

Perbandingan Pola Migrasi Virion dan Nilai Absorbansi (A_{405}) untuk Membedakan Galur CMV (Comparison of Virion Migration Patterns and the Absorbance Value [A_{405}] for CMV Strain Differentiation)

WIWIEK SRI WAHYUNI

Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jalan Kalimantan III No. 23, Jember 68121

Diterima 24 Oktober 1996/Disetujui 14 Mei 1997

Strains of CMV could be distinguished by ELISA. However, the used of antiserum raised from two kinds of stored antigens in two different ELISA procedures did not clearly show differences on the A_{405} values. CMV-28 in indirect ELISA seemed was confined in between subgroups I and II of CMV, while it was grouped into subgroup II in DAS-ELISA. The virion analysis of CMV did not differentiate strains into the same serogroups as those of the ELISA tests. Strains of CMV-13 and CMV-28 showed two bands with a very slow migration band. This additional band might be the degraded virion particle which could occur either during v i m preparation or electrophoresis. There was no correlation between symptoms variations, the A_{405} value in ELISA, and the electrophoretic mobility of virion of CMV strains, particularly for distinguishing them into different subgroups.

PENDAHULUAN

Cucumber mosaic virus (CMV) mempunyai sejumlah galur dengan kisaran inang yang sangat luas (Francki et al. 1979). Virus ini menginduksi gejala yang bervariasi dan menyebabkan kerugian yang berarti pada komoditas pertanian penting (Quiot 1980). Virus ini mempunyai partikel yang isometrik, berukuran 280 nm dan termasuk virus yang sulit sekali diidentifikasi secara biologi di lapangan atau di rumah kaca (Matthews 1991). Galur-galur CMV dibagi menjadi dua subgrup yang berbeda yaitu subgrup I dan II berdasarkan pada sifat biologi (Marrou et al. 1975), serologi (Devergne & Cardin 1970, Porta et al. 1989), dan pada hibridisasi asam nukleatnya (Owen & Palukaitis 1988, Wahyuni et al. 1992). Penggunaan prosedur ELISA langsung yang baku ternyata sering kurang dapat menjelaskan kedekatan kekerabatan anggota yang berada dalam satu subgrup apabila konjugat dibuat dari antibodi melawan satu macam galur virus dari salah satu anggota subgrup sehingga hasilnya harus dibandingkan dengan prosedur lain (Koenig 1978, 1981; Devergne et al. 1981; Wahyuni et al. 1992).

Rodriguez-Alvarado et al. (1995) juga menemukan bahwa mobilitas virion, secara elektroforesis dapat digunakan untuk membedakan isolat-isolat CMV menjadi dua subgrup yang berbeda seperti yang dideskripsikan Owen & Palukaitis (1988). Lot & Kaper (1976) menemukan bahwa galur-galur CMV yang menginduksi gejala penyakit berbeda-beda pada tanaman indikator ternyata mempunyai sifat serologi yang khas. Sifat serologi yang berbeda dari galur-galur ini mempunyai hubungan langsung dengan mobilitas virionnya. Sebaliknya, Hanada (1984) menemukan bahwa variasi gejala yang diinduksi oleh galur CMV yang berbeda ternyata tidak selalu berhubungan dengan pola mobilitas virion-virionnya.

Percobaan ini dilakukan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara mobilitas virion secara elektroforesis dengan sifat serologi galur-galur CMV yang dicerminkan melalui nilai absorbansi (A_{405}) pada ELISA dengan menggunakan antiserum dari virus *fixed* atau *unfixed*, terutama untuk membedakannya menjadi dua subgrup yang berbeda.

BAHAN DAN METODE

Galur Virus dan Perbanyakannya. Galur CMV-3 berasal dari tomat (Segunung), CMV-5 dari mentimun (Sukabumi), CMV-13 dari *Vigna unguiculata* (Subang), CMV-16 dari pisang ambon (Yogyakarta), CMV-17 dari pisang ambon (Jakarta), CMV-21 dari tembakau H-382 (Jember), CMV-23 dari jahe (Yogyakarta), CMV-28 dari tembakau Kasturi (Jember), CMV-41 dari *Ixora sp.* (Rangkasbitung), dan CMV-52 dari *Phaseolus lunatus* (Segunung). Semua virus ini diperbanyak pada *Nicotiana glutinosa* dan dipanen 12 hari setelah inokulasi (h.s.i).

