PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

PEMANFAATAN ANTISERUM SEBAGAI PENDETEKSI *CHRYSANTHEMUM VIRUS B* (CVB) PADA TANAMAN KRISAN

PKM - AI

Oleh :

Fitri Menisa	A34050616 (2005)
Leny Isnawati	A34051288 (2005)
Rr.Laras Anjarani	A34062876 (2006)

INSTITUT PERTANIAN BOGOR

BOGOR

2009

LEMBAR PENGESAHAN
LAPORAN AKHIR PROGRAM KREATIVITAS MAHASISWA

1. Judul Kegiatan : Pemanfaatan Antiserum Sebagai Pendeteksi *Chrysanthemum Virus B* (CVB) Pada Tanaman Krisan
2. Bidang Kegiatan : (x) PKM-AI ( ) PKM-GT

3. Ketua Pelaksana Kegiatan
   a. Nama Lengkap : Fitri Menisa
   b. NIM : A34050616
   c. Departemen : Proteksi Tanaman
   d. Universitas : INSTITUT PERTANIAN BOGOR
   e. Alamat Rumah/HP : 08567200431
   f. E-mail : aidil_fitri@plasa.com
4. Anggota pelaksana Kegiatan : 2 orang
   1. Leny Isnawati
   2. Rr. Laras Anjarsari
5. Dosen Pembimbing
   a. Nama Lengkap dan Gelar : Dr. Ir. Gede Suastika MSc
   b. NIP : 131669946
   c. Alamat Rumah/HP : Jl. Astrajingga III/7, Bumi Indraprasta, Bogor/ 081315547592

Bogor, 23 Februari 2009

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERTANIAN

Menyetujui,
Ketua Departemen

Dr. Ir. Dadang, MSc
NIP. 131879337

Ketua Pelaksana Kegiatan

Fitri Menisa
NIM. A34050616

DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

Wakil Rektor Bidang Akademik dan Kemahasiswaan,

Prof. Dr. Ir. Yonny Koesmaryono, MS
NIP. 131473999

Dosen Pembimbing

Dr. Ir. Gede Suastika, Msc
NIP. 131669946

PEMANFAATAN ANTISERUM SEBAGAI PENDETEKSI *CHRYSANTHEMUM VIRUS B* (CVB) PADA TANAMAN KRISAN

FITRI MENISA. Pemanfaatan Antiserum Sebagai Pendeteksi *Chrysanthemum Virus B* (CVB pada Tanaman Krisan. Dibimbing oleh **GEDE SUASTIKA** .

ABSTRAK

Krisan (Dendrahthema grandiflora) adalah salah satu jenis tanaman bunga potong yang banyak diminati oleh masyarakat mancanegara karena daya tarik, warna, bentuk dan ukurannya yang beraneka ragam. Dalam budidaya tanaman krisan, banyak kendala yang dialami oleh para petani dan pengusaha. Salah satu kendala tersebut adalah serangan penyebab penyakit yang menyebabkan kerugian utama dalam produksi krisan yaitu rendahnya kualitas bibit krisan potong (bahan perbanyakan vegetatif) sehingga menyebabkan adanya penolakan bibit krisan oleh para eksportir di tingkat internasional. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi virus Chrysanthemum Virus B yang ada pada bibit krisan, sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat membantu petani dan pengusaha bibit tanaman krisan.

Sampel yang diduga terinfeksi CVB diambil dari pembibitan krisan di Cipanas, Cianjur, Jawa Barat, dengan luas minimal sekitar 300-500m^2. Pengamatan dilakukan pada bagian daun dan bunga tanaman krisan. Setelah itu dilakukan uji serologi dengan membandingkan dua metode, yaitu metode ELISA dan DIBA. Tanaman krisan yang diduga terinfeksi CVB dari lokasi pengamatan dikoleksi dan kemudian dipelihara di rumah kaca untuk digunakan sebagai bahan penelitian (sumber inokulum).

