

Uji Kepekaan Gamma-Globulin Antiserum Poliklonal *Cucumber Mosaic Virus* untuk Deteksi Cepat CMV dengan Metode Elisa Tidak Langsung pada Tanaman Tapak Dara

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

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

Naskah diterima tanggal 5 November 2003 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 9 Maret 2004

Virus mosaik ketimun merupakan salah satu patogen penting pada berbagai tanaman hortikultura, termasuk tanaman tapak dara. Untuk dapat mengetahui secara dini infeksi virus pada tanaman, perlu dikembangkan metode deteksi cepat. Salah satu metode serologi yang paling banyak digunakan dewasa ini untuk deteksi virus secara cepat adalah *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Penelitian ini bertujuan memperoleh gamma-globulin murni dari antiserum poliklonal *cucumber mosaic virus* (CMV) dan mengetahui konsentrasi optimalnya untuk deteksi cepat. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, dari bulan Januari sampai Desember 2001. 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. Pemurnian gamma-globulin mengikuti metode Clark & Adam. Konsentrasi gamma-globulin diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Pengujian kepekaan gamma-globulin terhadap antigen dilakukan dengan metode ELISA tidak langsung. Hasil pengujian menunjukkan konsentrasi gamma-globulin sebesar 1 mg/ml dengan uji ELISA tidak langsung, konsentrasi gamma-globulin yang optimal untuk deteksi CMV adalah sebesar 1 g/ml dengan pengenceran enzim *conjugated goat antirabbit* dan sampel, masing-masing sebesar 1/25.000 dan 1/10 atau konsentrasi gamma-globulin sebesar 1 g/ml dengan pengenceran enzim *conjugated goat antirabbit* dan sampel, masing-masing sebesar 1/10.000 dan 1/100.

Kata kunci : *Vinca* sp.; *Cucumber mosaic virus*; Antiserum poliklonal; Gamma-globulin; ELISA tidak langsung.

ABSTRACT. Rahardjo, I.B., Y. Sulyo, and E. Diningsih. 2004. Sensitivity test of gamma-globulin of cucumber mosaic virus polyclonal antiserum for rapid detection of CMV with indirect ELISA on *Vinca* sp. Cucumber mosaic virus is one of the major pathogens on some horticulture crops including *Vinca* sp. A rapid detection method should be developed to support the evaluation of initial infection of the virus on crops. A serological method commonly used for rapid detection of plant viruses is ELISA. The objectives were to produce purified gamma-globulin of CMV antiserum and to determine the optimum concentration for rapid detection of the virus. The experiment was done in Virological Laboratory of Indonesian Ornamental Crops Research Institute in Segunung, from January to December 2001. A polyclonal CMV antiserum had been produced by injections of purified CMV into rabbit with the concentration of 1 mg/ml each injection from previous research. Clark & Adam method for gamma-globulin purification was followed. Gamma-globulin concentration was measured with spectrophotometer on wave length of 280 nm. The test of gamma-globulin sensitivity was carried out with indirect ELISA method. The results showed that the gamma-globulin concentration obtained in this study was 1 mg/ml. The optimum concentration of the gamma-globulin for CMV detection with indirect ELISA was 1 g/ml with 1/25,000 and 1/10 of enzyme conjugated goat antirabbit dilution and samples, respectively, or the optimum concentration of the gamma-globulin was 1 g/ml with 1/10,000 and 1/100 of enzyme conjugated goat antirabbit dilution and samples, respectively.

Keywords : *Vinca* sp.; Cucumber mosaic virus; Polyclonal antiserum; Gamma-globulin; Indirect ELISA.

Tapak dara (*Vinca* sp.) merupakan salah satu tanaman hias yang cukup menarik yang ditanam di pot atau di taman. Bunga tapak dara berwarna merah muda, ungu, dan putih. Tanaman hias tapak dara umumnya diperjualbelikan dalam bentuk tanaman pot, atau dijual bijinya dalam kemasan, untuk kemudian ditanam di taman atau kebun.

