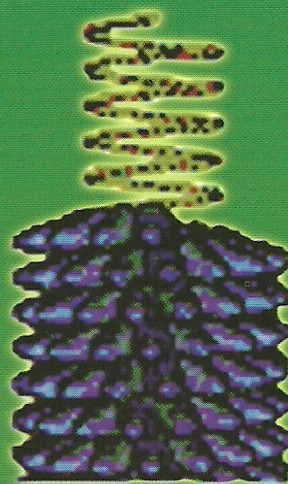


Pedoman Diagnosis

OPTK

Galangan Virus



DEPARTEMEN PERTANIAN
BADAN KARANTINA PERTANIAN
2009

KATA PENGANTAR

Seiring dengan lalulintas perdagangan internasional yang semakin padat, maka potensi Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) yang terbawa oleh media pembawa masuk ke Indonesia juga semakin besar. Salah satu jenis OPTK yang perlu diwaspadai adalah OPTK golongan virus.

Mengingat karakteristik spesifik dari virus maka petugas karantina tumbuhan dituntut mempunyai kemampuan yang memadai dalam melakukan deteksi dan identifikasi OPTK golongan virus. Untuk membantu hal tersebut bisa terwujud, Pusat Karantina Tumbuhan berupaya mencari informasi untuk dituangkan ke dalam bentuk buku pedoman yang dapat digunakan oleh Petugas Karantina Tumbuhan.

Terimakasih diucapkan kepada semua pihak yang berperan dalam penyusunan pedoman ini: Dr Sri Hendrastuti Hidayat dan Dr. Tri Asmira ber, pimpinan dan staf Pusat Karantina Tumbuhan, serta segenap Pejabat Fungsional POPT lingkup Badan Karantina Pertanian khususnya di Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, yang telah berupaya menyiapkan dan menyusun pedoman ini. Adapun isi kandungan pedoman ini berasal dari berbagai sumber, baik publikasi lokal maupun internasional.

Buku pedoman ini masih dirasa perlu untuk diperbaiki demi kesempurnaannya, untuk itu di masa mendatang masih terbuka untuk dikoreksi dari pihak-pihak pengguna maupun narasumber. Akhirnya harapan kami, semoga pedoman ini bermanfaat sebagai bekal dalam melaksanakan tugas dan fungsi karantina.

Kepala Pusat Karantina Tumbuhan,

Drs. Suwanda, ZA., M.Sc.
NIP. 19520506 197210 1 001

DAFTAR ISI

	Hal.
KATA PENGANTAR	i
DAFTAR ISI	ii
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR LAMPIRAN	iv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan	1
1.3 Ruang Lingkup	2
1.4 Pengertian Umum	2
1.5 Dasar Hukum	3
II. METODE DIAGNOSIS OPTK GOLONGAN VIRUS	4
2.1. Prosedur Preparasi Sampel Media Pembawa	5
2.1.1 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Biji	5
2.1.2 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Umbi	6
2.2 Metode Diagnosis secara Biologi	6
2.2.1 Pemeriksaan gejala penyakit pada tanaman atau bagian tanaman..	6
2.2.2 Penggunaan tanaman indikator	11
2.3 Metode Diagnosis secara Serologis	12
2.3.1 <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	13
2.3.1.1 DAS ELISA (<i>Alkaline phosphatase</i>)	15
2.3.1.2 Indirect ELISA (<i>Alkaline phosphatase</i>)	17
2.3.1.3 TAS ELISA (Modifikasi Indirect ELISA)	19
2.3.1.4 Permasalahan dalam proses ELISA	21
2.3.2 <i>Dot Immunobinding Assay (DIBA)</i>	23
2.4 Metode Diagnosis Secara Molekuler	24
2.4.1 <i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>	25
2.4.2 <i>Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR)</i>	34
III. Matrikulasi Metode Diagnosis	46
3.1 Matrik Diagnosis Virus Tanaman OPTK Kategori A1	46
3.2 Matrik Diagnosis Virus Tanaman OPTK Kategori A2	78
DAFTAR PUSTAKA	83

