

IDENTIFIKASI VIROID PENYEBAB PENYAKIT Kerdil PADA KRISAN MENGUNAKAN RT-PCR

Identification of Viroid Causes of Dwarf Disease in Krisan Using RT-PCR

Ayu Nindita Nuraini¹, Evan Purnama Ramdan^{2*}, Erniawati Diningsih³

¹ Program studi Agroteknologi, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Gunadarma (Gunadarma University). ayunindita3@gmail.com

² Program studi Agroteknologi, Fakultas Teknologi Industri, Universitas Gunadarma (Gunadarma University). evan_ramdan@staff.gunadarma.ac.id.

³ Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur. diningsiherniawati@gmail.com

*) Penulis korespondensi

ABSTRAK

Bunga krisan merupakan tanaman hias populer di Indonesia. Saat ini telah dilaporkan 14 jenis virus yang dapat menginfeksi tanaman krisan, sehingga akan menurunkan hasil bunga krisan. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan diidentifikasi penyakit tanaman krisan yang disebabkan oleh virus dengan menggunakan teknik RT-PCR. Penelitian diawali dengan pengamatan gejala penyakit pada daun yang diindikasikan terinfeksi virus. Sampel daun bergejala kemudian diambil untuk diidentifikasi dengan teknik RT-PCR meliputi proses ekstraksi total DNA dan amplifikasi nukleotida dengan menggunakan pasangan primer berupa primer *forward* (F) (5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3') dan primer *reverse* (R) (5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA-3'). Hasil penelitian menunjukkan bahwa gejala yang diamati pada daun krisan adalah perubahan warna menjadi dan abnormalitas tanaman menjadi yang diduga adanya infeksi CSVd (*Chrysanthemum Stunt Viroid*). Konfirmasi melalui teknik RT-PCR teridentifikasi bahwa gejala tersebut disebabkan oleh CSVd dengan teramplifikasinya cDNA CSVd pada ukuran 250 bp.

Kata kunci: *Chrysanthemum Stunt Viroid*, deteksi virus, teknik molekuler,

ABSTRACT

Chrysanthemum is a popular ornamental plant in Indonesia. At present, 14 types of viruses have been reported that can infect chrysanthemum plants, which will reduce the yield of chrysanthemum flowers. Therefore, this study will identify chrysanthemum plant diseases caused by viruses using the RT-PCR technique. The study began with observation of disease symptoms on the leaves that were indicated to be infected with a virus. Symptomatic leaf samples were then taken to be identified by the RT-PCR technique including the process of total DNA extraction and nucleotide ureaification using primer pairs in the form of a forward primer (F) (5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3') and reverse primer (R) (5'-AGGATTACTCCTGTCTCGCA -3 '). The results showed that the symptoms observed in chrysanthemum leaves were yellow on the leaves and dwarf on chrysanthemum plants suspected of having CSVd (Chrysanthemum Stunt Viroid) infection. Confirmation through the RT-PCR technique was identified that the symptoms were caused by CSVd with the amplification of cDNA CSVd at a size of 250 bp.

Keywords: *Chrysanthemum Stunt Viroid, molecular techniques, virus detection*

PENDAHULUAN

Krisan menjadi salah satu bunga favorit bagi masyarakat Indonesia. Oleh karena itu, bunga krisan memiliki nilai ekonomi tinggi. Hal ini dapat dilihat dari peningkatan bunga potong krisan yang mencapai 47,58 juta tangkai (10,99%) pada tahun 2017. Peningkatan paling tinggi dibandingkan bunga potong lain (Badan Pusat Statistik, 2017). Bunga krisan mempunyai prospek pemasaran yang menjanjikan sebab banyak dimanfaatkan untuk memperindah ruangan seperti pelengkap dekorasi atau hiasan. Bunga krisan dapat dimanfaatkan dalam bentuk bunga potong maupun bunga dalam pot ataupun menjadi bouquet bunga tangan (Rukmana & Mulyana, 1997). Krisan diperkirakan masuk ke Indonesia pada tahun 1800-an. Kemudian mulai berkembang secara komersil sejak tahun 1940. Sentra penghasil bunga krisan di Indonesia terdapat di daerah Bandung, Cipanas, Batu, Cisarua, Sukabumi, Lembang dan Brastagi di Sumatera Utara (Nuryanto, 2001) Saat ini tanaman krisan di Indonesia memiliki lebih dari 50 varietas seperti fiji, marimar, azzura, pasopati, solinda, bakardi dan puspita nusantara. Beberapa varietas tersebut

merupakan varietas unggul, karena memiliki warna bunga yang warna-warni dan berukuran cukup besar serta memiliki pertumbuhan tanaman yang seragam (Kaharuddin, 2015).