Purifikasi Virus secara Parsial dan Penyimpanannya. Purifikasi virus dari daun *N. glutinosa* dilakukan mengikuti metode Lot & Kaper (1976) yang sudah dimodifikasi sebagai berikut: 100 g daun diekstraksi dengan 200 ml bufer sitrat (bufer A; 0.5 M Na-sitrat, 0.005 M Na-EDTA, pH 6.5) yang mengandung 0.5% asam tioglikolat (TGA) dan 100 ml kloroform. Ekstrak daun disentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10,000 rpm kemudian supernatan ditambahi PEG-6000 sampai 10% (v/b) dan diaduk selama 30 menit pada 4°C. Campuran ini disentrifugasi pada kecepatan 10,000 rpm selama 10 menit dan pelet dilumatkan dengan bufer borat (bufer B: 0.05 M Na-tetraborat, 0.005 M Na-EDTA, pH 9.0) dengan volume 40-50 ml/100 g daun dan 2% Triton X-100, selanjutnya campuran disentrifugasi lagi pada 10,000 rpm selama 30 menit. Pelet dilumatkan dengan bufer B, dan diklarifikasi

pada 10,000 rpm selama lima menit. Supernatan adalah suspensi virus. Konsentrasi virus ditera dengan spektrofotometer sinar UV pada $A_{260} = 5.0$ (Francki *et al.* 1979). Virus disimpan sebagai virus *fixed* (4°C) dengan 0.25% glutaraldehida (EM-grade) atau sebagai virus *unfixed* (dalam 50% gliserol pada -20°C) (Rao *et al.* 1982).

Imunisasi Kelinci dan Titer Poliklonal Antiserum. Kelinci lokal diimunisasi dengan 0.5 mg/ml virus semi-murni (*fixed* atau *unfixed antigen*) yang sudah diemulsikan dengan *incomplete freund adjuvant* sampai 50%. Injeksi dilakukan secara subkutan dengan interval dua minggu sampai antiserum mencapai titer 256-512 pada uji imunodifusi gel. Antiserum dititrasi menurut Van Regenmortel (1982) dan disimpan pada 4°C dengan penambahan 0.02% NaN_3 .

ELISA Tidak Langsung dengan Antiserum yang Tidak Difraksionasi. Metode yang dilakukan adalah modifikasi metode Clark *et al.* (1986) dan Mowatt & Dowson (1987). *Microtiter plate* langsung diisi *unfixed* CMV-13, -16, -21, -28, -52 (Gambar 1A), atau *fixed* CMV-3, -5, -17, -23, -41 (Gambar 1B) secara serial dua kali dengan pengenceran bufer sitrat (pH 6.5) (mulai dari konsentrasi 1 mg/ml) yang diinkubasikan selama tiga jam pada 30°C. *Microtiter plate* yang sudah mengikat antigen diblok dengan 1% BSA dalam 0.14 M NaCl dan diinkubasikan selama satu jam pada 30°C. Konjugasi antigen I yaitu dengan serum anti-*unfixed* CMV-13 (1/64, Gambar 1A) atau serum anti-*fixed* CMV-23 (1/512, Gambar 1B) dalam bufer konjugat, yang diinkubasikan semalam pada 4°C. Konjugasi II dengan *goat anti-rabbit APase* (1/3000, Agdia Chem. Co.) dalam bufer konjugat dan diinkubasikan selama tiga jam pada 30°C. Larutan substrat p-nitrofenil fosfat (Sigma Chem. Co.) dalam bufer dietanolamina, pH 9.8 (1 mg/ml) ditambahkan pada kompleks antigen-antibodi dan A_{405} dibaca setelah 60 menit pada *Dyna-Tech Mini Reader* II. Pada setiap langkah ELISA, *microtiter plate* dicuci tiga kali lima menit dengan 1/2x PBS-T.