Berdasarkan hasil penelitian mengenai cara mendeteksi Chrysanthemum Virus B (CVB) pada tanaman krisan, dapat diketahui bahwa metode pengujian dengan ELISA dan DIBA dapat digunakan untuk mendeteksi Chrysanthemum Virus B (CVB), namun metode yang lebih efektif dan efisien dalam aplikasi dilapang adalah dengan metode DIBA.

Keyword : CVB, ELISA, DIBA

PENDAHULUAN

Latar Belakang

Krisan (*Dendrahthema grandiflora*) adalah salah satu jenis tanaman bunga potong yang banyak diminati oleh masyarakat mancanegara karena daya tarik, warna, bentuk, dan ukurannya yang beraneka ragam. Di Indonesia, krisan banyak dibudidayakan oleh petani dalam skala kecil maupun skala besar oleh perusahaan agribisnis terutama di provinsi Jawa Barat, Jawa Timur, Jawa Tengah, dan Sumatera Utara. Di samping untuk memenuhi kebutuhan dalam negeri, krisan diproduksi untuk memenuhi kebutuhan luar negeri, seperti negara-negara Eropa, Jepang, dan negara Asia lainnya. Ekspor tanaman krisan bisa dalam bentuk bunga potong, tetapi yang lebih banyak adalah dalam bentuk stek batang (PT. Saung Mirwan 2007).

Permintaan bunga potong dan tanaman krisan pot di pasar dalam negeri (domestik) maupun pasar internasional makin meningkat dari tahun ke tahun. Situasi ini memberi peluang bagi para petani produsen dan pengusaha bunga krisan untuk meningkatkan kuantitas, kualitas, dan kontinuitas produksi bunga krisan yang sesuai untuk permintan pasar (Marwoto 1999).

Indonesia sebagai salah satu komunitas dunia, bila ingin produk krisannya laku di pasar dunia, harus mengikuti aturan perdagangan internasional terutama perlakuan karantina tumbuhan. Sertifikasi bahan tanaman krisan bebas virus membutuhkan metode deteksi yang cepat dan akurat. Tantangan ini mendorong penelitian yang mengarah pada penyediaan metode deteksi CVB dengan menggunakan antiserum yang dapat diterapkan untuk memenuhi kebutuhan sertifikasi. Sertifikasi yang didukung metode deteksi handal diharapkan dapat menyelamatkan ekspor krisan Indonesia.

Pada tahun 2004, luas lahan krisan di Indonesia mencapai 154,3 Ha dengan produksi 27.683.449 tangkai, yang sebagian besar ditanam di provinsi Jawa Barat yaitu dengan luas panen 105,6 Ha dengan produksi 23.386.679 tangkai. Provinsi lainnya adalah Jawa Timur, Jawa Tengah, Sumatera Utara, Sulawesi Utara, dan Bali (Direktorat Jendral Produksi Hortikultura 2005).

Dalam memproduksi tanaman krisan, para petani dan pengusaha banyak menemukan kendala, di antaranya penurunan produksi dan kualitas tanaman krisan yang disebabkan oleh serangan patogen. Adapun penyakit utama pada tanaman krisan adalah *Chrysanthemum virus B* (CVB). Penyakit penting lainnya adalah karat hitam (*Puccinia chrysantemi*), karat putih (*P. horiana*), bercak daun septoria (*Septoria chrysantemi* Allesch dan *S. leucanthemi* Sacc. et Speg.), layu cendawan (*F. oxysporum* Schlecht. Ex Fr. Dan *Verticillium alboratrum* Reinke et Bert.), *Chrysanthemum stunt viroid* (CsVD) (Pirone 1978 & Semangun 1991).

Krisan umumnya diperbanyak secara vegetatif untuk produksi bunga potong maupun tanaman dalam pot, sehingga status bebas penyakit pada tanaman sumber perbanyakan sangatlah penting. Perbanyakan bibit secara vegetatif umumnya akan terancam oleh masalah degenerasi yang dapat disebabkan oleh beberapa faktor, terutama infeksi patogen yang bersifat sistemik, khususnya virus. Kemudian diperbanyak secara vegetatif dengan metode konvensional, maka virus akan terbawa pada keturunannya.