Menurut Smith (1978), sedikitnya terdapat 14 jenis virus yang menyerang tanaman krisan, diantaranya 1) *chrysanthemum vein mothe virus* (CVMV) yang ditularkan oleh kutu daun *macro siphoniella sanborni* (Semangun, 2005); 2) *chrysanthemum virus B* (CVB) dengan gejala motling daun atau *vein-clearing* (Hollings, 1957; Hollings & Stones, 1972; Moran, 1987). Penularan CVB dapat melalui beberapa cara seperti luka mekanis pada saat *grafting* atau ditularkan oleh kutu daun seperti *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *Aulacorthum solani*, *Coloradoa rufomaculata* dan *Macrosiphoniella sanborani* (Suastika et al. 1997; Moran, 1987; Hollings & Stones, 1972); 3) *cucumber mosaic virus* (CMV) yang memiliki gejala mosaic pada daun sehingga mengakibatkan ukuran bunga menjadi lebih kecil dibandingkan bunga sehat (Semangun, 2005).

Sementara itu, salah satu jenis penyakit dari golongan viroid yang

banyak dijumpai di Indonesia yaitu *Chrysanthemum virus-B (CVB)*. Gejala khas dari infeksi CVB yaitu terbentuknya *motling* atau *vein clearing* pada daun yang mengakibatkan kualitas bunga menurun (Hollings & Srones. 1972; Verma et al. 2003). Sementara itu, Verma et al. (2003) melaporkan bahwa infeksi CVB pada krisan di India menunjukkan gejala yang lebih beragam. Selain gejala *mottling* dan *vein clearing*, infeksi CVB menunjukkan gejala *vein banding* dan *mosaic* pada krisan di India. Pada infeksi berat, bunga krisan menunjukkan malformasi atau bentuk abnormal. Selain ditemukan menginfeksi krisan, Suastika et al. (1997) telah melaporkan juga bahwa gejala dari infeksi CVB juga ditemukan pada daun dan bunga *Gymnaster savatieri*.

Pengendalian virus dapat dilakukan melalui beberapa cara seperti penggunaan tanaman resisten, pengendalian vektor, isolasi, dan proteksi silang atau imunisasi. Adapun teknik proteksi silang yang dikembangkan dengan menggunakan isolat CMV lemah (Waterworth et al. 1979; Kaper 1984). Oleh karena itu, perlu dikembangkan metode pengendalian yang tepat. Namun, untuk memutuskan pengendalian yang tepat terlebih dahulu perlu diketahui penyebabnya secara

akurat. Saat ini, molekuler telah menjadi teknik yang cepat dan akurat untuk mendeteksi keberadaan virus pada tanaman baik berbasis DNA dengan menggunakan PCR maupun RNA dengan menggunakan RT-PCR. Oleh karena itu, pada penelitian ini akan dilakukan identifikasi penyakit kerdil tanaman krisan yang disebabkan oleh viroid melalui teknik *reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai bulan Agustus sampai dengan September 2019 di Kebun percobaan dan Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur.

Pengamatan Gejala dan Pengambilan Sampel

Sampel krisan yang diuji berasal dari Rumah Kaca, Balai Penelitian Tanaman Hias, Segunung, Cianjur. Daun yang mengindikasikan adanya infeksi virus diamati dan dideskripsikan gejala yang tampak. Daun tersebut kemudian dipotong menggunakan gunting dan dimasukkan plastik bening. Selanjutnya

sampel daun dibawa ke laboratorium untuk pengujian selanjutnya.

