

**DETEKSI *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) PENYEBAB PENYAKIT Kerdil
PADA TANAMAN LADA SECARA *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
*Detection of piper yellow mottle virus (PYMoV), the cause of dwarf disease on black pepper by
Polymerase Chain Reaction (PCR)***

Miftakhurohmah, Maya Mariana dan Dono Wahyuno

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111
Telp 0251-8321879 Faks 0251-8327010
balittro@litbang.pertanian.go.id
miftah_tia05@yahoo.co.id

(diterima 11 Desember 2015, direvisi 02 Maret 2016, disetujui 31 Maret 2016)

ABSTRAK

Penyakit kerdil yang disebabkan oleh *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) dan *Cucumber mosaic virus* (CMV) merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman lada di Indonesia. Keberadaan PYMoV tidak mudah dikenal karena di lapang infeksi kedua virus dapat terjadi pada satu tanaman. Deteksi PYMoV pada sampel tanaman lebih akurat perlu dicari dan teknik molekuler dianggap paling sesuai untuk saat ini. Tujuan penelitian ini adalah mendeteksi PYMoV pada tanaman lada secara *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer spesifik PYMoV-F dan PYMoV-R. Isolasi total DNA tanaman lada dilakukan menggunakan *ATP genomic DNA mini kit*. Deteksi PYMoV secara molekuler dilakukan dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer spesifik PYMoV-F dan PYMoV-R. Untuk mengecek spesifitas primer yang digunakan, dilakukan peruntutan nukleotida pada produk PCR yang dihasilkan. Runutan nukleotida yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan program *BioEdit Sequence Alignment Editor, Complementor, Translate* dan BLAST. DNA total hasil isolasi memiliki kualitas yang baik terlihat dari terbentuknya pita DNA yang utuh pada gel elektroforesis. Teknik PCR yang dilakukan berhasil mendapatkan pita DNA berukuran sekitar 450 pb (pasang basa) sesuai dengan prediksi dari desain primer. DNA yang didapatkan memiliki runutan nukleotida sebanyak 450 nukleotida yang ditranslasikan menjadi 148 asam amino. Hasil analisis BLAST runutan nukleotida menunjukkan bahwa isolat yang terdeteksi merupakan PYMoV yang memiliki kemiripan runutan nukleotida sebesar 92% dengan PYMoV asal Vietnam. Primer PYMoV-F dan PYMoV-R dapat digunakan untuk mendeteksi PYMoV pada tanaman lada.

Kata kunci: Deteksi virus, lada, PCR, PYMoV

ABSTRACT

Dwarf disease caused by Piper yellow mottle virus (PYMoV) and Cucumber mosaic virus (CMV) is one of the important diseases of black pepper in Indonesia. The PYMoV presence in the natural condition is difficult to be detected through conventional method since both the viruses often infect on a single plant. A more appropriate method to detect the PYMoV existence should be developed, and the recent progress of molecular techniques is a promising tools for detecting the presence of PYMoV in a black pepper accurately. The purpose of this study was to detect PYMoV on black pepper by PCR using specific primer pairs PYMoV-F and PYMoV-R. Isolation of total DNA from black pepper leaf was performed using genomic DNA mini kit ATP. PYMoV molecular detection was performed by PCR using specific primer pairs of PYMoV-F and PYMoV-R. The specificity of the used primers was tested by performing nucleotide sequencing analysis based on the resulting PCR products. Nucleotide sequences were analyzed using software of BioEdit Sequence Alignment Editor, Complementor, Translate and BLAST. Total DNA isolation results showed good quality, it was seen from the formation of an intact DNA bands in the gel electrophoresis. PCRs were performed successfully obtained DNA band measuring approximately 450 bp (base pairs) in accordance with the predictions of the primary design. DNA had

450 of nucleotides which were translated as 148 amino acids. Detected isolates were PYMoV that had 92% similarity of nucleotide sequences with PYMoV from Vietnam. PYMoV-F and PYMoV-R primers can be used to detect PYMoV on black pepper.