DAFTAR GAMBAR

	Hal.
Gambar 1. Alur Kerja Penanganan Pengujian Media Pembawa	4
Gambar 2. Contoh-contoh gejala spesifik infeksi virus pada daun, batang, buah dan umbi	7
Gambar 3. Beberapa contoh gejala infeksi virus pada tanaman	8
Gambar 4. Badan inklusi dari beberapa grup (Tobamovirus , Potyvirus, dan Cucumovirus)	10
Gambar 5. Tanaman indikator dan gejala lokal lesio yang ditunjukkannya	12
Gambar 6. Beberapa posisi pengikatan antibodi pada sumuran ELISA	13
Gambar 7. Konfigurasi DAS ELISA	14
Gambar 8. Konfigurasi Indirect ELISA	14
Gambar 9. Alur Pengujian Metode ELISA	15
Gambar 10. Reaksi positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna	17
Gambar 11. Reaksi positif infeksi virus PMTV pada umbi kentang asal Canada	21
Gambar 12. Alur kerja identifikasi virus penyebab dengan metode molekuler..	25
Gambar 13. Tahapan pada proses penggandaan pita DNA	27
Gambar 14. Urutan pemuatan sampel ke dalam sumur sampel pada proses elektroforesis	40
Gambar 15. Hasil visualisasi pita DNA BSV sumber inokulum 1) Marker 100 bp ;2) BSV isolat Bogor	41
Gambar 16. Hasil visualisasi <i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV) pada benih kubis ...	41
Gambar 17. Alur prosedur metode PCR	45

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal.
Lampiran 1. Lembar kerja per OPTK	84
Lampiran 2. Jenis dan kondisi tanaman indikator	95
Lampiran 3. Bahan pengujian untuk metode ELISA dan PCR ..	97
Lampiran 4. Alat-alat pengujian untuk ELISA dan PCR	107

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diagnosis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) khususnya golongan virus di laboratorium Unit Pelaksana Teknis lingkup Badan Karantina Pertanian masih mengalami kendala dalam hal keseragaman metode pengujian. Hal tersebut dikarenakan belum tersedianya pedoman diagnosis yang menjadi acuan Petugas Karantina Tumbuhan dalam melakukan deteksi dan identifikasi. Keseragaman metode pengujian dapat mendukung salah satu fungsi karantina tumbuhan dalam hal pelayanan kepada pengguna jasa dapat terlaksana dengan baik.

Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Virus disusun sebagai penjabaran dari *International Standards for Phytosanitary Measure* (ISPM) No.27 tentang *Diagnostic Protocols for Regulated Pests*.

Berdasarkan Keputusan Menteri Pertanian No.38/Kpts/HK.060/1/2006 jo. Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian No.28/Kpts/HK.060/1/2009 tentang Jenis-jenis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) Kategori A1, Golongan I dan Golongan II, Kategori A2 Golongan I dan Golongan II, Tanaman Inang, Media Pembawa, dan Daerah Sebaranya, terdapat 100 jenis OPTK virus kategori A1 dan 7 jenis OPTK virus kategori A2.

Pedoman diagnosis ini menggambarkan prosedur dan metode deteksi dan identifikasi OPTK yang dilakukan oleh Petugas Karantina dalam rangka pemeriksaan kesehatan media pembawa di laboratorium.

1.2 Tujuan

Penyusunan Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Virus bertujuan:

- a. sebagai acuan bagi Petugas Karantina Tumbuhan dalam melaksanakan tindakan pemeriksaan kesehatan media pembawa OPTK golongan virus;
- b. untuk keseragaman metode diagnosis OPTK golongan virus di UPT lingkup Barantan.

1.3 Ruang Lingkup

Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Virus ini memuat metode-metode diagnosis yang digunakan dalam melakukan deteksi dan identifikasi OPTK golongan virus yang kemungkinan terbawa melalui media pembawa yang dilalulintaskan.