Pengaruh infeksi virus pada tanaman krisan dapat menyebabkan kerugian secara kualitas maupun kuantitas. Berdasarkan laporan Horst et al. (1997), bahwa pengaruh infeksi virus seperti ChSV dapt mengurangi diameter bunga sebesar 9% dan panjang tangkai bunga sebesar 15%. Sedangkan CVB dapat mengakibatkan kerusakan tanaman rata-rata mencapai 80%. CVB yang merupakan salah satu agens utama penyebab penyakit virus pada tanaman krisan menyebabkan berbagai manifestasi gejala pada tanaman krisan. *Motling* daun atau *vein-clearing* yang sangat *mild* adalah gejala yang paling umum (Hollings, 1957; Holings & Stones, 1972; Moan, 1987). Beberapa varietas terinfeksi menunjukkan penurunan kualitas bunga dibandingkan dengan tanaman yang bebas virus. Penurunan kualitas bunga terutama karena pada tanaman yang terinfeksi, warna mahkota bunga terputus-putus (*flower breaks*), mengalami distorsi dan kerdil. Kadang-kadang pada tanaman krisan terinfeksi CVB berkembang *nekrotic streaks* cokelat pada floret, dan sering sekali tidak menunjukkan gejala (*symptomless*).

CVB dapat ditularkan melalui inokulasi mekanik dan grafting. Di lapang, virus ini dapat ditularkan secaa non-persisten oleh kutu daun *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Coloradoa rufomaculata* dan *Macrosiphoniella sanborni* (Hollings & Stones, 1972; Moran, 1987).

Sedangkan penyebaran jarak jauh CVB terjadi terutama melalui bahan perbanyakan vegetatif tanaman. Hal inilah yang menyebabkan negara-negara pengimpor krisan menerapkan aturan ketat terhadap semua bahan tanaman krisan harus bebas virus.

Di daerah pertanaman krisan di gunung Cipanas, ditemukan gejala penyakit *mild motling* dan *vein clearing* pada daun, mirip gejala yang disebabkan oleh infeksi CVB. Penyakit ini diduga disebabkan oleh virus. Berdasarkan gejala yang mirip dengan serangan CVB, maka perlu dilakukan identifikasi melalui pengujian sifat-sifat suatu virus yang meliputi deskripsi gejala virus pada tanaman krisan dan uji serologi menggunakan antiserum CVB.

Perumusan masalah

Dalam budidaya tanaman krisan, banyak kendala yang dialami oleh para petani dan pengusaha. Salah satu kendala tersebut adalah serangan penyebab penyakit yang menyebabkan kerugian utama dalam produksi krisan yaitu rendahnya kualitas bibit krisan potong (bahan perbanyakan vegetatif) sehingga menyebabkan adanya penolakan bibit krisan oleh para eksportir di tingkat internasional. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mendeteksi virus *Chrysanthemum virus B* yang ada pada bibit krisan, sehingga diharapkan hasil penelitian ini dapat membantu petani dan pengusaha bibit tanaman krisan.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk penyediaan metode pendeteksi virus CVB pada bibit tanaman krisan potong (*Dendrahthema grandifora*) secara efektif dan efisien.

Luaran yang Diharapkan

Penelitian ini diharapkan dapat mengunakan metode yang tepat, efektif, dan efisien dalam mendeteksi virus CVB di lapangan.

Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat bemanfaat bagi para petani dan pengusaha bibit krisan potong untuk mendeteksi keberadaan CVB dalam upaya meningkatkan kualitas bibit tanaman krisan potong agar sesuai dengan standar internasional.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium virologi dan rumah kaca Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.

Metode Penelitian

Pengamatan dan pengumpulan tanaman yang terinfeksi

Sampel yang diduga terinfeksi CVB diambil dari pembibitan krisan di Cipanas, Cianjur, Jawa Barat, dengan luas minimal sekitar 300-500 m^2. Pengamatan dilakukan pada bagian daun dan bunga tanaman krisan. Lokasi yang dipilih adalah Cianjur (Jawa Barat). Selain pengamatan terhadap gejala dan variasi gejala juga dihitung luas serangan dan tingkat keparahan penyakit.

