

ANALISIS POLA PITA PROTEIN *Cymbidium mosaic virus* PADA *Protocorm likes bodies* ANGGREK *DENDROBIUM* JAYAKARTA DAN TANAMAN ANGGREK *DENDROBIUM* MENGGUNAKAN METODE ELEKTROFORESIS GEL KOMPOSIT

Melissa Syamsiah, S.Pd*

RINGKASAN

Cymbidium mosaic virus (CyMV) merupakan salah satu virus patogen yang dominan menginfeksi tanaman anggrek di Dunia. Deteksi infeksi CyMV dapat dilakukan dengan metode DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Untuk lebih memastikan lagi bahwa virus yang menginfeksi tanaman anggrek tersebut adalah CyMV, maka dapat dilakukan pembedaan pola pita protein menggunakan metode Elektroforesis Gel Komposit. Penelitian ini bertujuan untuk membedakan pola pita protein tanaman anggrek *Dendrobium* yang sehat atau bebas CyMV dengan pola pita tanaman yang sakit (terinfeksi CyMV). Hasil penelitian menunjukkan bahwa analisis dengan teknik Elektroforesis Gel Komposit dapat digunakan untuk membedakan pita protein CyMV pada tanaman dan plbs anggrek *Dendrobium* yang sakit atau positif terinfeksi CyMV dengan tanaman atau plbs anggrek *Dendrobium* yang sehat maupun plbs anggrek *D. Jayakarta* yang telah bebas CyMV dengan hasil analisis bobot molekul protein CyMV berukuran sekitar 28 kDa.

ABSTRACT

Cymbidium mosaic virus (CyMV) is the one of the dominant pathogen infecting orchid plant in the world. Detection of CyMV infection can be performed by DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay) method. To further confirm, it can be distinguished the pattern of CyMV protein bands by using composite gel electrophoresis method. The aims of this study to distinguish the CyMV protein banding pattern by using composite gel electrophoresis method. The results of this study showed that CyMV protein banding pattern analysis by composite gel electrophoresis method can be used to distinguish the patterns of protein bands of healthy *Dendrobium* plants or CyMV free - *D. Jayakarta* plbs and the infected ones with molecular weight approximately 28 kDa.

Keyword: *Cymbidium mosaic virus*, *Dendrobium*, Composite Gel Electrophoresis

*Dosen Fakultas Pertanian UNSUR

PENDAHULUAN

Tanaman hias ataupun tanaman tahunan dan tanaman yang diperbanyak secara vegetatif jika terserang virus akan menyebabkan bibitnya menjadi tidak vigor (Pearson&Cole 1991). Anggrek merupakan komoditas hortikultura yang banyak diminati masyarakat

karena memiliki variasi warna dan bentuk bunga yang indah dan relatif tahan lama dibandingkan tanaman hias yang lain. Pada saat ini anggrek yang dominan diminati masyarakat adalah jenis *Dendrobium* (34%), *Oncidium Golden Shower* (26%), *Cattleya* (20%) dan *Vanda* (17%) serta anggrek lainnya (3%) (BPTP 2005).

Cymbidium mosaic virus (CyMV) merupakan virus yang banyak

menginfeksi tanaman anggrek, Hasil penelitian Tanaka *et al.* (1997) menunjukkan bahwa beberapa kultivar anggrek banyak terinfeksi *Cymbidium mosaic virus* (CyMV) yaitu pada anggrek *Denrobium* (65.7%), *Cattleya* (45.5%), *Oncidium* (35%), *Phalaenopsis* (25%) dan *Vanda* (51%).

Deteksi dan identifikasi secara serologi sudah umum diaplikasikan untuk berbagai virus. Salah satu uji serologi adalah *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) yang pertama kali dikembangkan oleh Clark dan Adam (1977). Metode ini berdasarkan pada reaksi antara antigen antibodi.