1.4 Pengertian Umum

Yang dimaksud dengan istilah dalam pedoman ini adalah sebagai berikut:

- a. Badan inklusi adalah substansi agregat dari sitoplasma atau inti sel, yang berupa protein, dan biasanya merupakan hasil multiplikasi virus pada sel inangnya.
- b. Inhibitor adalah senyawa penghambat reaksi kimia atau sintesa senyawa lainnya, misal : senyawa fenol, tanin, dan asam lemak.
- c. Karantina Tumbuhan adalah tindakan yang merupakan upaya untuk mencegah masuk dan tersebarnya OPT dari luar negeri dan suatu area ke area lain di dalam negeri atau keluarnya dari dalam wilayah negara RI.
- d. Organisme Pengganggu Tumbuhan adalah semua organisme yang dapat merusak, mengganggu kehidupan, menyebabkan kehilangan hasil atau menyebabkan kematian tumbuhan.
- e. Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina adalah semua Organisme Pengganggu Tumbuhan yang ditetapkan oleh menteri untuk dicegah masuknya ke dalam dan tersebarnya di dalam wilayah Republik Indonesia.
- f. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan I adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang tidak dapat dibebaskan dari Media Pembawanya dengan cara perlakuan.
- g. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan II adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang dapat dibebaskan dari Media Pembawanya dengan cara perlakuan.
- h. Organisme Pengganggu Tumbuhan Penting adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan selain Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang keberadaannya pada benih tanaman yang dilalulintaskan dapat menimbulkan pengaruh yang merugikan secara ekonomi terhadap tujuan penggunaan benih tanaman tersebut dan ditetapkan oleh menteri untuk dikenai tindakan karantina tumbuhan.
- i. Tanaman indikator adalah tanaman yang menunjukkan suatu reaksi yang cepat dan khas terhadap infeksi suatu patogen.
- j. Virus Penyakit Tumbuhan adalah wujud submikroskopis yang dapat menimbulkan gangguan fisiologis secara terus-menerus pada tanaman.
- k. Virulensi adalah tingkat kemampuan virus dalam menimbulkan infeksi pada tanaman.

1.5 Dasar Hukum

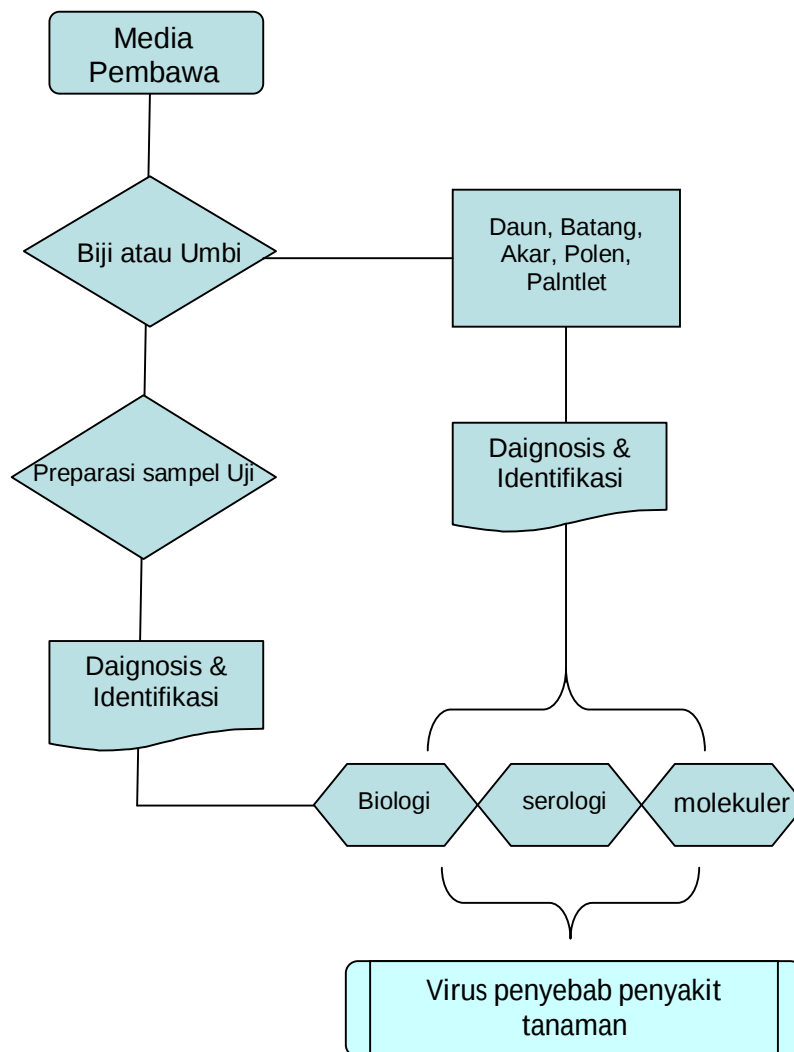
- a. Undang-undang Nomor 16 Tahun 1992 Tentang Karantina Hewan, Ikan, dan Tumbuhan.
- b. Peraturan Pemerintah Nomor 14 Tahun 2002 Tentang Karantina Tumbuhan.
- c. Keputusan Menteri Pertanian Nomor 38/Kpts/Hk.060/1/2006 jo. Keputusan Kepala Badan Karantina Pertanian No.28/Kpts/HK.060/1/2009 tentang Jenis-jenis Organisme

Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) Kategori A1, Golongan I dan Golongan II, Kategori A2 Golongan I dan Golongan II, Tanaman Inang, Media Pembawa, dan Daerah Sebaranya,

d. ISPM No.27 Tahun 2006 tentang *Diagnostic Protocols for Regulated Pest*.

II. METODE DIAGNOSIS OPTK GOLONGAN VIRUS

Diagnosis OPTK golongan virus merupakan langkah penting untuk menentukan virus penyebab penyakit yang terbawa media pembawa. Diagnosis menggambarkan tentang rangkaian kegiatan deteksi dan identifikasi patogen penyebab penyakit, sehingga dapat ditentukan spesies virus penyebab penyakit yang terbawa oleh media pembawa tersebut. Alur pekerjaan diagnosis dari awal hingga mendapatkan patogen penyebab (Gambar 1) akan memudahkan Petugas Karantina melakukan tindakan pengujian di laboratorium.



Gambar 1. Alur Kerja Penanganan Pengujian Media Pembawa

Metode diagnosis virus penyebab penyakit tanaman ada beberapa antara lain pengujian melalui pengamatan badan inklusi virus, pengujian menggunakan tanaman indikator, pengujian secara serologi/ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), dan secara molekuler. Sensitifitas masing-masing metode tergantung pada jenis virus dan jumlah titer virus pada tanaman terinfeksi. Untuk virus-virus golongan Tobamovirus dapat diamati badan inklusinya dengan mudah namun tidak demikian halnya dengan virus golongan lain.

2.1 Prosedur Preparasi Sampel Media Pembawa

Media Pembawa sebagai sasaran pengujian antara lain biji, umbi, stek, daun, batang, akar, plantlet, dan polen. Prosedur preparasi sampel merupakan proses penyiapan sampel media pembawa sebelum dilakukan pengujian di Laboratorium.

Prosedur preparasi sampel dilakukan hanya untuk media pembawa yang perlu ditumbuhkan (biji dan umbi), sedangkan untuk media pembawa selain biji dan umbi dapat langsung dilakukan pengujian. Penumbuhan biji dan umbi ditujukan untuk meningkatkan konsentrasi virus serta meminimalkan konsentrasi senyawa inhibitor pada media pembawa yang akan mengganggu proses pengujian.

2.1.1 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Biji

Instruksi Kerja :

- Siapkan sampel kerja (sesuai Petunjuk Teknis Pengambilan Sampel Bentuk Biji, Pusat Karantina Tumbuhan tahun 2007),
- Tanam biji di dalam nampan yang telah dialas 3-5 lembar kertas towel/ kertas sejenis yang lembab,
- Tutup nampan dengan plastik penutup bening (*cling wrap*),
- Simpan nampan yang telah berisi biji selama 3-5 hari pada tempat cukup cahaya dan bersuhu ruang (nampan juga dapat disimpan di *Growth Chamber* bersuhu 27°C dengan pengaturan lampu selama 12 jam terang dan 12 jam gelap).

Catatan:

Perkecambahan dapat dipercepat dengan cara merendam biji sampel kerja pada air mengalir selama kurang lebih 3-12 jam. Cara ini dilakukan sebelum biji ditanam pada nampan.

