyakit jeruk yang tersebar luas di dunia yang dapat menular melalui penyambungan, menyebabkan penurunan hasil pertumbuhan, hingga menyebabkan kematian [3][1]. Psorosis menyebabkan kerugian tahunan sekitar 5% dan penurunan progresif pohon dengan mempengaruhi jaringan konduktif. Identifikasi dini

yang efektif untuk mendiagnosis infeksi dan penyebaran virus dengancepat menjadi penting untuk mengurangi kerusakan yang ditimbulkannya terhadap kebun buah-buahan dan industri pertanian [4]. Gejala dari *Citrus psorosis virus* (CPsV) dapat menyerang area batang, cabang, daun, buah menyebabkan kerusakan hinggapenurunan pertumbuhan, dan dapat menyerang hampir semua varietas jeruk, hibrid-hibridnya dan beberapa kerabat jeruk.

Metodologi ELISA dapat menjadi alat untuk mendeteksi antigen virus dan sering digunakan dalam deteksi virus tumbuhan. ELISA merupakan teknik *immunoassay* dengan memanfaatkan antibodi terkonjugasi enzim dan matriks pendukung yang andal [6]. Di antara berbagai metode diagnostik serologis dan molekuler yang dirancang untuk mengidentifikasi partikel virus jeruk, *Double Antibody Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (DAS- ELISA), menonjol karena kapasitas deteksi virusnya yang cepat [3]. Saat ini DAS-ELISA sudah mulai digunakan untuk deteksi CPsV di Mesir, dengan menggunakan antibodi monoklonal spesifik untuk CPsV (Agritest, Italia) [4].

Pada penelitian sebelumnya ekstraksi Citrus Psorosis Virus menggunakan metode ELISA. Tetapi tidak terlihat secara fisik perubahan warna pada *plate* ELISA. Kelebihan dan kekurangan metode diagnostik yang berbeda harus didiskusikan terlebih dahulu [3]. Meskipun hasil dapat dibuktikan melalui pembacaan absorbansi menggunakan ELISA *Reader* tetap perlu dilakukan penelitian kembali untuk memastikan pohon jeruk mana saja yang terserang penyakit psorosis. Selain itu, untuk pengamatan lebih lanjut perlu dilakukan validasi data melalui penanaman pohon jeruk berpenyakit pada pohon jeruk sehat melalui penempelan atau okulasi. Untuk mengetahui gejala yang dapat ditularkan melalui cangkokan [7].

2. METODE

2.1 Bahan Percobaan

Bahan yang digunakan ialah sampel daun *Pocitive Controle*, akuades, alkohol 70%, Tween 0,05%, BSA 2%, NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄, KCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, *polyvinyl pyrrolidone* (PVP 10), *Diethanolamine*, MgCl₂, *Positive Control* CPsV Agritest, *Negative Control* CPsV Agritest, PBS buffer, *Grinding* buffer (buffer ekstrak), *coating* buffer, *washing* buffer, *conjugate* buffer, *plate* ELISA, *capture antibody*, *conjugate antibody*.

2.2 Alat Percobaan

Alat yang digunakan ialah mortar, pestel, gelas ukur, erlenmeyer, *timer*, *beaker glass*, *stirrer*, mikropipet, timbangan analitik, *magnetic stirrer*, *ph*, *tube*, *plate* ELISA, *sterofoam*, mesin spektrofotometer.

2.3 Tahapan Penelitian

2.3.1 Seleksi Sumber Daun Jeruk

Tanaman jeruk di *screen house* BSIP Jestro dipilih berdasarkan gejala CPsV yang mengacu pada jurnal terkait. Tiap tanaman jeruk terpilih diambil 3-5 daun menggunakan gunting steril. Tanaman jeruk diambil secara acak dengan mempertimbangkan berdasarkan gejala fisik dari tanaman. Sampel dibersihkan dengan *tissue* dan alkohol 70% hingga bersih dari debu. Setelah itu, diambil tulang daunnya dipotong kecil-kecil, ditimbang sebanyak 0,3 g. Setiap memotong sampel daun dari tanaman yang berbeda dan umur daun yang berbeda harus menggunakan alat pemotong (*silet*) yang baru agar tetap steril.

2.3.2 Deteksi Sampel Positif CPsV menggunakan ELISA

Deteksi sampel positif CPsV dilakukan dengan hasil uji serologi ELISA. Nilai positif dari virus psorosis dapat dipastikan melalui ELISA, dengan indeks pada indikator jeruk. Nilai OD referensi untuk kontrol positif adalah sekitar 0,600 pada inkubasi 2 jam dan 2,0 OD untuk kontrol segar.

Hasil ELISA diukur dalam bentuk nilai OD (*Optical Density*) atau Absorbansi yang didapatkan dari pembacaan spektrofotometer pada panjang gelombang 450 nm. Nilai ini menunjukkan jumlah interaksi antigen (virus CPsV) dengan antibodi yang terikat pada enzim, yang menyebabkan perubahan warna. *Cut-off* adalah nilai ambang batas untuk membedakan antara sampel positif dan negatif. Nilai *cut-off* biasanya dihitung dari nilai OD kontrol negatif ditambah dengan kelipatan standar deviasi (SD) atau koefisien tertentu.