Tanaman krisan yang diduga terinfeksi CVB dari lokasi pengamatan dikoleksi dan kemudian dipelihara di rumah kaca untuk digunakan sebagai bahan penelitian (sumber inokulum).

Uji Serologi dengan metode I-ELISA

Reaksi sampel terhadap antiserum CVB dengan metode I-ELISA, dilakukan berdasarkan metode Stack & Macmillan (2005). Sampel tanaman terinfeksi CVB digerus dalam *buffer coating* (*sodium carbonate* 0,16 g, *sodium bicarbonato* 0,29 g, *sodium azide* 0,02 g, *polyvinylpyrrolidone* 2 g yang dilarutkan dalam 100 ml dH_2O, pH 9,6) dengan perbandingan 1:10 (b/v). Sampel tersebut dimasukkan dalam masing-masing sumuran pada plat mikrotiter ELISA sebanyak 100µl dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Selanjutnya masing-masing sumuran dicuci sebanyak 6 kali dengan PBS (*Sodium chloride* 8 g, *sodium phospate* 1,15 g, *potasium phospate* 0,2 g, *potasium chloride* 0,2 g dan dilarutkan dalam 1000 ml dH_2O (pH 7,0) yang mengandung tween dengan konsentrasi akhir 0,05% (PBST) dan kemudian diisi dengan 100 µl antiserum yang telah dilarutkan dalam buffer ECI (*bovine serum albumin* 0,2 g, *polyvinylpyrrolidone* 2 g, *sodium azide* 0,02 g dan dilarutkan dalam 100ml PBST (pH 7,4). Larutan antiserum tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Selanjutnya masing-masing sumuran dicuci kembali dan diisi dengan 100 µl konjugat (*goat anti rabbit-IgG, Sigma, USA*) yang dilarutkan dalam buffer ECI dengan perbandingan 1:1.000. Larutan konjugat tersebut kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam. Setelah dicuci, sumuran diisi dengan 100 µl substrat *p-nitrophenyl phospate* (PNP) yang dilarutkan dalam buffer PNP (*magnesium chloride hexahydrate* 0,025 g, *sodium azide* 0,05 g, *diethanolamine* 24,25 ml dan dilarutkan dalam 200 ml dH_2O, (pH 9,8). Setelah diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, lakukan pengamatan secara kuantitatif dengan menggunakan ELISA Reader pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi dihentikan dengan cara menambahkan larutan NaOH 3 M sebanyak 50 µm ke dalam masing-masing sumuran. kontrol negatif yang digunakan adalah tanaman sehat dan buffer.

Uji Serologi dengan Metode *Dot Immunobinding Assay* (DIBA)

Metode DIBA dilakukan berdasarkan metode Mahmood *et al.* (1997). Sebelum digunakan membran nitroselulosa direndam dalam metanol 100% selama 10 detik dan dikeringanginkan. Jaringan daun tanaman yang terinfeksi CVB digerus dalam *tris buffer saline* dengan perbandingan 1:10 (b/v) (TBS: Tris-HCL 0,02 M dan NaCl 0,15 M, pH 7,5). Selanjutnya cairan perasan tanaman tersebut diteteskan ke membran nitroselulosa sebanyak 10 µl setiap sampel dengan berbagai konsentrasi. Setelah tetesan sampel kering, membran diinkubasi pada suhu ruang sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm selama 2 jam. Kemudian membran dicuci dengan dH_2O sebanyak 5 kali, tiap pencucian berlangsung 5 menit sambil digoyang dengan kecepatan 100 rpm. Selanjutnya membran direndam dalam 5 ml TS yang mengandung antiserum 5 µl ditambah *non-fat milk* dengan konsentrasi akhir 2% dan kemudian membran diinkubasi semalam pada suhu kamar sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm. Setelah itu, membran dicuci kembali dengan TBS (TBST). Membran direndam selama 5 menit dalam 10 ml buffer substrat (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, dan MgCl2 5M) yang mengandung *nitro blue tetrazolium* (NBT) sebanyak 30 µl dan *bromo chloro indolil phospate* (BCIP) 30 µl. 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 dalam dH_2O.