2.1.2 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Umbi

Instruksi Kerja :

- Siapkan sampel kerja,
- Umbi yang belum bertunas, antara lain kentang, caladium, disimpan di tempat yang kering dan cukup cahaya selama 5 hari, hingga tumbuh tunas 0,5 – 1 cm,
- Umbi bertunas antara lain lilium, umbi lapis, pengujian dapat langsung dilakukan dengan mengambil mata tunas.

2.2. Metode Diagnosis secara Biologi**2.2.1. Pemeriksaan gejala penyakit pada tanaman atau bagian tanaman**

Pemeriksaan berdasarkan gejala penyakit pada tanaman atau bagian tanaman (termasuk benih) dapat membantu diagnosis awal penyebab penyakit tanaman oleh virus. Tanaman atau bagian tanaman dengan gejala spesifik dapat di deteksi berdasarkan metode ini (Gambar 2 dan 3).

Pemeriksaan dapat dilakukan terhadap keberadaan badan inklusi partikel virus, terjadinya nekrosis pada jaringan floem, atau deposisi enzim kalose (Hunter D. 2001).



Gambar 2. Contoh-contoh gejala spesifik infeksi virus pada daun, batang, buah dan umbi (Agrios, 2005)



Soybean Mosaic Virus (CABI 2007)



Broadbean Wilt Virus (CABI 2007)



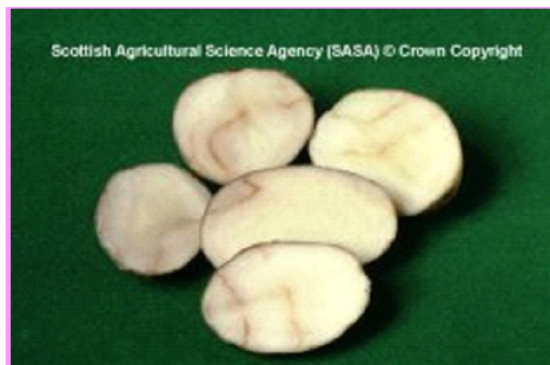
Papaya Ring Spot Virus (PYRV) (CABI 2007)



Cucumber Mosaic Virus (CMV) (CABI 2007)



Banana Streak Virus (Rustiani 2005)



Gejala infeksi PMTV pada umbi kentang (SASA.2007)

Gambar 3 . Beberapa contoh gejala infeksi virus pada tanaman

Alat dan Bahan:

- Kaca pembesar/ loup/ Mikroskop cahaya
- Kamera untuk dokumentasi
- Alat pemotong (pisau/ gunting/ silet),
- Bahan pewarna : trypan blue, phloroguicinol,
- Gelas obyek dan gelas penutup.

Instruksi Kerja untuk Pengamatan Badan Inklusi :

- Tanaman atau bagian tanaman yang akan diperiksa dilihat dengan menggunakan kaca pembesar, agar gejala penyakit yang ada pada tanaman atau bagian tanaman dapat terlihat dengan lebih jelas,
- Lakukan pemotongan jaringan tanaman menggunakan pisau/ silet steril dan letakkan di atas gelas obyek,
- Tetesi jaringan dengan trypan blue, tutup dengan kaca penutup,
- Amati badan inklusi virus akan tampak berwarna biru tua menggunakan mikroskop cahaya .
- Dokumentasikan tanaman atau bagian tanaman yang menunjukkan gejala infeksi virus tanaman, sehingga dapat dijadikan bukti ilmiah untuk dilakukan identifikasi lebih lanjut menggunakan metode yang lebih valid.