Kebutuhan benih/bibit tanaman hias khususnya tanaman tapak dara yang terus meningkat dari tahun ke tahun menuntut penyediaan benih/bibit bermutu yang bebas patogen sistemik, khususnya virus. Tanaman

tapak dara, bibitnya diperbanyak secara generatif melalui biji. Jika bibit terinfeksi sejenis patogen sistemik yang laten (virus, viroid, dan fitoplasma) maka patogen tersebut akan ditularkan ke bibit generasi berikutnya melalui vektor serangga sebagai penularnya. Infeksi tersebut dapat terjadi berulang-ulang yang akhirnya menyebabkan vigor dan daya hasilnya makin menurun yang disebut degenerasi bibit. Hal ini menyebabkan pengusaha bibit/benih kembali mengimpor benih dari luar negeri.

Untuk meningkatkan nilai jual tanaman tapak dara, maka perlu ditingkatkan baik kualitas

maupun kuantitasnya. 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). Ekolabel ISO-9000, memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan mutu produk dan ISO-14000 memuat ketentuan tentang jaminan pengelolaan lingkungan.

Salah satu kendala untuk meningkatkan mutu adalah adanya infeksi yang disebabkan oleh penyakit virus mosaik ketimun (*cucumber mosaic virus = CMV*). Dalam usaha tani tanaman hias khususnya tanaman tapak dara, 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 diantaranya adalah CMV (Anonymous 1993). Berdasarkan penelitian terdahulu, diketahui bahwa terdapat beberapa tanaman hias seperti krisan, tapak dara, alpinia, costus, curcuma, dan zingiberaceae terinfeksi 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 aphid 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 adanya degenerasi pada tanaman hias yang

diperbanyak secara vegetatif dan generatif terus menerus. Di Eropa dilaporkan oleh Ammirato *et al.* (1990) CMV dapat menyebabkan pengurangan ukuran bunga 5%, serta pengurangan panjang batang 11% pada tanaman krisan. Tidak semua spesies tanaman hias yang terinfeksi virus tersebut menunjukkan gejala. Untuk mengetahui apakah tanaman hias sudah terinfeksi atau belum, diperlukan adanya perangkat deteksi yang akurat, peka, mudah, dan murah.

Gejala yang tampak pada tanaman tapak dara yang terinfeksi CMV bervariasi tergantung berat atau lemahnya jenis virus yang menyerang. Pada tanaman tapak dara yang bergejala berat daun-daun tampak mosaik hijau, 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 bunga tidak normal. Pada tanaman tapak dara yang bergejala ringan atau lemah, daun-daun tampak mosaik hijau lemah dan bentuk bunga masih normal. Pada tanaman tapak dara yang terinfeksi CMV dengan gejala pada daun tampak mosaik berat, seolah-olah memperlihatkan keindahan, padahal CMV akan menghambat pertumbuhan tanaman, umur tanaman menjadi relatif pendek, dan yang tidak kalah pentingnya adalah dapat menjadi sumber inokulum CMV untuk menyebar ke tanaman lain.

Pada tanaman yang dibudidayakan khususnya tanaman tapak dara, virus sering sukar dideteksi. Virus yang menginfeksi inang kadang-kadang tidak menampakkan gejala yang jelas, bahkan menghasilkan gejala yang mirip gangguan fisiologi (seperti defisiensi unsur hara) atau kelainan genetik. Dengan demikian jika tanaman tapak dara yang menampakkan gejala pada daun mosaik hijau, maka perlu dicurigai bahwa tanaman tersebut terinfeksi virus.

Penggunaan benih dan atau bibit tanaman hias termasuk tanaman tapak dara 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 lain. Dengan demikian, metode pengujian keberadaan virus pada tanaman secara

dini dan cepat sangat diperlukan untuk menunjang pengadaan benih bebas virus. Ada berapa 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 *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) yang mula-mula dikembangkan untuk deteksi virus tanaman oleh Clark & Adams (1977). Hasil penelitian mengenai produksi antiserum CMV dapat digunakan untuk deteksi cepat dengan metode ELISA tidak langsung (Muharam *et al.* 2001). Uji kepekaan gamma-globulin antiserum poliklonal CMV perlu dilakukan untuk pengembangan perangkat uji (*kit*) ELISA.

Tujuan penelitian ini adalah memperoleh gamma-globulin murni dari antiserum poliklonal CMV dan mengetahui konsentrasi optimalnya untuk deteksi cepat pada tanaman tapak dara.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Pacet, Cianjur, Jawa Barat (1.100 m dpl.), dari bulan Januari sampai dengan Desember 2001. Antiserum merupakan koleksi Balai Penelitian Tanaman Hias yang diproduksi dengan penyuntikan virus murni CMV secara bertahap pada kelinci dengan konsentrasi setiap penyuntikan sebesar 1 mg/ml yang dilakukan pada penelitian sebelumnya.