HASIL PENELITIAN

Pada penelitian ini digunakan antiserum CVB dengan membandingkan dua metode yaitu DAS-ELISA dan DIBA untuk mengetahui keefektifan, keefisienan dan kesensitifan dalam mendeteksi *Chrysanthemum virus B* (CVB) pada tanaman krisan.

Tabel 1. Hasil pengujian dengan metode ELISA

UJI ELISA	Pengenceran cairan perasan sampel tanaman								
	1/2	**1/4**	**1/8**	**1/16**	**1/32**	**1/64**	**1/128**	**1/256**	**1/512**
Nilai absorban I	1,129	1,034	1,057	0,925	0,804	0,812	0,679	0,539	0,614
Nilai absorban II	1,196	1,199	1,155	1,100	1,017	0,872	0,671	0,853	0,519
Rata-rata	**1,163**	**1,1165**	**1,106**	**1,013**	**0,911**	0,842	0,675	0,696	0,566
Nilai absorban kontrol									**0,294**
Buffer									0,195

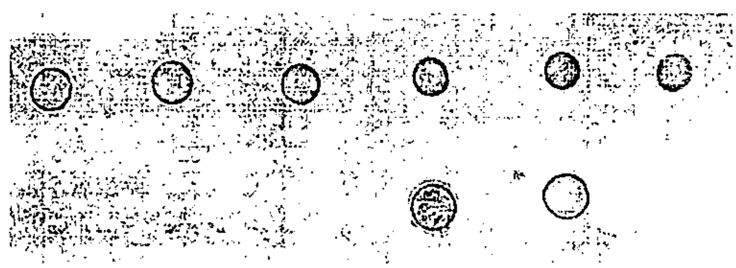
Positif = Nilai rata-rata > 3x lipatnya kontrol negatif (Verma *et all* 2003)

Data kuantitatif hasil penelitian yang diproses di Laboratorium Virologi menunjukkan bahwa pada pengujian metode I-ELISA dengan pengenceran 1/2 sampai 1/512, virus masih dapat terdeteksi pada pengenceran 1/32.

Parameter yang menunjukkan hasil positif adalah nilai rata-rata sampel yang didapat dari hasil pembacaan ELISA *reader* sama dengan tiga kali lipat nilai rata-rata kontrol positif (Verma 2003).

Nilai rata-rata kontrol negatif yang didapat sebesar 0,294. Pada pengenceran 1/2 didapat nilai hasil rata-rata sebesar 1,163 hal ini berarti pada pengenceran tersebut nilai rata-rata yang didapat adalah 3,9x dari kontrol negatif, pada pengenceran 1/4 bernilai 1,1165 hal ini berarti pada pengenceran tersebut nilai rata-rata yang didapat adalah 3,8x dari kontrol negatif, pada pengenceran 1/8 didapat nilai hasil rata-rata sebesar 1,106 hal ini berarti pada pengenceran tersebut nilai rata-rata yang didapat adalah 3,7x dari kontrol negatif, pada pengenceran 1/16 didapat nilai hasil rata-rata sebesar 1,0125 hal ini berarti pada pengenceran tersebut nilai rata-rata yang didapat adalah 3,4x dari kontrol negatif, pada pengenceran 1/32 didapat nilai hasil rata-rata sebesar 0,9105 hal ini berarti pada pengenceran tersebut nilai rata-rata yang didapat adalah 3,1x dari kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa sampel pada pengenceran 1/2 sampai 1/32 positif terkena virus CVB. Dengan demikian sensitifitas dengan metode I-ELISA hanya sampai pada pengenceran 1/32.