Diagnosis CyMV yang dilakukan oleh Miin (2005); Hu *et al.* (1993); Navalinskiene *et al* (2005) dan Sherpa *et al.* (2007) dengan menggunakan metode serologi yaitu *Double Antibody Sandwich* (DAS) ELISA pada tanaman anggrek jenis *Arachnis*, *Aranda*, *Asocentrum*, *Cattleya*, *Cymbidium*, *Dendrobium*, *Laelia*, *Oncidium*, *Paphiopedium*, *Phalaenopsis*, *Renanthera* dan *Vanda* berhasil dengan baik. Metode serologi ini menggunakan antiserum monoklonal yang bereaksi secara spesifik dengan protein selubung CyMV (Navalinskiene *et al* 2005).

Selain dengan menggunakan metode serologi, deteksi dan identifikasi virus tanaman dapat juga dilakukan melalui teknik molekuler misalnya dengan *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR) (Sherpa *et al.* 2007). Hsu *et al.* (1992) melakukan deteksi CyMV pada anggrek dengan metode *Immunosorbent Electron Microscopy* (ISEM). Metode ini diketahui lebih sensitif dibandingkan dengan metode ELISA. Namun demikian, metode ISEM memerlukan biaya dan peralatan yang lebih mahal

dibandingkan dengan metode DAS-ELISA.

Untuk lebih memastikan lagi bahwa virus yang menginfeksi tanaman anggrek tersebut adalah CyMV, maka dapat dilakukan pembedaan pola pita protein menggunakan metoda Elektroforesis Gel Komposit. Metode ini tidak termasuk metode modern seperti RT-PCR dan ISEM. Akan tetapi metode ini dapat digunakan dapat digunakan untuk menganalisis virus tanaman dengan melakukan perlakuan yang berbeda terhadap gel sebagai media pemisahan proteinnya. Metode ini dilakukan Wolf dan Casper (1971) untuk memisahkan *Tobacco mosaic virus* (TMV) dan *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), yang juga diketahui bahwa kedua virus ini dapat menginfeksi tanaman anggrek. Dari hasil elektroforesis ini dapat dilihat perbedaan pola pita proteinnya, serta dapat ditentukan juga bobot molekul (BM) dari CyMV tersebut.

Penelitian ini bertujuan membedakan pola pita protein tanaman anggrek *Dendrobium* yang sehat dan *protocorm like bodies* (plbs) bebas CyMV dengan tanaman dan plbs yang sakit (terinfeksi CyMV) menggunakan metode elektroforesis gel komposit.

TINJAUAN PUSTAKA

Cymbidium mosaic virus (CyMV)

Tanaman anggrek yang baik adalah tanaman anggrek yang sehat dari faktor – faktor yang mempengaruhinya seperti faktor lingkungan seperti media tumbuh, cahaya matahari, suhu, kelembaban udara dan faktor infeksi patogen. Patogen yang sering menimbulkan kerugian pada anggrek adalah virus.

Beberapa virus yang dapat menginfeksi tanaman anggrek diantaranya : *Cymbidium mosaic virus* CyMV, *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV), *Cymbidium ringspot virus* (CRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Orchid fleck virus* (OFV) (Kondo *et al.* 2006). Diketahui CyMV merupakan virus yang paling banyak menimbulkan kerugian secara ekonomi pada tanaman anggrek.

Penyakit tanaman anggrek yang disebabkan CyMV pertama kali diidentifikasi pada tahun 1950 oleh Jensen di California (ICTVdB 2002). Secara etiologi agen diidentifikasi sebagai virus yang dinamai CyMV. Sejak itu CyMV dilaporkan keberadaannya di beberapa Negara penghasil bunga potong di Eropa, Australia, Amerika, Afrika dan Asia. CyMV merupakan virus yang termasuk family *Flexiviridae* dan genus *Potexvirus*. Gejala yang ditimbulkan oleh CyMV pada tanaman anggrek adalah terjadinya nekrosis (bintik-bintik, garis-garis atau lingkaran-lingkaran) pada tanaman. Virus tersebut umum ditemukan pada tanaman anggrek yang dibudidayakan, hal ini disebabkan virus tersebut dapat ditularkan melalui alat-alat pertanian, seperti gunting dan pot yang terkontaminasi dan tidak ditularkan oleh serangga ataupun biji (Wisler 1989).