Gamma-globulin CMV

Metode pemurnian antiserum untuk memperoleh gamma-globulin mengikuti metode yang dikembangkan oleh Clark & Adam (1977). Prosedur pemurnian adalah sebagai berikut (1) penambahan 1 ml antiserum dalam 9 ml akuades, (2) secara perlahan-lahan ditambah 10 ml amonium sulfat jenuh, (3) inkubasi campuran tersebut selama 1 jam pada suhu kamar, (4) sentrifugasi selama 10 menit pada 10.000 rpm untuk mendapatkan pellet, (5) larutkan pellet dalam 2 ml $\frac{1}{2}$ x *phosphate buffer saline* (PBS), (6) dialisis dalam 500 ml $\frac{1}{2}$ x PBS sebanyak tiga kali, masing-masing selama 4 jam pada suhu 4°C, (7) lewatkan larutan hasil dialisis dalam kolom selulose DEAE, kolom selulose tersebut sebelumnya diekuilibrasikan dengan $\frac{1}{2}$ xPBS sampai

pHnya sama dengan pH PBS (7,4); penambahan larutan hasil dialisis dilakukan secara perlahan yang dilanjutkan dengan penambahan $\frac{1}{2}$ xPBS secara bertahap, (8) tampung efluen (larutan gamma-globulin) dalam enam tabung evendorf, masing-masing sebanyak 1 ml, (9) ukur absorbansi masing-masing larutan gamma-globulin pada 280 nm dengan spektrofotometer. Larutan gamma-globulin dengan konsentrasi 1 mg/ml akan memberikan nilai absorbansi pada 280 nm sebesar 1,4.

Uji kepekaan gamma-globulin CMV

Uji kepekaan gamma-globulin terhadap antigen dilakukan dengan metode ELISA tidak langsung menurut Hobbs *et al.* (1987) dan Mowatt & Dowson (1987). Tiga macam sampel yaitu tanaman terinfeksi CMV dengan pengenceran 1/10, 1/100, dan 1/1.000, tanaman sehat (kontrol) dengan pengenceran 1/10 dan 1/100, dan PBST 1x (kontrol). Dengan tahapan sebagai berikut (1) tiga macam sampel di atas sesuai pengenceran digunakan. Sampel tanaman tapak dara terinfeksi CMV dan sampel tanaman tembakau 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 μ l per lubang (*direct antigen coating*), (3) kemudian *plate* ELISA diinkubasi satu malam dalam lemari pendingin dengan suhu \pm 4°C, (4) selanjutnya *plate* ELISA dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali sambil digoyang, masing-masing selama 3 menit, (5) kemudian dilakukan *blocking* (dilarutkan 1% BSA atau *albumin egg powder* dalam PBS 1x). Dimasukkan 200 μ l ke dalam masing-masing lubang *plate* ELISA dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar, (6) lakukan pencucian seperti tahap 4, (7) siapkan penyangga antibodi 2% BSA dilarutkan dalam PBS 1x, (8) gamma globulin CMV diabsorpsi terlebih dahulu dengan ekstrak daun tembakau sehat dalam penyangga antibodi dengan perbandingan 1:20, kemudian dicampurkan penyangga antibodi dalam ekstrak daun sehat dengan pengenceran 1:10, selanjutnya tambahkan gamma-globulin CMV sesuai pengenceran, yaitu 1/100 (5 μ g/ml), 1/500 (1 μ g/ml), dan 1/1.000 (0,5 μ g/ml), larutan dibiarkan selama 4 sampai 5 menit. Masukkan 100 μ l larutan gamma-globulin CMV 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 antirabbit alkaline phosphatase conjugate* dalam penyangga antibodi (SIGMA no. A-3937) (pengenceran 1:10.000 dan 1/25.000). Masukkan 100 μl ke dalam tiap lubang *plate* ELISA. Kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C , (12) lakukan pencucian seperti tahap 4, (13) tambahkan *p-nitrophenil phosphate* dalam penyangga substrat (1 mg/ml) sebanyak 100 μl 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) hentikan reaksinya dengan penambahan 25 μl NaOH 3M ke dalam tiap lubang *plate* ELISA, dan (15) amati reaksinya, diukur absorbannya dengan alat pembaca ELISA (*Dynatech Lab. minireader II*) dengan filter Abs 410 nm .