Key words: Viral detection, black pepper, PCR, PYMoV

PENDAHULUAN

Lada merupakan salah satu komoditas andalan subsektor perkebunan Indonesia. Volume ekspor lada Indonesia pernah mencapai 8.000 ton dengan nilai ekspor sebesar 57 juta US \$ pada September 2013, namun kemudian menurun menjadi 3.434 ton, nilai ekspor 33 juta US \$ pada Desember 2014 (Pusdatin, 2013; Pusdatin 2015). Demikian juga produksi dan luasan pertanaman nasional mengalami penurunan. Produksi lada nasional pada tahun 2013 mencapai 91.039 ton, dengan luasan pertanaman mencapai 171.920 ha, sedangkan tahun 2014 turun menjadi 90.920 ton dan 171.280 ha. Perkiraan data tahun 2015 juga semakin menurun menjadi produksi hanya 87.447 ton dengan luasan pertanaman 162.751 ha (Ditjenbun, 2014).

Rendahnya produktivitas lada karena teknik budidaya seadanya dan serangan Organisme Pengganggu Tanaman (OPT). Gejala defisiensi pada beberapa pertanaman di Bangka Belitung diduga disebabkan kurangnya dosis pemupukan (Daras *et al.*, 2012). Petani belum menggunakan benih unggul juga menjadi penyebab rendahnya hasil panen (Saefudin, 2014). Selain itu, serangan penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici* dapat menurunkan produksi lada berkisar antara 10-15% setiap tahun (Harni dan Amaria, 2012).

Penyakit kerdil yang disebabkan virus juga menjadi salah satu penghambat produksi lada. Penyakit ini sudah sejak tahun 1952 diketahui menyerang tanaman lada di Indonesia. Pada saat itu berdasarkan pengamatan di lapang, penyakit ini berkembang sangat cepat, menyebabkan tanaman menjadi kerdil (Sitepu dan Kasim, 1976; Firdausil, 1989). Laporan terakhir menyebutkan virus penyakit kerdil sudah terdeteksi pada per-

tanaman lada di Bangka, Lampung dan Sukamulya (Hartati *et al.*, 2005). Namun, belum terdapat data luasan terserang dan kerugiannya. Penyebab penyakit kerdil pada lada adalah virus dari genus *Badnavirus*, yaitu *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) dan dari genus *Cucumovirus*, yaitu *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Lakani, 2006). Selain di Indonesia, kedua virus ini juga ditemukan di Srilanka, Brazil, India dan Malaysia (Sarma *et al.*, 2001; de Silva *et al.*, 2002; Eng, 2002; Duarte *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2010).

Deteksi keberadaan virus pada sampel tanaman bergejala secara cepat dan akurat dibutuhkan pada berbagai keperluan dari mulai monitoring berkala, penilaian intensitas serangan pada suatu pertanaman hingga untuk mengetahui penyebab penyakit. Deteksi keberadaan virus di lada penting dilakukan karena infeksi virus pada tanaman seringkali tidak menimbulkan gejala penyakit (Bhat, 2012) sehingga diperlukan metode deteksi yang akurat. Salah satu teknik deteksi virus dengan hasil cepat dan akurat adalah secara molekuler dengan teknik PCR. Deteksi PYMoV pada lada sebelumnya telah berhasil dilakukan secara PCR tetapi menggunakan pasangan primer *general Badnavirus* (de Silva *et al.*, 2002; Eng *et al.*, 1999). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi PYMoV pada lada dengan pasangan primer spesifik PYMoV-F dan PYMoV-R.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Penyakit, Kelompok Peneliti Proteksi, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor, mulai Februari sampai Juni 2015. Tahapan penelitian yang dilakukan adalah: pengambilan sampel, isolasi DNA, amplifikasi DNA, visualisasi hasil PCR dan sekuensing.

Pengambilan sampel

Sampel lada bergejala terinfeksi virus (gejala belang) diambil dari Cimanggu, Sukamulya dan Purbalingga. Sampel dimasukkan dalam pelepah pisang, kemudian dibawa ke laboratorium.