Identifikasi Viroid

a. Ekstraksi RNA Total Dari Daun Krisan Terinfeksi Viroid

Sampel daun tanaman krisan yang diduga terinfeksi viroid ditimbang sebanyak 100mg. Sampel kemudian digerus dalam mortar dingin hingga halus dan ditambahkan ditambahkan 500 µl bufer lisis yang mengandung 1% 2-β-merkaptotanol. Hasil gerusan kemudian dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 mL dan diinkubasi pada penangas air pada suhu 56°C selama 3 menit. Tabung selanjutnya diangkat dari penangas air untuk disentrifugasi selama 5 menit pada kecepatan 14.000 rpm. Supernatan yang diperoleh ditambahkan etanol 96% dan disentrifugasi kembali selama 1 menit pada kecepatan 13.000 rpm. Hasil berupa supernatan dipindahkan pada tabung mikro baru dan ditambahkan 700 µl wash buffer WBI. Kemudian disentrifugasi kembali selama 1 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan yang diperoleh ditambahkan 500 µl bufer RPE dan disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm sebanyak dua kali, masing-masing 1 dan 2 menit hingga didapat pelet RNA. Pelet RNA ditambahkan 40 µl *nuclease free*

water. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 1 menit.

b. Amplifikasi Nukleotida pada mesin PCR

Amplifikasi nukleotida pada mesin PCR mengikuti metode Hosokawa *et al.* (2004) dengan teknik *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Adapun pasangan primer yang digunakan yaitu 5'-CAACTGAAGCTTCAACGCCTT-3' untuk primer *forward* dan 5'-AGGATTACTCCTGTC TCGCA-3' untuk primer *reverse*. Pasangan primer ini dilaporkan dapat mengidentifikasi ampikon pada pita dengan ukuran 250 bp. Amplifikasi dilakukan pada sebuah *gene amp PCR system 9700 thermocycler*. Reaksi RT yang dipakai sebanyak 25 µl dengan reagent yang dipakai seperti tertera pada Tabel 1. Adapun program PCR yang dijalankan: 25°C selama 3 menit; 37°C selama 90 menit; inaktivasi 70°C selama 15 menit.

c. Separasi hasil PCR pada Gel Elektroforesis

1,5% agarose dengan *running buffer* TBE 1x (89 mM Tris-HCl, 89 mM *boric acid*, 2,5 M EDTA, pH 8,3) dipanaskan pada microwave selama 1 menit. Kemudian diaduk rata sampai larut. Selanjutnya

agarose dimasukkan ke dalam cetakan *plate* dan dipasangkan sisir (*comb*).

Setelah itu dibiarkan dingin dan mengeras. Kemudian dilakukan *loading* produk hasil PCR sebanyak 10 µl ke dalam *well (lane)*. Selanjutnya dielektrofores pada voltase 75 volt selama 90 menit. Etidium bromida (EtBr) 1% digunakan sebagai pewarnaan dengan konsentrasi 0,5 µl/10 ml gel. *Tridye* 100 bp digunakan sebagai DNA *ladder* atau *marker* pada penelitian ini.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Virus di Lapangan.

Pada pengamatan gejala penyakit krisan di lapangan ditemukan gejala berupa kerdil disertai dengan adanya

penguningan pada daun seperti Gambar 1. Tanaman krisan sehat mempunyai tinggi kurang lebih 100 cm (Vina, 2016). Sementara pada pengamatan di lapangan tinggi menyusut 50%. Menurut Diningsih et al. (2013) gejala infeksi viroid dapat dikenali dengan perubahan daun menjadi kuning dan pertumbuhan krisan menjadi kerdil. Viroid yang menyebabkan gejala tersebut dikenal dengan *Chrysanthemum Stunt Viroid* (CSVd). CSVd dapat menyebabkan kerdil sebab metabolisme tanaman yang terganggu akibat proses fotosintesis menjadi tidak optimal. Patogen ini juga menyebabkan daun menjadi lebih tipis dari daun krisan sehat yang mempunyai panjang 7-13 cm, lebar 3-6 dengan bunga majemuk juga berbentuk seperti cawan.