Catatan :

Badan inklusi yang berada pada jaringan terinfeksi virus kadang-kadang dapat digunakan sebagai pengenalan awal virus ke dalam suatu grup. Beberapa virus dapat diamati badan inklusinya (Gambar 4), antara lain Bean Yellow Mosaic Virus, Turnip Mosaic Virus, Cauliflower Mosaic Virus, Dahlia Mosaic Virus, Red Clover Vein Mosaic virus, Tobacco Etch Virus, Tobacco Mosaic Virus, dan Watermelon Mosaic Virus (Hunter D. 2001)

Instruksi Kerja untuk Pengamatan Nekrosis pada Jaringan Floem :

- Irislah bagian jaringan floem pada batang terinfeksi virus menggunakan pisau/ silet steril lalu letakkan pada gelas obyek,
- Warnai jaringan dengan Phloroglucinol,
- Amati dibawah mikroskop. Jaringan nekrosis akan tampak berwarna lebih gelap dibanding jaringan yang tidak mengalami nekrosis.

Catatan :

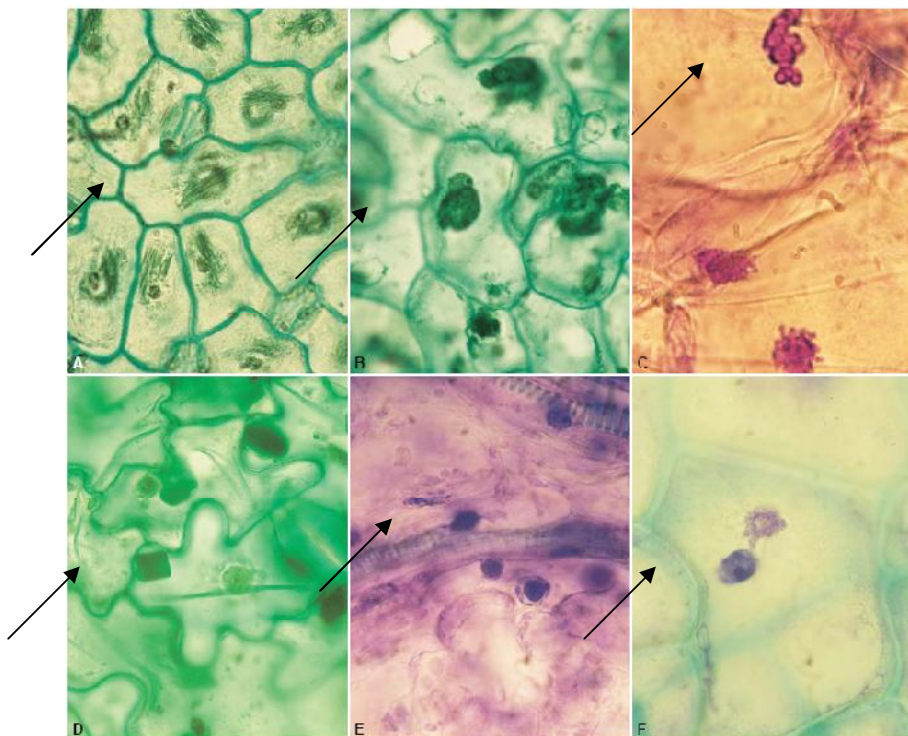
Infeksi tanaman kentang oleh Potato Leaf Roll Virus akan menginduksi terjadinya nekrosis pada jaringan floem pada umbi dan batang kentang. Nekrosis yang terjadi dapat diamati di bawah mikroskop setelah dilakukan pewarnaan dengan phlorogucinol (Hunter D. 2001).

Instruksi Kerja untuk Uji Igel Lange (pengamatan deposisi kalose) :

- Irislah bagian jaringan umbi atau floem pada batang, yang terinfeksi virus menggunakan pisau/ silet steril lalu letakkan pada gelas obyek,
- Warnai jaringan dengan *resorcin blue*,
- Amati dibawah mikroskop. Kalose yang terdeposit pada jaringan floem akan mengalami perubahan menjadi biru,

Catatan :

Metode uji ini umum digunakan untuk deteksi Potato Leaf Roll Virus pada batang atau umbi kentang (Hunter D. 2001).