Isolasi DNA

Isolasi total DNA tanaman dilakukan menggunakan *ATP Genomic DNA mini kit (Plant)* dengan prosedur sebagai berikut (Vogelstein and Gillespie, 1979) : sampel daun lada sakit 0,1 g diletakkan dalam mortar, ditambah bufer GP1 sebanyak 500 µl, digerus sampai halus, dipindahkan ke dalam tube steril, ditambah dengan Rnase A (10 mg ml⁻¹) sebanyak 5 µl, kemudian divortex 10-15 detik. Larutan dalam tube diinkubasikan dalam *water bath* pada suhu 65 °C selama 20 menit dan dibolak-balik tiap 5 menit. Pada tahap ini, sekaligus memanaskan bufer *elution* yang akan diperlukan pada tahap akhir (keperluannya sebanyak 100 µl setiap sampel). Setelah diinkubasi, bufer GP2 sebanyak 100 µl ditambahkan ke dalam tube, kemudian divortex 10-15 detik. Selanjutnya tube diinkubasi di dalam freezer selama 3 menit. Setelah diinkubasi, *filter column* disiapkan pada *tube collection* 2 ml, kemudian larutan dalam tube dipindahkan ke dalam *filter column*. Larutan dalam *filter column* disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit. *Filter column* dibuang. Supernatan dipipet secara hati-hati (endapannya jangan sampai terbawa), dipindahkan ke dalam tube baru. Bufer GP3 sebanyak 1,5 x volume supernatan ditambahkan ke dalam tube, kemudian divortex 10-15 detik. Setelah itu, *Genomic DNA Gravity desalting (GD) column* disiapkan pada *collection tube* 2 ml, kemudian larutan dalam tube sebanyak 750 µl dipindahkan ke dalam *GD column*, disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Hasil buangan dalam *collection tube* dibuang, kemudian ditambahkan bufer W1 sebanyak 400 µl ke dalam *GD column*, disentrifugasi pada kecepatan

13.000 rpm selama 30 detik. Hasil buangan pada *collection tube* dibuang, dan *GD column* ditempatkan lagi pada *collection tube*, ditambahkan *wash buffer* sebanyak 600 µl, disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. Hasil buangan pada *collection tube* dibuang, *GD column* ditempatkan lagi pada *collection tube*, disentrifugasi lagi pada kecepatan 13.000 rpm selama 3 menit untuk mengeringkan kolom. *GD column* dipindahkan ke tube baru, ditambahkan *elution buffer* sebanyak 100 µl, dibiarkan 3-5 menit sampai bufer menyerap ke dalam matrix pada kolom. *GD column* disentrifugasi pada kecepatan 13.000 rpm selama 30 detik. DNA dalam tube kemudian disimpan dalam freezer bersuhu 20 °C, sampai digunakan. Sebelum digunakan sebagai templat PCR, dilakukan pengecekan kualitas DNA secara elektroforesis.

Amplifikasi DNA

Primer yang digunakan adalah PYMoV-F : TAACAGGACTAGGGATCG dan PYMoV-R: CAGCTGGTCTTGATAATAG (Bhat and Siju, 2007). Amplifikasi dilakukan pada reaksi campuran dengan total volume 25 µl yang terdiri dari : dream taq DNA polymerase (Thermo Scientific) 0,15 µl, dream taq buffer 2,5 µl, dNTP mix (2 mM) 5 µl, primer PYMoV-F 10 µM dan PYMoV-R 10 µM, masing-masing 1,0 µl, DNA templat 1 µl dan air bebas nuklease ditambahkan sampai volume akhir 25 µl. Program PCR mengacu pada penelitian Bhat dan Siju (2007) yang dimodifikasi, diatur dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 1 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari : 95 °C selama 30 detik, 50 °C selama 1 menit dan 72 °C selama 1 menit, diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 10 menit.

Visualisasi DNA

DNA total hasil isolasi dan produk PCR divisualisasi pada gel agarosa 1,5%. Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa, untuk dilakukan elektroforesis pada 50 Volt selama 60 menit. Gel diwarnai dengan larutan ethidium bromida selama 3-5 menit. Hasil elektroforesis

divisualisasi di bawah *transilluminator ultraviolet* dan didokumentasi.