Studi mikroskop elektron menunjukkan bahwa virion-virion CyMV berbentuk filamentous dengan diameter 480 x 13 nm yang tidak dibungkus oleh envelope dan mempunyai titik inaktivasi 60-70 °C selama 10 menit serta dapat bertahan pada cairan perasan tanaman selama 25 hari pada suhu ruang dalam kondisi *in vitro*. Genom CyMV merupakan ssRNA linear dan berukuran 8,1 kb. Genom CyMV pertama kali diisolasi

oleh Frowd dan Tremaine (1977) dan mempunyai komposisi basa G 21.1%, A 28.9%, C24,4% dan U 25,6%.

Deteksi CyMV dengan *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

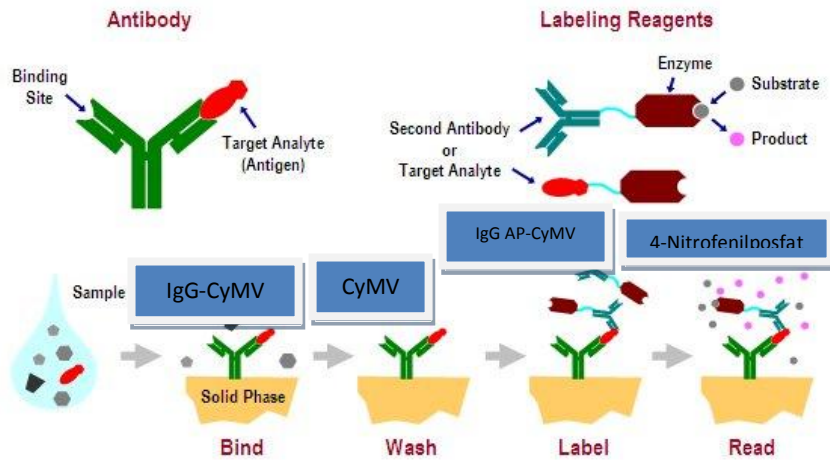
ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) adalah suatu teknik deteksi dengan metode serologis yang berdasarkan atas reaksi spesifik antara antigen dan antibodi, mempunyai sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi dengan menggunakan enzim sebagai indikator. Prinsip dasar ELISA (Burgess 1995) adalah analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorpsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna. Warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan pembacaan nilai absorbansi pada ELISA *plate reader*.

Jenis teknik ELISA yang banyak digunakan adalah *Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (DAS-ELISA). Prinsip pengujian virus dengan teknik ini adalah antibodi (protein) virus yang spesifik teradsorpsi pada permukaan lubang "*polystyrene microtiter plate*". Antibodi tersebut akan menangkap antigen (virus yang terdapat pada sampel). Selanjutnya virus tersebut akan bereaksi dengan spesifik antibodi yang telah dilabel dengan alkalin fosfatase. Ada tidaknya virus dalam sampel ditandai dengan berubahnya warna menjadi kuning setelah diberi penyangga substrat yang mengandung 4-nitrofenilfosfat. Perubahan warna terjadi karena 4-nitrofenil dirubah menjadi 4-nitrofenol yang intensitas warna kuningnya

sebanding dengan banyaknya antigen yang tertangkap oleh antibodi (Clark &

Adam 1977; BALITHI 2003).