Tabel 1. Premix One-Step RT-PCR

| No | Reagent | Vol. (µl) |
|--------------|--|-----------|
| 1 | RNA <i>template</i> | 5 |
| 2 | dNTPs 10 mM | 5 |
| 3 | bufer RT 10x (1x = 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 7,6], 0,1 mM EDTA, 1 mM <i>dithiothreitol</i> , 0,1% NP-40, dan 50% <i>glycerol</i>) | 2,5 |
| 4 | enzim MmuLV | 1 |
| 5 | <i>recombinant rnasin ribonuclease inhibitor</i> | 1 |
| 6 | primer oligo d (T) 10 µM | 1.5 |
| 7 | dH ₂ O. | 9 |
| Total Volume | | 25 |

Laporan Diningsih et al. (2003) menyebutkan bahwa selain menginfeksi tanaman krisan, CSVd juga ditemukan menginfeksi tanaman Puspita Kencana (*Dendranthre magrandiflora*). Infeksi CSVd menyebabkan tanaman puspita kencana kerdil dan menguning. Akibatnya, tanaman ini hancur dan tidak lakukan perbanyak lagi di Cipanas. (Diningsih et al, 2003).

d. Hasil amplifikasi fragmen cDNA berdasarkan RT-PCR

Hasil amplifikasi cDNA pada daun krisan menunjukkan bahwa ampikon berhasil teramplifikasi pada band ukuran

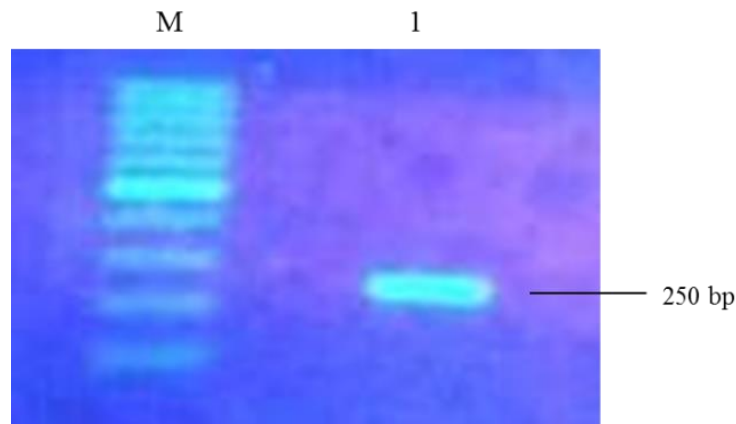
250 pb (Gambar 2). Hasil ini sesuai dengan Diningsih et al. (2013) yang menguji CSVd pada tanaman krisan teknik RT-PCR dengan pasangan primer berupa pasangan primer

(5'CAACTGAAGCTTCAACGCC TT-3') dan (5'-AGG AT TACTCCTGTCTCGCA-3') mampu mengamplifikasi ampikon dari cDNA CSVd pada ukuran basa 250 bp.

Selain itu, dengan gejala yang sama pada laporan Diningsih et al. (2013) berupa kerdil dan daun menguning, hasil amplifikasi menunjukkan bahwa viroid berhasil terbaca pada band ukuran 250 pb.



Gambar 1. Tanaman Krisan yang Terkena Terinfeksi Csvgd



Gambar 2. Visualisasi Pita Cdna Hasil Amplifikasi dengan Primer F Dan R Pada Gel Agarosa 1.5%. M = Penanda DNA Ladder 100 Bp; 1: Sampel Daun Krisan Terinfeksi Csvd

KESIMPULAN DAN SARAN

Jenis penyakit krisan yang berhasil ditemukan berdasarkan gejala pada tanaman yaitu penyakit kerdil (*stunting*) dan menguningnya daun yang disebabkan oleh infeksi CSVd. Proses identifikasi CSVd pada krisan menggunakan teknik molekuler dengan RT-PCR dengan primer berupa primer *forward* (F) dan primer *reverse* (R) hasil berupa teramplifikasinya cDNA CSVd pada ukuran 250 bp. Penelitian selanjutnya diperlukan banyak sampel tanaman krisan yang diduga terinfeksi virus, sehingga hasil identifikasi lebih beragam.