Sekuensing

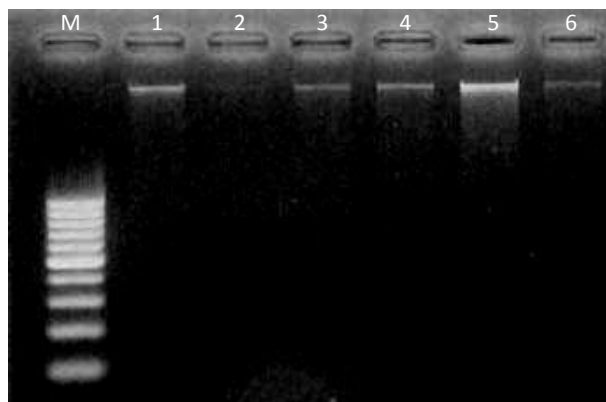
Produk PCR yang diperoleh dikirim ke PT Genetika Science Indonesia untuk dilakukan sekuensing (perunutan nukleotida). Runutan nukleotida hasil amplifikasi dengan primer *reverse* diubah menjadi *reverse complement* menggunakan software *Complementor* (www.justbio.com/complementor) dilanjutkan dengan penggabungan runutan nukleotida hasil amplifikasi dengan primer *forward* dan runutan nukleotida *reverse complement* menggunakan software *BLAST two sequence* (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov). Hasil penggabungan kedua runutan nukleotida tersebut diedit menggunakan program *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Runutan nukleotida yang telah diedit, dilakukan *translate* proteinnya menggunakan software *Translate* (www.expasy.org/tools), selanjutnya dianalisis menggunakan software *BLAST* untuk menentukan keterkaitan dengan spesies lain dari GenBank.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

Isolasi DNA yang dilakukan dengan *ATP genomic DNA mini kit* (plant) berhasil mendapatkan DNA total tanaman lada dengan harapan diperoleh virus pada sampel tanaman sakit. Kualitas DNA yang dihasilkan, dicek dengan melakukan visualisasi pada gel agarose seperti halnya visualisasi produk PCR. Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa DNA yang dihasilkan memiliki kualitas yang bagus, ditunjukkan dengan terbentuknya pita utuh di bagian atas, tanpa adanya *smear* (bayangan) di bawahnya (Gambar 1). Terbentuknya *smear* di bawah pita DNA, menunjukkan DNA yang dihasilkan terdegradasi atau tidak utuh (Sisharmini *et al.*, 2001 dalam Prayitno and Nuryandani, 2011). Kualitas DNA yang diperoleh menentukan hasil PCR karena DNA tersebut berfungsi sebagai templat untuk amplifikasi pita DNA target. Hasil

amplifikasi dengan templat DNA yang utuh menggunakan primer RAPD OPB-17 mendapatkan pola pita DNA yang jelas dan tebal (Syafaruddin dan Santoso, 2011). Hasil isolasi DNA di atas menunjukkan, bahwa dengan cara tersebut di atas (*ATP genomic DNA mini kit*) DNA dapat diperoleh dengan cara yang lebih efisien.



Gambar 1. Visualisasi hasil isolasi DNA total tanaman lada pada gel agarose 1,5% M. Marker 100 pb, 1-6. Sampel daun lada.

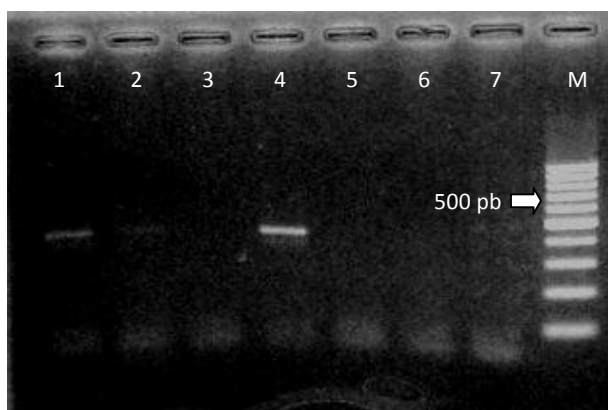
Figure 1. Visualization of the isolated of black pepper total DNA on agarose gel 1,5% M. Marker 100 bp, 1-6. Samples of black pepper leaves.

Amplifikasi DNA dan visualisasi hasil PCR

Hasil amplifikasi DNA menggunakan primer PYMoV-F dan PYMoV-R menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran kurang lebih 450 bp pada 1 sampel daun lada yang bergejala terinfeksi virus asal Cimanggu dan Sukamulya (Gambar 2). Ukuran pita yang didapatkan sesuai dengan hasil penelitian Bhat dan Siju (2007). Selanjutnya untuk mengecek apakah pita DNA yang didapatkan merupakan PYMoV, dilakukan sekuensing (perunutan nukleotida) terhadap salah satu produk PCR yang dihasilkan yaitu sampel asal Cimanggu varietas Natar.