Gambar 4. Badan inklusi dari beberapa grup (Tobamovirus, Potyvirus, dan Cucumovirus) (Agrios, 2005)

2.2.2 Penggunaan tanaman indikator

Ada beberapa jenis tanaman yang sangat rentan terhadap virus tertentu dan menunjukkan gejala yang khas sehingga dapat dimanfaatkan sebagai metode untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus tertentu (Walkey 1991). Untuk dapat menerapkan metode deteksi ini, terlebih dahulu harus diketahui sifat dari virus yang akan diuji, diantaranya cara penularan dan jenis gejala yang ditimbulkan pada tanaman yang dijadikan tanaman indikator (Gambar 5),

Alat dan Bahan:

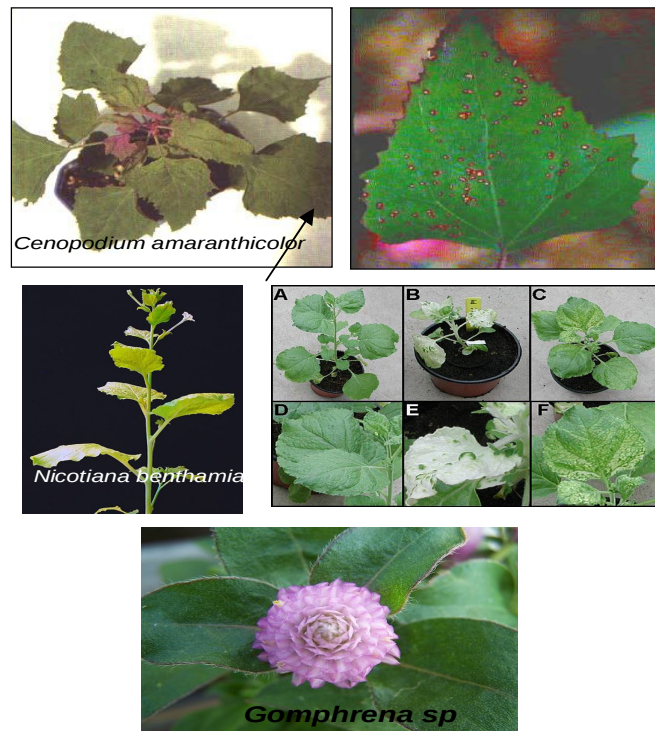
- Tanaman indikator dipilih berdasarkan Virus yang akan diuji
- Mortar dan pistil
- Buffer Fosfat pH 7 mengandung 1% B-mercapthoethanol (yang ditambahkan sesaat sebelum digunakan)
- Aquadest
- Alat pemotong (pisau atau gunting) steril
- Kain kasa
- Sentrifuge
- Tabung sentrifuge
- Sarung tangan karet
- Karborundum 600 mesh

Instruksi Kerja:

1. Buat sap dari tanaman atau bagian tanaman yang terinfeksi virus dengan cara menggerus jaringan terinfeksi dengan 0.01 M buffer fosfat dingin pH 7 dengan perbandingan 1:10 b/v (berat/volume). Lakukan persiapan sap dalam kondisi dingin ,
2. Saring sap tanaman dengan menggunakan kain kasa, bila diperlukan,
3. Karborundum ditaburkan pada bagian tanaman indikator yang akan diinokulasi,
4. Oleskan sap menggunakan jari tangan bersarung karet pada bagian tanaman indikator yang telah ditaburi dengan karborundum,
5. Setelah inokulasi, bagian tanaman yang diinokulasi dibilas dengan menggunakan aquadest,
6. Simpan/ inkubasi tanaman di Rumah Kaca/*Growth Chamber*. Selama masa inkubasi, kelembaban lingkungan tanaman dijaga, agar mendukung perkembangan infeksi virus yang diinokulasikan.
7. Gejala akan tampak setelah 3 – 7 hari setelah inokulasi. (Berg (1962), Hollings (1957), Yarwood (1953) dalam Noordam 1973)

Catatan :

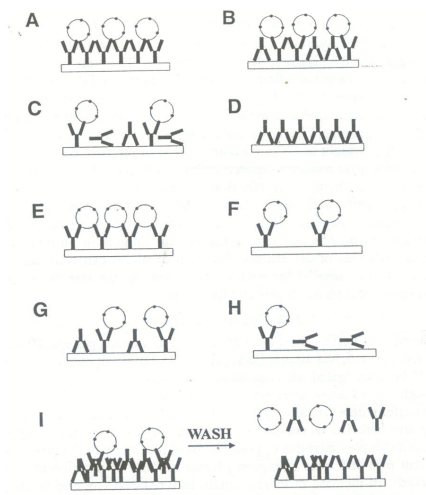
Lakukan inokulasi ke tanaman indikator pada pagi atau sore hari.