1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64



1/128 1/256 1/512 (+) (-) buffer

Gambar 1. Hasil pengujian sampel dengan metode DIBA

Pada pengujian metode DIBA dengan pengenceran 1/2 sampai 1/512 hasil yang didapat berupa data kualitatif. Parameter yang menunjukkan hasil positif adalah perubahan warna yang terjadi pada membran selulosa dari warna putih menjadi warna ungu. Semakin banyak pengenceran yang dilakukan maka kepekatan warna pun semakin berkurang. Pada pengenceran 1/2, warna hijau yang dihasilkan sangat pekat. Hal ini menunjukkan hasil positif dari sampel yang diuji dimana virus dapat terdeteksi namun belum cukup untuk dijadikan sebagai parameter karena masih banyak jaringan daun yang terkandung dalam sap. Dari sap yang diujikan dengan pengenceran 1/2 sampai 1/512 menunjukkan hasil positif (pada pengenceran 1/128 hingga 1/512 reaksinya lemah).

Bila dibandingkan dengan metode I-ELISA, DIBA masih dapat mendeteksi keberadaan virus hingga pengenceran 1/512 sedangkan I-ELISA hanya sampai pengenceran 1/32. Hal ini menunjukkan tingkat kesensitifan DIBA lebih tinggi dibandingkan dengan I-ELISA dalam mendeteksi keberadaan CVB.

Dalam aplikasinya dilapangan, DIBA lebih efektif dan efisien karena memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan I-ELISA diantaranya alat yang digunakan lebih sederhana (tidak perlu alat yang mahal seperti penggunaan ELISA *reader*), membran selulosa yang digunakan sebagai media uji memiliki kapasitas yang lebih besar dibandingkan dengan plat mikrotiter ELISA yang kapasitasnya hanya 96 sumuran hal ini bermanfaat terutama untuk produsen tanaman krisan dan Badan Karantina yang membutuhkan banyak pengujian sampel sebelum melakukan ekspor – impor tanaman krisan, pengujian DIBA dapat langsung dilakukan di lapang, lain halnya dengan metode I-ELISA dimana sampel yang diduga terinfeksi harus diuji di laboratorium.

Dengan demikian, hasil penelitian mengenai cara mendeteksi *Chrysanthemum virus B* (CVB) pada tanaman krisan, dapat diketahui bahwa metode pengujian dengan I-ELISA dan DIBA dapat digunakan untuk mendeteksi *Chrysanthemum virus B* (CVB), metode yang lebih efektif dan efisien dalam aplikasi di lapang adalah pengujian dengan metode DIBA.

KESIMPULAN

Metode pengujian dengan ELISA dan DIBA mampu mendeteksi *Chrysanthemum Virus B* (CVB). Dalam pengujian kali ini metode DIBA lebih efektif dan efisien berdasarkan hasil pengujian dimana virus masih dapat terdeteksi pada pengenceran 1/512 dan alat yang digunakan lebih sederhana.

DAFTAR PUSTAKA

[DJPH] Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura. 2005. Luas panen, rata-rata hasil dan produksi tanaman hortikultura di Indonesia Jakarta. Departemen Pertanian. http://database.deptan.go.id/bdspweb/f4-free-frame.asp [6 Januari 2006].

Abouzid AM, Freitas-Astua J, Purcipull DE, Polston JE, Beckham KA, Crawford WE, Petersen MA, Pesyer B, Patte C, Hiebert E. 2002. Serological studies using polyclonal antisera prepared against the viral coat protein of four *Begomovirus* expressed in *Escherichia coli.* Plant Dis 86: 1109-1114.

Agrios GN. 1997. Plant Pathology. 4th ed. California Academic Press, Inc.

Blackman RL & VF Eastop (2000) Aphids on the World's Crop. An Identification and Information Guide 2nd eds. John Wiley and Sons. Chichester – New York – Brisbane – Toronto – Singapore.

Carter GD. 1992. Potted Chrysanthemums. In: Larson RA, editor. Introduction to Floriculture, Academic Press, Inc., San Diego. P. 249-287.