ELISA

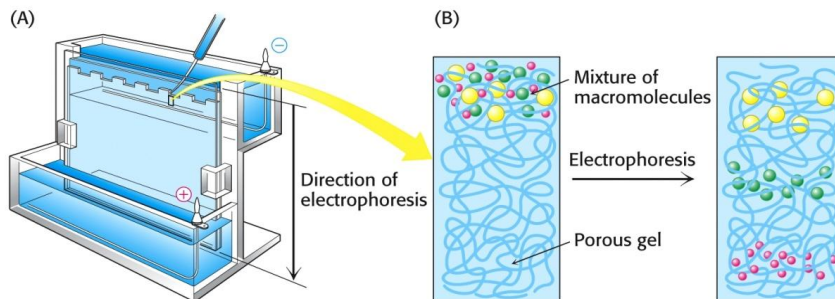


Gambar 1 Prinsip dasar DAS - ELISA

Elektroforesis Gel Komposit

Teknik elektroforesis adalah teknik pemisahan senyawa berdasarkan kecepatan migrasi dari senyawa yang bermuatan listrik di bawah pengaruh medan listrik. Elektroforesis gel merupakan salah satu teknik utama dalam biologi molekuler dan merupakan metoda standar untuk pemisahan, identifikasi dan pemurnian fragmen DNA. Prinsip dasar teknik ini adalah DNA, RNA atau protein dapat dipisahkan oleh medan listrik, dalam

hal ini molekul-molekul tersebut dipisahkan berdasarkan laju perpindahannya oleh gaya gerak listrik di dalam matriks gel (Suryani dan Ambarsari 2010). Gel yang biasa digunakan merupakan gel poliakrilamid untuk pemisahan protein atau asam nukleat berukuran kecil, sedangkan gel agarosa digunakan untuk memisahkan asam nukleat yang lebih besar (lebih besar dari beberapa ratus basa) (Suryani dan Ambarsari 2010).



Gambar 2 Prinsip dasar Elektroforesis

Elektroforesis gel poliakrilamid dapat digunakan untuk meneliti protein virus (Wolf dan Casper 1971, Khalimi 2008), akan tetapi jarang digunakan untuk memisahkan seluruh virus. Tiselius, *et al.* (1965) pertama kali memisahkan virus tanaman *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) dengan elektroforesis gel poliakrilamid, Semancik (1966) menggunakan metode ini untuk memisahkan dan mengkarakterisasi komponen virus tanaman yang dimurnikan, akan tetapi pemisahan menggunakan gel poliakrilamid tidak memungkinkan untuk virus dengan partikel seperti *Tobacco mosaic virus* (TMV) atau *Tobacco rattle virus*. Wolf dan Casper (1971) telah melakukan penelitian tentang elektroforesis untuk virus dengan menggunakan gel akrilamid-agaros dalam konsentrasi poliakrilamid rendah. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa *Turnip yellow mosaic*

virus (TYMV) dan *Tobacco mosaic virus* (TMV) dapat dipisahkan satu sama lain dan dari protein tanaman dengan jelas menggunakan metode elektroforesis akrilamid-agaros. Metode ini telah digunakan sebelumnya untuk memisahkan asam nukleat dan ribosom (Peacock dan Dingman 1968, 1969) serta untuk menganalisis *bean yellow mosaic virus* (Makkock, *et al.* 1987).

Prosedur yang digunakan dalam Elektroforesis Gel Komposit atau campuran akrilamid dan agaros ini hampir sama dengan metode elektroforesis pada umumnya yaitu terdiri atas preparasi sampel, preparasi gel, running, visualisasi dan penentuan ukuran molekul. Metode Elektroforesis Gel Komposit yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada metode yang dilakukan Wolf dan Casper (1971) dengan komposisi campuran gel akrilamid 2% dan agaros 0,5%.

METODE

Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Maret hingga Mei 2011. Tempat pelaksanaannya di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias Gunung – Cianjur.

Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman anggrek *Dendrobium* dan plbs (*protocorm likes bodies*) anggrek *Dendrobium* Jayakarta yang sudah diketahui bebas CyMV hasil perlakuan zat antiviral Ribavirin 30 ppm (Syamsiah 2011), plbs anggrek *D. Jayakarta* dan tanaman

anggrek *Dendrobium* yang positif terinfeksi CyMV, poliakrilamid, akrilamid, agarosa, TEMED (Tetra Metil Etilen Diamin), APS (Amonium persulfat), Amidoblack, Asam asetat, Penanda protein atau *Marker* (*Protein Molecular Weight Marker*) produk Fermentas (2004-2005) yang mengandung : β -galactosidase (116 kDa), *Bovine serum albumin* (66.2 kDa), *Ovalbumin* (45 kDa), *Lactate dehydrogenase* (35 kDa), REase Bsp 981 (25 kDa), β -*Lactoglobulin* (18.4 kDa), *Lysozyme* (14.4 kDa); dll.

Sedangkan alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Beaker glass, gelas ukur, *water bath*, termometer, *microwave*, perangkat elektroforesis dan alat lainnya sebagai penunjang.

Metode Penelitian

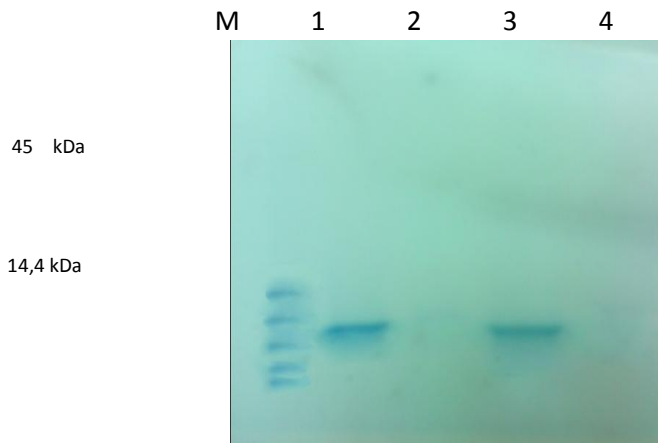
Pembuatan gel: Campuran agaros dan aquades dalam wadah I dipanaskan dalam *microwave*, sementara itu campuran acrylamid:bis dan TBE 3x dalam wadah II dipanaskan dalam inkubator (*water bath*) 100°C selama 20 detik. Lalu ditambahkan 200 µl APS 10% ke wadah I dan 30 µl TEMED ke wadah II. Setelah hangat kuku, dicampurkan kedua larutan tersebut, diaduk sebentar, kemudian dicetak dalam casting (pencetak gel).

Prosedur : 1 g daun/plbs digerus dalam 1 ml buffer ekstraksi menggunakan mortar lalu diinkubasi 10 menit pada suhu 50 °C (*water bath*). Selanjutnya disentrifus 12.000 rpm selama 10 menit. Supernatan digunakan untuk elektroforesis. Sebelum dipakai disimpan di suhu 4 °C. 100 µl supernatan tiap sampel yang sudah dicampur dengan 20 µl loading buffer serta *Marker* dipanaskan pada suhu 95°C selama 5 menit lalu didinginkan selama 15 detik dan dimasukkan ke dalam sumur gel. Running dilakukan selama \pm 3,5 jam pada voltase 50 volt. Untuk visualisasi dilakukan menggunakan pewarnaan dengan Amidoblack (0,1 g amidoblack dalam 100 ml 7% asam asetat). Kemudian ditentukan nilai Bobot molekul (BM) CyMV sesuai *Marker* yang digunakan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis pita protein CyMV pada anggrek *Dendrobium* Jayakarta dengan metoda Elektroforesis Gel Komposit menunjukkan adanya pita yang jelas untuk tanaman anggrek *Dendrobium* dan plbs anggrek *D. Jayakarta* yang sakit atau terinfeksi CyMV. Pita tersebut menunjukkan adanya kandungan CyMV pada sampel Tanaman dan plbs yang positif terinfeksi CyMV (Gambar 3).