ELISA Langsung (DAS-ELISA). Cara ini digunakan untuk membandingkan hasil pemisahan galur-galur CMV yang telah diperoleh dengan ELISA tidak langsung. Pembuatan imunoglobulin-G (IgG) dari serum anti-*fixed* CMV-23 dan serum anti-*unfixed* CMV-13 dan konjugasinya dengan alkanin fosfatase (APase) dilakukan menurut Clark *et al.* (1986). *Microtiter plate* diisi IgG (0.5 mg/ml), kemudian diblok dengan 1% BSA, dan selanjutnya diisi dengan *fixed* CMV-13, -16, -21, -28, -52 (Gambar 1C), atau *fixed*-CMV-3, -5, -17, -23, -41 (Gambar 1D) secara serial dua kali dengan pengenceran bufer sitrat (mulai dari konsentrasi 1 mg/ml). Antigen yang sudah tertangkap oleh IgG dikonjugasi dengan *unfixed* CMV-13 IgG-APase (Gambar 1C) atau dengan *fixed* CMV-23 IgG-APase (Gambar 1D) dalam bufer konjugat. Setelah 60 menit penambahan substrat, A_{405} dibaca pada *Dyna-Tech Mini Reader* II.

Ekstraksi Virion dan Elektroforesisnya. Virion diekstraksi dari daun *N. glutinosa* menurut metode Rodriguez-Alvarado *et al.* (1995). Satu gram daun segar (10-12 h.s.i) dilumatkan dalam mortar yang sangat dingin dengan menambahkan 2 ml 0.2 M Na-sitrat pH 6.5 dingin

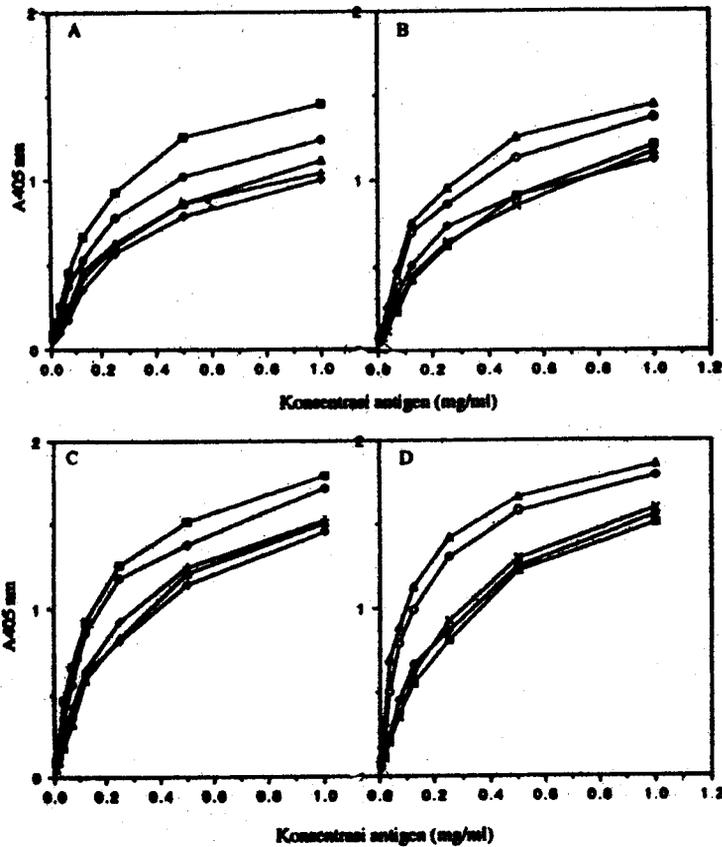
yang mengandung 4% merkaptotanol. Ekstrak ditambah 0.5 ml kloroform dingin, divorteks selama satu menit dan disentrifugasi pada 10,000 rpm selama 10 menit. Supernatan ditambah campuran 14% PEG-8000 dan 0.2 M Na-sitrat pH 6.5 dingin pada volume yang sama dan diinkubasikan lima jam sampai semalam (4°C), kemudian disentrifugasi pada 5,000 rpm selama 30 menit. Pelet dilumat dalam 0.5 ml campuran 5 mM EDTA dan 5% sukrosa, divorteks selama satu menit dan disentrifugasi pada 5,000 rpm selama lima menit. Supernatan adalah suspensi virus. Virion kemudian dielektroforesis pada 1.2% gel agarosa dalam bufer TAE selama 90 menit, pada 75V dan dicat dengan EtBr.