Misalnya, jika menggunakan pendekatan umum:

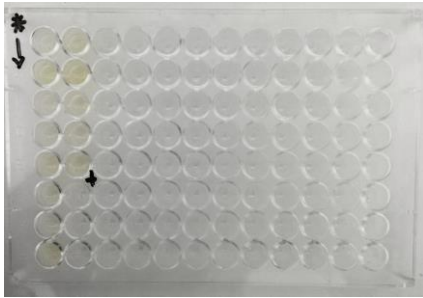
$$\text{Cut-off} = \text{Rata-rata OD kontrol negatif} + 3 \times \text{Standar Deviasi (SD)}$$

Rasio Positif (*Positive Ratio*): Biasanya dilakukan dengan membandingkan OD sampel dengan OD *cut-off*.

$$\text{Rasio Positif} = \frac{\text{OD sampel}}{\text{Cut-off}}$$

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstraksi CPsV dilakukan 4 kali percobaan untuk menguji sampel yang berada di *screen house* secara bertahap. Terdapat 26 tanaman jeruk positif penyakit sistemik dengan beberapa diantaranya belum memiliki label penyakit tertentu. 21 tanaman jeruk diantaranya dilakukan pengujian ekstraksi menggunakan metode ELISA. Didapatkan 8 diantaranya pernah mendapati nilai absorbansi lebih tinggi dari *positive controle* yang diartikan memiliki kemungkinan besar merupakan tanaman jeruk yang terinfeksi CPsV. Namun, 4 kali percobaan tersebut dilakukan di waktu yang berbeda dengan cuaca sehari-hari yang tidak selalu sama. Akibatnya virus tersebut terkadang ekspresif namun terkadang tidak ekspresif. Oleh karena itu, sampel sampel tanaman jeruk tersebut masih perlu dilakukan validasi untuk memastikan kesesuaian data yang didapatkan adalah sampel positif CPsV.



Gambar 1. Plate ELISA

4. SIMPULAN

Kesimpulan harus mengindikasikan secara jelas hasil-hasil yang diperoleh, kelebihan dan kekurangannya, serta kemungkinan perbaikan dari hasil yang diperoleh

1. Sebanyak empat kali percobaan ekstraksi ELISA masing-masing percobaan menampilkan beberapa sampel yang memiliki absorbansi lebih dari *positive control* (PC). Dan didapatkan 8 sampel yang pernah mendapatkan absorbansi lebih dari PC yaitu sampel 2, 3, 4, 5, 6, 7, 12, 18. Namun, hasil dari PC sendiri masih relatif kecil jika dibandingkan dengan *Negative control* (NC). PC dapat mengalami degradasi yang membuat hasil menjadi kurang valid. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai hal tersebut untuk memvalidasi data.
2. Waktu dan cuaca ketika pengambilan sampel mempengaruhi keadaan ekspresif atau tidaknya *Citrus Psorosis Virus*. Ketika pengambilan sampel dilakukan saat musim

hujan dan suhu rendah, virus kurang ekspresif baik dalam gejala fisik maupun absorbansi ELISA yang didapatkan hal ini disebabkan oleh suhu rendah yang dapat menghambat metabolisme pada tumbuhan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Saya mengucapkan terimakasih pada BSIP Jestro yang telah menyediakan tempat bagi saya untuk berproses dan meneliti topik *Citrus Psorosis Virus*. Ucapan terimakasih kepada Dina Agustina, S.Si., M.P. yang telah membimbing selama penelitian. Tidak lupa kepada Eli Hendrik Sanjaya, S.Si., M.Si., Ph.D serta prodi S1 Bioteknologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Malang yang telah mewadahi kami untuk dapat meneliti topik *Citrus Psorosis Virus* pada tanaman jeruk.

DAFTAR RUJUKAN

- [1] Astuti, M. (2016). Mencegah Ancaman Penyakit Sistemik Jeruk. INDONESIA AGENCY FOR AGRICULTURAL. IAARD press.
- [2] Rambe, S. Et all. (2021). Pengendalian Hama & Penyakit. Balai Besar Pengkajian dan Pengembangan Teknologi Pertanian.
- [3] Martin, S. (2002). Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests Plant Pathology; 51 (134– 141)
- [4] Ibriz, M. (2014). Recent advances in Citrus psorosis virus. VirusDis.DOI 10.1007/s13337-014-0199-7
- [5] Baral, B. (2024). DAS-ELISA-based detection and RT-PCR validation for precise and timely analysis of Citrus tristeza virus infection in Nepalese citrus species. Current Research in Biotechnology.
- [6] A. Shofiyani and N. Damajanti, “2) 6%, 20,” Agritech, vol. XVII, no. 1, pp. 55–64, 2015.
- [7] Burgess, G. (1995). ELISA TECHNOLOGY IN DIAGNOSIS AND RESEARCH. James Cook University of North Queensland.
- [8] Achachi, A. (2013). Recent advances in Citrus psorosis virus. Indian Virological Society.
- [9] Ito, T. (2011). First report of Citrus psorosis virus in Japan. J Gen Plant Pathol, 77:257– 259.

- [10] Reyes, C. (2016). Citrus psorosis virus 24K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA. *Molecular Plant Pathology*: 17 (3), 317–329.
- [11] Hidayat, R., & Patricia Wulandari. (2021). Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Technique Guideline. *Bioscientia Medicina : Journal of Biomedicine and Translational Research*, 5(5), 447-453. <https://doi.org/10.32539/bsm.v5i5.228>
- [12] Metode Elisa Untuk Pengukuran Protein Metallothionein Pada Daun Padi Ir Bagendit. Budi Santosa. 202