Tebal tipisnya pita yang terbentuk berhubungan erat dengan kandungan virusnya. Hal ini dapat dilihat dari hasil elektroforesis, pita pada lajur no. 1 yang berasal dari sampel tanaman anggrek *Dendrobium* positif terinfeksi CyMV lebih jelas dibandingkan pita pada lajur no. 3 yang berasal dari plbs anggrek *D. Jayakarta* positif terinfeksi CyMV. Sedangkan untuk tanaman anggrek yang sehat atau tidak terinfeksi CyMV dan plbs hasil perlakuan zat antiviral Ribavirin 30 ppm menunjukkan tidak terbentuknya pita protein virus, hal ini berarti tanaman tersebut benar benar tidak terinfeksi CyMV dan plbs hasil perlakuan zat antiviral Ribavirin 30 ppm tersebut terbukti sudah terbebas dari CyMV. Hasil ini sesuai dengan eliminasi CyMV pada konsentrasi Ribavirin 30 ppm dengan uji DAS-ELISA menunjukkan persen bebas sebesar 100%. Hasil elektroforesis ini dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3 Hasil analisis pita protein CyMV dengan Elektroforesis Gel Komposit M = *Marker*; (1) Tanaman anggrek *Dendrobium* positif terinfeksi CyMV; (2) Tanaman anggrek *Dendrobium* negatif terinfeksi CyMV; (3) Plbs anggrek *D. Jayakarta* positif terinfeksi CyMV dan (4) Plbs anggrek *D. Jayakarta* negatif/ bebas CyMV (hasil perlakuan zat antiviral Ribavirin 30 ppm)

Hasil analisis bobot molekul (BM) dari data yang diperoleh pada penelitian dengan metoda Elektroforesis Gel Komposit menunjukkan bahwa bobot molekul protein CyMV pada tanaman anggrek *Dendrobium* positif terinfeksi CyMV adalah sekitar 28.85 kDa, sedangkan pada plbs anggrek *D. Jayakarta* positif terinfeksi CyMV yang dipakai untuk perlakuan antiviral Ribavirin adalah sekitar 27.82 kDa (Tabel 1).

Bobot molekul tersebut diperoleh dari hasil estimasi kurva Log BM *Marker* dengan Rm (*Relative mobility*) (Anderson *et al* 1974, Plikaytis *et al* 1986) dimana nilai Rm diperoleh dari hasil bagi jarak pergerakan protein dari tempat awal dengan jarak

pergerakan warna dari tempat awal (Boyer 2000). Hasil analisis BM CyMV dapat dilihat pada Tabel 1 dan 2 serta kurva estimasinya pada Gambar 4.

Berdasarkan hasil elektroforesis diketahui pada kolom *Marker* terdapat lima pita protei yang tampak. Kelima pita *Marker* yang tampak memiliki bobot molekul 45 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 18.4 kDa dan 14.4 kDa (Tabel 1). Nilai bobot molekul *Marker* yang dipakai berasal dari protein Ovalbumin (*Chicken egg white*), *Lactate dehydrogenase* (*porcine muscle*), REase Bsp981 (*E. Coli*), β - *Lactoglobulin* (*Bovine milk*), *Lysozyme* (*Chicken egg white*) (Fermentas 2004, 2005).

Tabel 1 Nilai Rm (x) dan Log BM *Marker* hasil elektroforesis

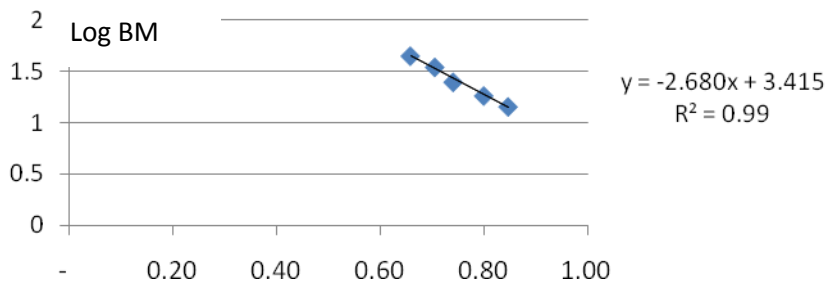
BM <i>Marker</i>	Log BM	Jarak Pita pada Gel (mm)	Panjang gel (mm)	Rm
45	1.6532125	56	85	0.66
35	1.544068	60	85	0.71
25	1.39794	63	85	0.74