HASIL

Sifat Serologi Galur CMV. Pada ELISA tidak langsung dengan serum anti-*unfixed* CMV-13 (Gambar 1A) atau dengan serum anti-*fixed* CMV-23 (Gambar 1B) yang belum difraksionasi menunjukkan bahwa galur CMV-13, CMV-17 dan CMV-23 dapat dipisahkan dari galur CMV-52, 16, 3, 5, dan 41. DAS-ELISA dengan menggunakan konjugat dari serum anti-*unfixed* CMV-13 (Gambar 1C) atau serum anti-*fixed* CMV-23 (Gambar 1D) juga memberikan hasil yang sama dengan ELISA tidak langsung, kecuali CMV-28. Hasil pemisahan ini sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya yaitu dengan uji imunodifusi gel atau dengan membandingkan kecepatan migrasi RNA-2 beberapa galur CMV, dan CMV-13, -17, -23 termasuk dalam subgroup II sedang CMV-52, -16, -3, -5, -41 termasuk dalam subgroup I (Wahyuni & Sulyo, 1995). Galur CMV-28 pada ELISA tidak langsung tampak berada pada posisi di antara subgroup I dan II, tetapi pada DAS-ELISA, CMV-28 lebih condong menjadi milik subgroup II. Pemisahan galur-galur CMV menjadi dua subgroup ini lebih jelas ditunjukkan pada DAS-ELISA daripada ELISA tidak langsung. Dengan menggunakan konsentrasi antigen yang sama, galur-galur CMV mempunyai nilai A_{405} lebih tinggi pada DAS-ELISA (Gambar 1 C & D) daripada ELISA tidak langsung (Gambar 1A & B). Penggunaan serum anti-*fixed* atau *unfixed* CMV pada kedua prosedur ini kurang memberikan perbedaan yang jelas pada nilai A_{405} dari galur-galur yang diuji.

Analisis Virion. Pada elektroforesis ini tidak digunakan galur CMV yang sudah diketahui benar sifat biokimiawinya yaitu galur Q atau S (yang mengandung satelit-RNA) karena hasil ekstraksi virion dari kedua galur ini sangat rendah (0.05 mg/10 g daun), sedangkan hasil ekstraksi virion dari galur lainnya bervariasi dari 0.5-3.5 mg/10 g daun.

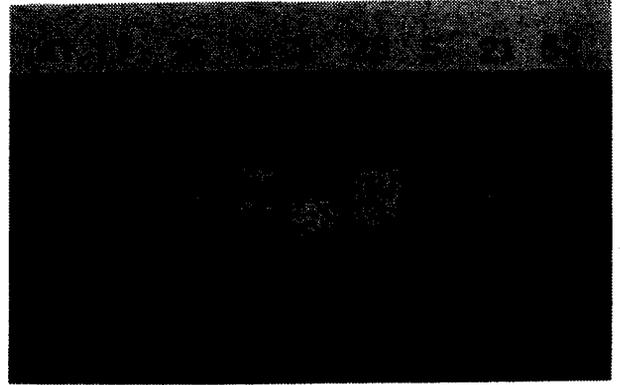
Mobilitas virion CMV-41, CMV-16, CMV-21 dan CMV-52 sedikit lebih lambat daripada CMV-17, CMV-5 dan CMV-3. Tampak bahwa CMV-13 dan CMV-28 terpisah menjadi dua pita RNA dengan mobilitas elektroforetik yang berbeda. Pita yang teratas adalah pita minor (tambahan) dan mobilitasnya lebih lambat dibandingkan dengan pola mobilitas virion CMV-41, CMV-16 atau CMV-21 (Gambar 2).



Gambar 1. Pemisahan galur-galur CMV menjadi subgrup dengan ELISA tidak langsung dan dengan DAS-ELISA. Pada ELISA tidak langsung digunakan serum anti-*unfixed* CMV-13: 1/64 (A) atau serum anti-*fixed* CMV-23: 1/512 (B) dan pada DAS-ELISA digunakan konjugat dari serum anti-*unfixed* CMV-13: 1/512 (C) atau serum anti-*fixed* CMV-23: 1/1024 (D). Pada 1A digunakan *unfixed* antigen dan pada 1B, C, dan D digunakan *fixed* antigen.