Chen TM, Chen MJ, Yeh SD. 2000. Characterization of the coat protein *gene* of a turnip mosaic virus isolate infecting garland chrysanthemum. Plant Pathol Bull 8: 73-82.

Elzingga RJ. 1978. Fundamentals of Entomology. Prenctice Hall of India Private Limited. New Delhi.

Genders R. 1961. Miniature Chrysanthemums and Koreans. Blandford Press. London.

Greensill TM. 1970. Gardening in The Tropic. Evans Brother Limited. London.

Hakkaart FA, Maat DZ. 1974. Variation of Chrysanthemum virus B. Netherland J Plant Pathol 80: 97-103.

Hampton R, Ball E, de Boer S. 1990. Serological Methodes for Detection and Identification of Viral and Bacterial Plant Pathogens. USA: American Phytopathological Society Press.

Harlow, Lane D. 1999. Using Antibodies. A Laboratorium Manual. New York: Cold Springer Harbor Laboratory Press.

Hollings M, Stone OM. 1972. Chrysanthemum virus B. CMI/AAB Description of Plant Viruses No 110.

Horst RK, Langhans RW, Smith SH. 1977. Effect of Chrysanthemum Stunt, Clorotic Mottle, Aspermy and Mosaic on Flowering and Rooting of Chrysanthemums. Phytopathology 67 : 9-14.

Janick J. 1972. Horticultural Science. WH Freeman and Company. San Fransisco.

Kofranek AM. 1992. Cut Chrysanthemums. In : RA Larson (ed.). *Introduction to Floriculture*. Academic Press, Inc.San Diego. P.3-42.

Laurie A, & Ries VH. 1950. Floriculture Fundamentals and Practises. Mc Graw – Hill Book Company. Inc. New York.

Mahmood T, Hein GL, French RC. 1997. Development of serological procedures for rapid and reliable detection of *Wheat streakmosaic virus* in a single wheat curl mite. Plant Dis 81 : 250-253.

Marwoto B, Suciantini, Sutater T. 1999. Modifikasi pola hari panjang dan intensitas cahaya pada krisan untuk efisiensi energi. Jurnal Hortikultura. 4(7): 870-879.

Moran JR. 1987. Chrysanthemum B carlavirus. Cite this pubication as : Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Watson L, Zurcher EJ (eds) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online Description and Lists from VIDE Database. Version : 20th August 1996'.

Noordam D. 1973. *Identification of Plant Viruses Methods & Experiments*. Wageningen : Center for Agriculture Publishing and Documentation.

Pirone PP. 1978. Disease and Pests of Ornamental Plants. John Wiley and Sons. New York.

Ram R, Verma N, Singh AK, Singh L, Hallan V, Zaidi AA. 2005. Indexing and production of virus-free chrysanthemums. Biologia Plantarum. 49(1): 149-152.

Rukmana HR & Mulyana AE. 1997. *Krisan*. Kanisius. Yogyakarta.

Saraswati D. 2003. Kajian virus penyebab penyakit pecah bunga dan pengaruhnya terhadap beberapa kultivar krisan (Chrysanthemum morifolium Ramat). [tesis]. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.

Semangun H. 1991. Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

Somowijaryo S, Sako N, Nonaka F. 1989. Dot-immunobinding assay for Zucchini yellow mosaic virus using polyclonal and monoclonal antibodies. Ann Phytopathol Soc 55: 56-63.

Suastika G, Kurihara J, Natsuaki KT, Tomaru K. 1997. A strain of Chrysanthemum B carlavirus causing flower colourbreaking on *Gymnaster savatieri* (Makino) Kitamura. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 63: 1-7.

Verma N, Sharma A, Ram R, Hallan V, Zaidi AA, Garg ID. 2003. Detection, identification and incidence of *Chrysanthemum B carlavirus* in chrysanthemum in India. Crop Protect 22: 415-429.

Zavriev SK, Kanyuka KV, Levay KE. 1991. The genome organization of potato virus M RNA. J Gen Virol 72: 9-14.