Hasil edit runutan nukleotida dan analisa BLAST

Hasil runutan nukleotida isolat virus Cimanggu, Bogor yang telah diedit, dan dicek *translate* proteinnya didapatkan runutan nukleotida berjumlah 450 nukleotida dan 148 asam amino (Gambar 3a dan 3b). DNA target hasil PCR dengan primer PYMoV-F dan PYMoV-R



Gambar 2. Visualisasi hasil PCR dengan primer PYMoV-F dan PYMoV-R pada gel agarose 1,5%. 1 dan 4. Sampel lada terinfeksi PYMoV (Cimanggu, dan Sukamulya); 2, 3, 5 dan 6. Sampel lada tidak terinfeksi PYMoV (Purbalingga dan Sukamulya); 7. Kontrol negatif; M. Marker 100 pb.

Figure 2. Visualization of PCR results with primers PYMoV-F and PYMoV-R on 1,5% agarose gel. 1 and 4. The black pepper sample was infected by PYMoV (Cimanggu and Sukamulya); 2, 3, 5 and 6. The black pepper sample was not infected by PYMoV (Purbalingga and Sukamulya); 7. The negative control; M. Marker 100 bp.

merupakan bagian dari gen *hypothetical* genom PYMoV asal tanaman lada dengan kode akses DQ836226 (Bhat and Siju, 2007). Dengan demikian, hasil *translate* proteinnya terdapat bagian yang merupakan gen yang utuh. Bila hasil *translate* protein pada bagian gen didapatkan asam amino yang merupakan *stop codon* (dengan kode nukleotida TAA, TAG dan TGA), pengeditan runutan nukleotida harus diulang lagi.

Hasil analisa BLAST terhadap runutan nukleotida isolat menunjukkan homologi sebesar 92% dengan isolat PYMoV dari tanaman lada asal Vietnam. Sedangkan dengan isolat PYMoV yang lain memiliki homologi sebesar 86-88% (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan bahwa isolat yang ditemukan pada tanaman lada merupakan PYMoV. Berdasarkan hasil deteksi PYMoV pada tanaman lada dapat dilakukan secara PCR menggunakan primer PYMoV-F dan PYMoV-R.

```
AGGGATCGACGTTAAGTTCCAACACATTGACGGTAA
AGAAAACCTCTTTGGCTGATTCTTTATCTAGATTAACCT
GTTCTCTGATCAGGCAATGGCATCAACTGGAGCCGG
TAATTACTACCATGGAAGCAGCTCTCGTTCAGGAGCA
ACTGAACCCAACGCCAGGGTCGACCAAAGCATTGAA
TCAGACCCTGCACCACGTCAACGAGTGGCTGAGCTC
GACCAGCAGTACCAAAATGTCCTCGAGAGGTTACC
AGGACTGACTGCACCAGCACAAAGAGAATGGTGGAA
CCACTTGTGTCAGCTCAAGGAGCTTGAAGCAGAAGC
CATCAAAGAAGCCGAAAAAGCGGTGGAAGTCTCTCGT
CAACCTCCACCAGCTAAAGCATGCTGAGTGCGCACG
TCTTTCCAGAAGGACTCAACAGCTAAAGGATTCCGTG
CCCAACTATTATCAG
```

Gambar 3a. Runutan nukleotida bagian gen *hypothetical* isolat PYMoV asal tanaman lada varietas Natar 1 Cimanggu.

Figure 3a. Nucleotide sequences of the *hypothetical* partial gene of PYMoV isolate from the black pepper variety, "Natar 1 Cimanggu".

```
GIDVKFQHIDGKENS LADSLSRLTCSLI
RQWHQLEPVITTEAALVQEQLNPTP
GSTKALNQLHHVNEWLSSTSSTKMSS
RGSPGLTAPAQENGGTTCVSSRSLKQK
PSKKPKKRWKSSSTSTSSMLSAHVFP
GLNSSRIPCPTII
```

Gambar 3b. Runutan asam amino bagian gen *hypothetical* isolat PYMoV asal tanaman lada varietas Natar 1 Cimanggu.