18.4	1.2648178	68	85	0.80
14.4	1.1583625	72	85	0.85

Sumber: Data primer (olahan), 2011

Hasil analisis dengan Elektroforesis Gel Komposit menunjukkan bahwa bobot molekul CyMV dari tanaman anggrek *Dendrobium* dan plbs anggrek *D. Jayakarta* yang positif terinfeksi CyMV diestimasi sekitar 28 kDa (Tabel 2). Hasil ini dapat diartikan bahwa pita protein yang tampak diduga sebagai bobot molekul protein *Cymbidium mosaic virus*.

Berdasarkan kriteria International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), virus tersebut termasuk CyMV dilihat dari bobot molekulnya. Hasil ini bersesuaian dengan penelitian Moreira, *et al.* (1998) yang melaporkan bahwa bobot molekul CyMV yang menginfeksi tanaman anggrek *Phaius tankerville* diestimasi sekitar 28 kDa dengan metoda SDS-PAGE.



Gambar 4 Kurva estimasi Rm dengan Log BM Marker

Begitu pula dengan yang dilaporkan Khalimi (2008) dimana bobot molekul CyMV yang menginfeksi daun tanaman *N. benthamiana* dengan metoda SDS-PAGE juga menunjukkan hasil sekitar 28 kDa. Sedangkan hasil penelitian

yang lain, seperti yang dilaporkan Miin (2005) dan F *Rm al.* (1999) bahwa bobot mo *Rm* CyMV yang menginfeksi tanaman anggrek di Malaysia dan Korea diestimasi sekitar 27.64 kDa.

Tabel 2 Hasil analisis pita protein positif terinfeksi CyMV pada sampel tanaman dan plbs anggrek *Dendrobium*

Sampel	Jarak pita pada gel (mm)	Panjang gel (mm)	Rm	Log BM	BM
Tanaman anggrek (+) terinfeksi CyMV	62	85	0.73	1.46	28.85

Plbs anggrek (+) terinfeksi CyMV	62.5	85	0.74	1.44	27.82
-------------------------------------	------	----	------	------	-------

Sumber: Data primer (olahan), 2011

SIMPULAN

Analisis pita protein CyMV pada tanaman anggrek *Dendrobium* dan plbs anggrek *D.* Jakarta dapat dilakukan dengan menggunakan teknik Elektroforesis Gel Komposit. Tanaman anggrek *Dendrobium* dan plbs anggrek *D.* Jakarta yang sakit atau positif terinfeksi CyMV memiliki pita protein dengan ukuran BM sekitar 28 kDa. Tanaman anggrek *Dendrobium* yang sehat maupun plbs anggrek *D.* Jakarta yang telah bebas CyMV hasil perlakuan zat antiviral Ribavirin 30 ppm tidak memiliki pita protein dengan ukuran BM sekitar 28 kDa.

SARAN

Analisis protein *Cymbidium mosaic virus* pada tanaman anggrek *Dendrobium* maupun *protocorm likes bodies* anggrek *Dendrobium* Jakarta dapat dilakukan dengan menggunakan metode Elektroforesis Gel Komposit.

DAFTAR PUSTAKA

Anderson M, Cawston T and Cheeseman. 1974. Molecular weight estimates of milk fat-globule-membrane protein-sodium dodecyl sulphate complexes by electrophoresis in gradient acrylamide gels. *Biochem J.* 139: 653-660.

BALITHI. 2003. Budidaya anggrek. Cianjur : BALITHI

Boyer R. 2000. *Modern Experimental Biochemistry*. San Fransisco: Adison Wesley Longman Inc.

BPTP [Balai Pengkajian Teknologi Pertanian]. 2005. Prospek dan arah pengembangan agribisnis anggrek. Jakarta: Departemen Pertanian.