PEMBAHASAN

Reaksi antigen-antibodi galur-galur CMV pada DAS-ELISA lebih tinggi daripada ELISA tidak langsung karena antigen yang terimobilisasi pada fase padat (*microtiter plate*) oleh gaya elektrostatis dideteksi secara langsung oleh antibodi berlabel spesifik (konjugat) sehingga kepekaannya menjadi lebih tinggi daripada ELISA tidak langsung (Clark *et al.* 1986). Pada kedua macam prosedur ELISA ini, CMV-28 tampak berbeda posisinya meskipun antiserum yang digunakan berasal dari satu galur virus (CMV-13) yang disimpan dengan cara berbeda. Hal ini menyebabkan pemisahan CMV-28 ke dalam subgrup agak sulit dibandingkan dengan pemisahan galur lainnya. Keadaan yang sama juga diamati pada galur CMV-LY dari Australia bahwa galur ini tidak jatuh pada subgrup I atau II dengan uji imunodifusi gel atau dengan ELISA, tetapi termasuk subgrup II dengan hibridisasi *northern-blot*



Gambar 2. Analisis CMV-41, -17, -16, -13, -3, -28, -21 dan -52 virion (0.25 mg/ml/lubangan) pada 1.2% agarosa dalam bufer TAE

(Wahyuni *et al.* 1992). Keadaan ini diterangkan oleh Bar-Joseph & Solomon (1980); Lommel *et al.* (1982) dan Dekker *et al.* (1989) bahwa subunit protein virus mempunyai *combining-sites* yang karakteristik dan dapat tersembunyi bila subunit-subunit itu terpaket dalam selubung protein yang padat dan utuh sehingga reaksinya dengan antibodi dari galur yang heterolog dapat berbeda.

Analisis virion dari isolat-isolat CMV agak sedikit rancu karena mobilitas elektroforetiknya tidak tampak berbeda nyata. Galur CMV-17 dan 13 yang jatuh pada subgrup II CMV pada ELISA ternyata tidak tepat terpisah menjadi subgrup yang berbeda pada analisis virionnya. Bahkan CMV-5 dan CMV-3, keduanya dari subgrup I pada ELISA, mempunyai mobilitas elektroforetik yang sama dengan CMV-17. Rodriguez-Alvarado *et al.* (1995) dan Flasiniski *et al.* (1995) menunjukkan bahwa mobilitas virion dari isolat yang tergolong dalam satu subgrup relatif sama dan hanya sedikit sekali perbedaan kecepatannya, sedangkan migrasi galur S (subgrup II) sangat cepat sekali. Pada galur CMV-13 dan CMV-28, subunit protein virion bersama sebagian genomnya sedikit terdisosiasi oleh penyimpanan tanpa penambahan gliserol selama lebih dari 24 jam pada 4°C, tetapi pemisahan subunit ini tidak selalu terjadi pada percobaan lain (data tidak disajikan). Penampakan dua pita RNA yang berbeda dari kedua galur ini juga diamati oleh Flasiniski *et al.* (1995) yaitu pita minor adalah subunit protein yang teragregasi selama preparasi atau elektroforesis sehingga bobot molekulnya menjadi lebih besar dan migrasinya menjadi lebih lambat daripada partikel yang utuh. Pada analisis ini, virion dicat dengan etidium-bromida yang sebenarnya mengekspresikan RNA virus (Sambrook *et al.* 1989) dan bukan proteinnya, tetapi juga dapat mencerminkan muatan permukaan dari partikel virus (Hanada 1984). Namun demikian, Flasiniski *et al.* (1995) dan Rodriguez-Alvarado *et al.* (1995) menyimpulkan bahwa analisis virion galur-galur CMV pada agarosa bukanlah cara yang baik untuk membedakannya menjadi subgrup.

Galur-galur CMV yang digunakan pada penelitian ini menginduksi gejala eksternal yang bervariasi pada *N. glutinosa* (Wahyuni & Sulyo 1995). Pada penelitian ini

tidak ditunjukkan adanya hubungan yang spesifik antara penampakan gejala, ELISA dan mobilitas virionnya, sehingga hasilnya kurang dapat digunakan untuk memisahkan galur-galur CMV menjadi subgrup yang berbeda. Meskipun ELISA adalah cara yang baik dan peka untuk membedakan galur atau jenis virus yang sekerabat (Koenig 1978, 1981; Porta *et al.* 1989), tetapi analisis sifat RNA virus misalnya dengan hibridisasi *northern blot* (Owen & Palukaitis 1988; Wahyuni *et al.* 1992) atau dengan RT-PCR (Wylie *et al.* 1993; Hu *et al.* 1995) lebih dipercaya hasilnya sampai saat ini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Yoyo Sulyo, M.S. dan staf Instalasi Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cipanas atas penyediaan isolat-isolat CMV dan bantuan teknis pelaksanaan penelitian. Penelitian ini didanai dari Riset Unggulan Terpadu II tahun 1995/96, dengan nomor kontrak 2101/SP-KD/PPIT/IV/95.