Figure 3b. Nucleotide sequences of the *hypothetical* partial gene of PYMoV isolate from the black pepper variety, "Natar 1 Cimanggu".

Deteksi PYMoV dari tanaman lada secara PCR sebelumnya telah berhasil dilakukan menggunakan primer Badna-T dan SCBV-R1, meskipun pita DNA yang dihasilkan lebih pendek yaitu 650 pb (Lakani, 2006). Primer yang digunakan tersebut merupakan primer general untuk mendeteksi kelompok *Badnavirus* dengan DNA target berukuran 700 pb. Primer ini digunakan karena primer khusus PYMoV lada belum tersedia (de Silva et al., 2002). Pada penelitian ini, berhasil dilakukan teknik deteksi menggunakan primer khusus PYMoV.

Deteksi PYMoV dapat juga dilakukan secara serologi dengan teknik ELISA. Namun, disamping antiserum PYMoV belum tersedia secara komersial, teknik ELISA dengan antiserum PYMoV seringkali mendapatkan data yang kurang akurat karena titer PYMoV yang rendah pada tanaman (Bhadramurthy *et al.*, 2005).

Pada penelitian ini, berhasil dilakukan teknik deteksi PYMoV lada asal Indonesia menggunakan primer khusus PYMoV. Penelitian ini juga memberi bukti tambahan bahwa virus PYMoV memang ada pada pertanaman lada di Indonesia. Dengan menggunakan PCR memungkinkan untuk mendeteksi keberadaan PYMoV pada tanaman *Piper spp.* yang lebih akurat. Deteksi pada tanaman-tanaman lainnya di masa mendatang perlu dilakukan sebagai bagian dari upaya menekan sumber inokulum di lapang, karena virus PYMoV mudah tertular melalui serangga vektor *Ferrisia virgata* dan *Planococcus minor* (Bhat *et al.*, 2003; Balfas *et al.*, 2007).

Tabel 1. Hasil analisa BLAST urutan nukleotida PYMoV asal tanaman lada varietas Natar 1 Cimanggu.
 Table 1. Results of BLAST analysis of nucleotide sequence PYMoV from black pepper variety, Natar 1 Cimanggu.

No.	Kode akses	Negara	Inang	Kemiripan (%)
1	KF056865	Vietnam	Lada	92
2	KC808712	India	Lada	88
3	AJ626981	Srilanka	Lada	88
4	EU009725	India	Lada	88
5	DQ836236	India	<i>Piper longum</i>	87
6	DQ836228	India	Lada	87
7	DQ836226	India	Lada	86

KESIMPULAN

Keberadaan virus PYMoV pada lada dapat dideteksi dengan PCR menggunakan primer spesifik PYMoV-F dan PYMoV-R. Hasil sekuensing dan peruntutan asam amino isolat asal lada Indonesia mempunyai kemiripan runutan nukleotida sebesar 92% dengan PYMoV asal Vietnam. Pengetahuan tentang inang alternatif virus PYMoV lainnya perlu diketahui untuk menekan kerusakan lada yang disebabkan oleh virus tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

Balfas R, I Lakani, Samsudin dan Sukamto. 2007. Penularan Penyakit Kerdil pada Tanaman Lada oleh Tiga Jenis Serangga Vektor. *Jurnal Littri* 13(4): 136-141.

Bhadramurthy V, S Retheesh, AI Bhat, R Madhubala, PS Hareesh and RP Pant. 2005. Development of ELISA-based Technique for Detection of a Putative *Badnavirus* Infecting Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Indian Phytopath* 58(3): 314-318.

Bhat AI, S Devasahayam, YR Sarma and RP Pant. 2003. Association of a *Badnavirus* in Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Transmitted by Mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Current Science* 84(12): 1547-1550.

Bhat AI and S Siju. 2007. Development of Single-tube Multiplex RT-PCR for the Simultaneous Detection of *Cucumber mosaic virus* and *Piper yellow mottle virus* Associated With Stunt Disease of Black Pepper. *Current Science* 93(7): 973-976.

Bhat AI. 2012. Characterization and Management of *Piper yellow mottle virus*. In : Recent Trends in Plant Virology. Studium Press LLC. 502 p.

Daras U, BE Tjahyana dan Herwan. 2012. Status Hara Tanaman Lada Bangka Belitung. *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Industri* 3(1): 23-32.