Burgess GW. 1995. Prinsip dasar ELISA dan variasi konfigurasi, teknologi ELISA dalam diagnosis dan penelitian GW. Burgess (Ed) Wayan T. Ariana (terjemahan). Gajahmada University Press. Yogyakarta.

Clark MF and Adam AN. 1977. Characteristics of the Microplate of enzyme linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol* 34: 475 – 483.

Han JH, Joon LY, Ho LC. 1999. Use of triton X-100 and sephacryl S-500 HR for the purification of *Cymbidium mosaic virus* from Orchid plant. *Plant Pathology Journal* 15:34-37.

Hu JS, Ferreira S, Wang M, Xu MQ. 1993. Detection of *cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and *potyviruses infecting orchids* in Hawaii. *Plant disease* 77: 464-468.

[ICTVdB] International Committee on Taxonomy of Viruses database Description. 2002.

- 00.056.0.01.007. *Cymbidium mosaic virus*. [http: www. Ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTV dB/index.htm](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm)
- Kondo H, Maeda T, Shirako Y, Tamada T. 2006. *Orchid fleck virus* is a rhabdovirus with an annual bipartite genom. *Journal of general virology*. 87: 2413-2421
- Khalimi K. 2008. Deteksi dan identifikasi *Cymbidium mosaic virus*. [Tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Makkock KM, Katul L, Rizkallah A. 1987. A simple procedure for purification and antiserum production of bean *yellow mosaic virus*. *J. Phytopathology* 122 : 89-93.
- Miin DOJ. 2005. Screening of a random peptide library with CyMV for potesial development of diagnostic kits. Malaysia: Malaysia University of Science and Technology.
- Moreira L, Villalobos W. 1998. First report of the *Cymbidium mosaic Potexvirus* (CymMV) infecting the terrestrial orchid *Phalus tankervilleae* in Costa Rica. *The American Phytopathological Society* 82:1171
- Navalinskiene M, Raugalas J, Samuitiene M. 2005. Viral diseases of flower plant 16. Identification of viruses affecting orchid *Cymbidium* Sw. *Biologyja* 2: 29-34
- Peacock, A. C. and C. W. Dingman. 1968. Molecular weight estimation and separation of RNA by electrophoresis in agarose-acrylamide composite gel. *Biochemistry* 7 : 668-674)
- Pearson MN and Cole JS. 1991. Futher observation on the effect of *Cymbidium mosaic virus* on the growth of *Cymbidium* orchid. *J Phthopathology* 42: 178-182.
- Plikaytis BD, Carlone GM, Edmons P and Mayer LW. 1986. Robust estimation of standard curves for protein molecular weight and linier duplex DNA base pair number after gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 152 : 346-364
- Semancik, JS. 1966. Studies on electrophoretic heterogeneity in isometric plant viruses. *J. Virology* 30 : 698.
- Sherpa AR, Hallan V, Pathak P, Zaidi AA. 2007. Complete nucleotide sequence analysis of *Cymbidium mosaic virus* Indian isolate: futher evidence for natural recombination among potexviruses. *Journal Bioscience* 32 : 663-669
- Suryani and Ambarsari L. 2010. Teknik Penelitian Biokimia. Penuntun Praktikum. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Syamsiah M. 2011. Eliminasi *Cymbidium mosaic virus* pada *protocorm like bodies* anggrek *Dendrobium* menggunakan zat antiviral Ribavirin.
- Tanaka S, Nishii H, Ito S, Iwaki MK. 1997. Detection of *Cymbidium mosaic virus* and *odontoglossum ringspot*

- tobamovirus* from Thai orchids by rapid Immunofilter Paper Assay. *Plant disease* 81: 167-170
- Wisler GC. 1989. How to control orchid viruses : the complete guide book. USA: Maupin House Publisher.
- Wolf G. and Casper R. 1971. Disc electrophoretic separation of elongated plant virus in polyacrylamide-agarose gels. *J. Virology* 12 : 325 -329.