Peubah yang diamati

Peubah yang diamati meliputi (1) konsentrasi gamma-globulin CMV hasil pemurnian antiserum, (2) konsentrasi gamma-globulin CMV yang optimum, dan (3) pengujian kepekaan gamma-globulin CMV.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Antiserum kasar dari kegiatan penelitian sebelumnya ditentukan pada pengambilan darah yang diduga cukup tinggi konsentrasinya. Dari beberapa kali pengukuran konsentrasi antiserum kasar diketahui konsentrasi cukup tinggi pada pengambilan darah keempat atau kelima dari enam kali pengambilan darah. Pada penelitian ini ditentukan antiserum kasar dari pengambilan darah keempat untuk diproses pemurnian gamma-globulinnya.

Konsentrasi gamma-globulin CMV

Pemurnian gamma-globulin CMV yang berasal dari antiserum kasar kegiatan penelitian sebelumnya diperoleh enam tabung untuk diukur konsentrasinya. Pengukuran nilai absorbansi gamma-globulin CMV pada panjang gelombang 280 nm menggunakan spektrofotometer. Hasil pengukuran nilai absorbansi gamma-globulin CMV terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Absorban gamma-globulin CMV pada panjang gelombang 280 nm (*Absorbance of gamma-globulins of CMV at 280 nm*).

No. tabung (No. of tubes)	Absorban (Absorbance)
1	-
2	0,79
3	1,40
4	0,75
5	0,43
6	-

Dari enam tabung hasil pemurnian gamma-globulin CMV, terdapat beberapa tabung yang tidak diukur nilai absorbannya, karena pada pengukuran nilai absorbansi tabung sebelumnya terdapat kecenderungan nilai absorbannya semakin rendah, padahal untuk mencapai konsentrasi gamma-globulin yang optimum nilai absorbannya 1,4 (Noordam 1973). Pada Tabel 1 diketahui nilai absorbansi gamma-globulin CMV yang tertinggi untuk pemurnian gamma-globulin, yaitu 1,40 dengan konsentrasi gamma-globulin CMV 1 mg/ml. Seandainya nilai absorbansi lebih dari 1,4, maka konsentrasi gamma-globulin menjadi tinggi, sehingga jika konsentrasinya dijadikan optimum 1 mg/ml maka akan mendapat volume yang lebih banyak. Begitu juga sebaliknya jika nilai absorbansi gamma-globulin kurang dari 1,4 maka konsentrasi gamma-globulin menjadi lebih rendah, sehingga jika konsentrasinya dijadikan optimum 1 mg/ml maka bisa digabung dengan tabung yang nilai absorbannya lebih dari 1,4 sehingga diperoleh rata-rata nilai absorbansi 1,4 dengan konsentrasi 1 mg/ml. Jika nilai absorbansi gamma-globulin kurang dari 1,4 maka suspensi gamma-globulin diabsorpsi dengan PEG-6000 sampai volume menyusut sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml.

Pada pemurnian gamma-globulin diperoleh IgG CMV dengan konsentrasi 1 mg/ml pada panjang gelombang 280 nm. Sedangkan kemungkinan protein lain yang terbawa pada hasil pemurnian gamma-globulin yang mempengaruhi kemurnian gamma globulin, diharapkan tidak terbawa, karena pada pemurnian gamma-globulin, sudah melalui proses penyaringan antiserum CMV kasar dengan kolom selulose DEAE.

Tabel 2. Uji kepekaan gamma-globulin CMV dengan metode ELISA tidak langsung (*Sensitivity test of CMV gamma-globulins with indirect ELISA*).

Konsentrasi gamma-globulin (Concentration of gamma-globulin)	Konsentrasi goat antirabbit (Concentration of goat antirabbit)	Nilai absorbansi pada 405 nm (<i>Absorbance values at 405 nm</i>)			
		Sampel sakit (<i>Infected sample</i> *)		Sampel sehat (<i>Healthy sample</i> **)	
		1/10	1/100	1/10	1/100
1/100 (5 g/ml)	1/10.000	2,38	1,98	0,02	0,02
	1/25.000	2,03	1,63	0,02	0,02
1/500 (1 g/ml)	1/10.000	1,58	1,21	0,00	0,00
	1/25.000	1,41	0,97	0,00	0,00
1/1.000 (0,5 g/ml)	1/10.000	0,22	0,05	0,02	0,01
	1/25.000	0,16	0,02	0,00	0,00

Nilai absorbansi merupakan rata-rata dari dua ulangan (*Absorbance values were average of two replications*); *) Daun tapak dara terinfeksi CMV (*Leaf of CMV infected Vinca sp.*); **) Daun tembakau bebas virus (*Leaf of virus free tobacco*).