DAFTAR PUSTAKA

- Ammirato PV, Evans DA, Sharp WR, Bajaj YPS. 1990. Handbook of plant cell culture (Ornamental species) Volume 5. Mc Graw-Hill Publishing Company. New York. USA. 833p.
- Badan Pusat Statistik. 2017. Statistik Tanaman Hias Indonesia. Jakarta: Badan Pusat Statistik
- Diningsih E, Suastika G, Sulyo Y, Winarto B. 2013. Deteksi dan Identifikasi *Chrysanthemum Stunt Viroid* Pada Tanaman Krisan Menggunakan Teknik *Reverse Transcriptase Polymerase Chain*. *Jurnal Hortikultura* 23(1): 1-8.
- Douine, L., Quiot, J.B., Marchoux, G. and P. Archange. 1979. Recensement des especes vegetale sensibles au virus de la mosaique du comcombre (CMV). *Ann. Phytopathol.* 11:439-475
- Hollings M. 1957. Investigation of chrysanthemum viruses. II. Virus B (mild mosaic) and chrysanthemum latent virus. *Ann. Appl. Biol.* 45: 589 – 602
- Hollings M, Stone OM. 1972. *Chrysanthemum virus B. CMI/AAB Description of Plant Viruses No. 110.*
- Hosokawa M, Ueda E, Ohishi K, Otake A, Yazawa, S. 2004. Chrysanthemum stunt viroid disturbs photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plant. *Planta.*, vol. 220, pp. 64-70.

- Kaharuddin I. 2015. Perbanyak Enam Varietas Krisan Secara In Vitro pada Berbagai Media Tanam. [Skripsi]. Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin Makassar. Makassar. 91 h.
- Kaper JM. 1984. Plant disease regulation by virus dependent satellite-like replicating RNAs. Pp:317-343. In: Kurstak, E. (Ed.). *Control of virus diseases*. Marcel Dekker. Inc. New York and Basel.
- Krisantini. 2006. *Produksi Krisan Pot : Budidaya Bunga dan Tanaman Hias*. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 16 hal.
- Manaf R.2014. Analisis Serangan Virus Gemini Pada Cabai Merah (*Capsicum Annum L.*) Berbasis Visual Dengan Segmentasi Bayes. fakultas teknologi pertanian, institut pertanian bogor.bogor
- Moran JR. 1987. Chrysanthemum B carlavirus. Cite this publication as: Brunt, A.A., K. Crabtree, M.J. Dallwitz, L. Watson, and E.J. Zurcher. (eds) (1996 onwards). 'Plant Viruses Online Descriptions and Lists from the VIDE Database. Version: 20th August 1996'.
- Mossop DW, Francki RIB, Hatta T. 1979. *Description of plant viruses no. 213. Cucumber mosaic virus*. Commonw. Mycol. Inst. Kew Surrey, England. 4p.
- Nuryanto H. 2011. *Budidaya Tanaman Krisan*. Bekasi : Ganeca
- Purwanto AW, Martini T. 2009. *Krisan Bunga Seribu Warna*.Yogyakarta.
- Rukmana HR, Mulyana AE.1997. *Krisan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Pp : 14 – 16
- Semangun H. 2005. *Penyakit-penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Yogyakarta:Gajah Mada University Press.
- Smith, KM. 1978. *A textbook of plant virus diseases*. 3rd ed. Longman Ltd. London. 684p.
- Suastika GJ, Kurihara KT, Natsuaki, Tomaru K. 1997. A strain of Chrysanthemum B carlavirus causing flower colour breaking on *Gymnaster savatieri* (Makino) Kitamura. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 63:1 – 7.
- Vina. 2016. Pertumbuhan dan pembungaan krisan pada berbagai komposisi media tanam [Skripsi]. Universitas Andalas : Padang.
- 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.
- Waterworth HE, Kaper JM, Tousignant ME. 1979. CARNA 5, *Small Cucumber Mosaic Virus-Dependent Replicating RNA, Regulates Disease Expression*. *SCI*. 204:845-847.