Ditjenbun [Direktorat Jenderal Perkebunan]. 2014. Statistik Perkebunan Indonesia 2013-2015. Lada. Direktorat Jenderal Perkebunan. Jakarta, Desember 2014. 38 hlm.

de Silva DPP, P Jones and MW Shaw. 2002. Identification and Transmission of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* Infecting Black Pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. *Plant Pathology* 51: 537-545.

Duarte MLR, PC Filho and MSF Dantas. 2002. Pest and Diseases of Black Pepper in Brazil. International Pepper News Bulletin. *The Journal for the Pepper Industry*. July-December 2002. 24-34.

Eng L, J Jadol, CA Ong and P Jones. 1999. The Application of Molecular Techniques in the Diagnosis of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Viruses in Sarawak. 5th International Conference on Plant Protection in the Tropics. Kuala Lumpur, 15-18 March 1999. pp. 35-38.

- Eng L. 2002. Viral Disease and Root-knot Nematode Problems of Black Pepper (*Piper nigrum* L.) in Sarawak, Malaysia. International Pepper News Bulletin. *The Journal for the Pepper Industry*. July-December 2002. 39-45.
- Firdausil AB. 1989. Penyakit Kerdil Lada dan Permasalahannya. Prosiding Seminar Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Natar 1988/1989. Hlm. 111-116.
- Harni R dan W Amaria. 2012. Potensi Bakteri Kitinolitik untuk Pengendalian Penyakit Busuk Pangkal Batang Lada (*Phytophthora capsici*). *Buletin Riset Tanaman Rempah dan Industri* 3(1): 7-12.
- Hartati SY, R Balfas, R Noveriza, G Suastika dan I Lakani. 2005. Identification of *Piper yellow mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* from *Piper* spp. Proceeding of the 1st International Conference on Crop Security 2005 (ICCs 2005). Malang, September 20th-22nd, 2005. 314-319.
- Lakani I. 2006. Deteksi dan Identifikasi Penyebab Penyakit Belang (*Mottle*) pada Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.) di Indonesia. Tesis. Institut Pertanian Bogor. 47 hlm.
- Oliveira ACS, AJ Boari, CM de Sousa, KFC Pantoja and CA Souza. 2010. Detection of *Piper yellow mottle virus* on black pepper (*Piper nigrum*) in the States of Minas Gerais, Espirito Santo and Amazonas, Brazil. Abstrak : *Horticultura Brasileira* 28: S952-S956.
- Prayitno E and E Nuryandani. 2011. Optimization of DNA Extraction of Physic Nut (*Jatropha curcas*) by Selecting the Appropriate Leaf. *Bioscience* 3(1): 1-6.
- Pusdatin. 2013. Ekspor, Impor dan Neraca Perdagangan Sub Sektor Perkebunan. *Buletin Bulanan Indikator Makro Sektor Pertanian* 7(12): 12-14.
- Pusdatin. 2015. Ekspor, Impor dan Neraca Perdagangan Sub Sektor Perkebunan. *Buletin Bulanan Indikator Makro Sektor Pertanian* 9(2): 13-15.
- Saefudin. 2014. Tantangan dan Kesiapan Teknologi Penyediaan Bahan Tanam Mendukung Peningkatan Produktivitas Nasional Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.). *Perspektif* 13(2): 111-125.
- Sarma YR, G Kiranmai, P Sreenivasulu, M Anandaraj, M Herma, M Venkatramana, AK Murthy and DVR Reddy. 2001. Partial Characterization and Identification of a Virus Associated With Stunt Disease of Black Pepper (*Piper nigrum*) in South India. *Current Science* 80(3): 459-462.
- Sitepu D dan K Kasim. 1976. Penyakit-penyakit Lada (*Piper nigrum* L.) di Sub Stasiun LPTI Natar, Lampung Selatan. *Pembr. LPTI* (22): 72-82.
- Syafaruddin dan TJ Santoso. 2011. Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif pada Kemiri Sunan (*Reutalis trisperma* (Blanco) Airy Shaw). *Jurnal Littri* 17(1): 11-17.
- Vogelstein B and D Gillespie. 1979. Preparative and Analytical Purification of DNA from Agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(2): 615-619.