Uji kepekaan gamma-globulin CMV

Nilai absorbansi hasil uji kepekaan gamma-globulin CMV dengan metode ELISA tidak langsung terdapat pada Tabel 2. Sampel yang diuji disebut positif jika nilai absorbansinya adalah lebih besar atau sama dengan tiga kali absorbansi sampel sehat.

Pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa nilai absorbansi paling tinggi pada konsentrasi gamma-globulin CMV 1/100 dengan pengenceran *goat antirabbit* 1/10.000 dan sampel sakit 1/10 yaitu 2,38 (positif). Nilai absorbansi yang paling rendah untuk sampel sakit pada konsentrasi gamma-globulin CMV 1/1.000 dengan pengenceran *goat antirabbit* 1/25.000 dan sampel sakit 1/100 adalah 0,02 (negatif). Pada Tabel 2 juga dapat dilihat bahwa konsentrasi gamma-globulin 1/100 (5 g/ml) memberikan reaksi positif terhadap seluruh pengenceran sampel (1/10, 1/100, dan 1/1.000) dan pengenceran *goat antirabbit* (1/10.000 dan 1/25.000). Pada konsentrasi gamma-globulin 1/500 (1 g/ml) memberikan reaksi positif terhadap pengenceran sampel (1/10 dan 1/100) dan pengenceran *goat antirabbit* (1/10.000 dan 1/25.000). Pada konsentrasi gamma-globulin 1/1.000 (0,5 g/ml) memberikan reaksi positif terhadap pengenceran sampel 1/10 dan pengenceran *goat antirabbit* (1/10.000 dan 1/25.000). Tahap absorbansi terhadap gamma-globulin dengan ekstrak daun tembakau 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 gamma-globulin yang diabsorpsi dan sampel sehat yang nilai absorbansinya lebih kecil dari 0,1. Konsentrasi gamma-globulin yang optimal untuk deteksi CMV adalah sebesar 1/500 (1 g/ml) dengan pengenceran sampel dan *goat antirabbit*, masing-masing sebesar 1/10 dan 1/25.000, dengan nilai absorbansinya 1,41, atau konsentrasi gamma-globulin sebesar 1/500 (1 g/ml) dengan pengenceran sampel dan *goat antirabbit*, masing-masing sebesar 1/100 dan 1/10.000, dengan nilai absorbansinya 1,21. Menurut Wisler *et al.* (1982), nilai absorbansi yang optimal akan diperoleh dengan penggunaan konsentrasi gamma-globulin yang tepat.

KESIMPULAN

Hasil pengujian kepekaan gamma-globulin antiserum poliklonal CMV menunjukkan bahwa konsentrasi pemurnian gamma-globulin dari antiserum CMV sebesar 1 g/ml. Dengan uji ELISA tidak langsung, konsentrasi gamma-globulin yang optimal untuk deteksi CMV pada tanaman tapak dara yang terinfeksi adalah sebesar 1/500 (1 g/ml) dengan pengenceran *goat antirabbit* dan sampel, masing-masing sebesar 1/25.000 dan 1/10 atau konsentrasi gamma-globulin sebesar 1/500 (1 g/ml) dengan pengenceran *goat antirabbit* dan sampel, masing-masing sebesar 1/10.000 dan 1/100.

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. Anonymous, 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. Flasinski, S., Scott, S.W., Barnett, O.W. and Sun, C. 1995. Diseases of peperomia, impatiens, and hibbertia caused by cucumber mosaic virus. *Plant Disease* 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 Disease.* 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.* 31:51-59.
8. Muharam, A., I.B. Rahardjo dan Y. Sulyo. 2001. Studi pembuatan antiserum poliklonal terhadap virus mosaik ketimun (CMV) pada krisan. Laporan Balai Penelitian Tanaman Hias.
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. Noordam, D. 1973. *Identification of plant viruses. Methods & experiments*. Center for Agric. Publish. And Documentation. Wageningen 207p.
11. 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.