DAFTAR PUSTAKA

- Bar-Joseph, M. & R. Solomon. 1980. Heterologous reactivity tobacco mosaic virus strains in enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Gen. Virol.* 47: 509-512.
- Clark, M.F., R.M. Lister & M. Bar-Joseph. 1986. ELISA techniques. *Methods in Enzymology* 118 : 742-766.
- Dekker, E.L., C. Porta & M.H.V. Van Regenmortel. 1989. Limitations of different ELISA procedures for localizing epitopes in viral coat protein subunits. *Arch. Virol.* 105: 269-286.
- Devergne, J.C. & L. Cardin. 1970. Etude serologique comparative de plusier isolats du virus et de la mosaique du concombre (CMV). Relation serologique au niveau du virus et de l'antigene soluble. *Ann. Phytopathol.* 2: 639-661.
- Devergne, J.C., L. Cardin, J. Burkard & M.H.V. Van Regenmortel. 1981. Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related Cucumoviruses. *J. Virol. Meth.* 3: 193-200.
- Flasinski, S., S.W. Scott, O.W. Barnett & Chao-Sun. 1995. Diseases of *Peperomia*, *Impatiens* and *Hibbertia* caused by cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 79: 843-848.
- Francki, R.L.B., D.W. Mossop & T. Hatta. 1979. Cucumber Mosaic Virus. *Description of Plant Viruses*. No. 213. Kew: CMI/AAB.
- Hanada, K. 1984. Electrophoretic of virus particles of fourteen Cucumoviruses isolates. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 361-367.
- Hu, J.S., H.P. Li, K. Barry & M. Wang. 1995. Comparison of dotblot, ELISA and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Dis.* 79: 902-906.
- Koenig, R. 1978. ELISA in the study of homologous and heterologous reactions of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 40: 309-318.
- Koenig, R. 1981. Indirect ELISA, methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 55: 53-62.
- Lommel, S.A., A.H. McCain & T.J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathology* 72: 1018-1022.
- Lot, H. & J.M. Kaper. 1976. Physical and chemical differentiation of three strains of cucumber mosaic virus. *Virology* 74: 209-222.
- Marrou, J., J.B. Quiot, G. Marhoux & M. Duteil. 1975. Caracterization par la symptomatologie de quatorze souches du virus de la mosaique du concombre et de deux autres cucumovirus. Tentative de classification. *Meded. Fac. Landbouww. Rejks. Uni. Gent.* 40: 107-117.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 2nd Ed. New York: Academic Press.
- Mowatt, W.P. & S. Dowson. 1987. Detection and identification of plant viruses by ELISA using crude sap extracts and unfractionated antisera. *J. Virol. Meth.* 15: 233-247.
- Owen, J. & P. Palukaitis. 1988. Characterization of cucumber mosaic virus. I. Molecular heterogeneity mapping of RNA 3 in eight CMV strains. *Virology* 166: 495-502.
- Porta, C., J.C. Devergne, L. Cardin, J.P. Brian & M.H.V. Van Regenmortel. 1989. Serotype specificity of monoclonal antibodies to cucumber mosaic virus. *Arch. Virol.* 104: 271-285
- Quiot, J.B. 1980. Ecology of cucumber mosaic virus in the Rhone Valley of France. *Acta Hort.* 88: 9-21.
- Rao, A.L.N., T. Hatta & R.L.B. Francki. 1982. Comparative studies on tomato aspermy and cucumber mosaic viruses. VII. Serological relationships reinvestigated. *Virology* 116: 318-326.
- Rodriguez-Alvarado, G., G. Kurath & J.A. Dodds. 1995. Heterogeneity in pepper isolates of cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 79: 450-455.
- Sambrook J., E.F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York: Cold and Spring Harbor Laboratory Press.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1982. *Serology and Immunochemistry of Plant Viruses*. London: Academic Press.
- Wahyuni, W.S., R.G. Dietzgen, K. Hanada & R.L.B. Francki. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 282-297.
- Wahyuni, W.S. & Y. Sulyo. Proc. Second Conference on Agr. Biotech. (In Press).
- Wylie, S., C.R. Wilson, R.A.C. Jones & M.G.K. Jones. 1993. A polymerase chain reaction assay for cucumber mosaic virus in lupin seeds. *Austr. J. Agric. Res.* 44: 41-51.