Gambar 5. Tanaman indikator dan gejala lokal lesio yang ditunjukkannya

2.3 Metode Diagnosis Secara Serologi

Prinsip kerja serologi didasarkan pada reaksi spesifik antara antigen dan antibodi (antiserum) sehingga terbentuk reaksi conjugate antibody-enzyme (Hunter D. 2001).



Gambar 6. Beberapa posisi pengikatan antibodi pada sumuran ELISA

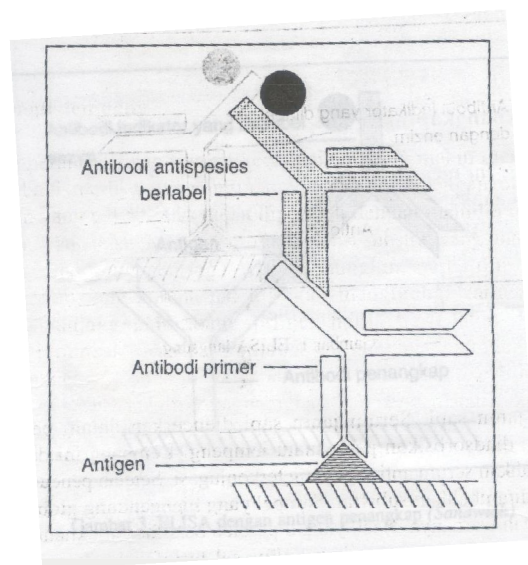
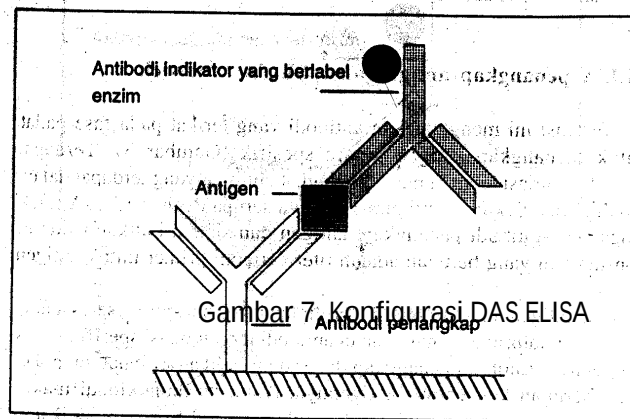
2.3.1. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Metode pengujian ini mulai berkembang sejak tahun 1971. ELISA merupakan suatu metode pengujian serologi yang melekatkan kompleks ikatan antara antibodi dengan antigen di dalam sumuran plate ELISA yang terbuat dari bahan plastik (Dijkstra *et al.* 1998). Jika terjadi reaksi kompatibel antara antibodi dengan antigen akan ditunjukkan dengan adanya perubahan warna yang terjadi.

Keunggulan metode ini (Dijkstra *et al.* 1998):

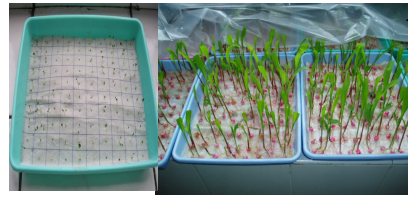
1. Dapat mendeteksi virus pada konsentrasi rendah (1-10 ng/ml)
2. Penggunaan antibodi dalam jumlah sedikit
3. Hasil pengujian pada sap tanaman sama baiknya dengan pengujian pada suspensi virus yang dimurnikan
4. Pengujian dapat diaplikasi pada sampel pengujian dalam jumlah besar
5. Pengujian dapat distandarkan dengan menggunakan kit bahan pengujian
6. Memungkinkan untuk mendapatkan hasil secara kuantitatif (nilai absorbansi) disamping hasil kualitatif (perubahan warna)

Dalam perkembangannya, metode ini mengalami modifikasi dalam prosedur pelaksanaan pengujian, diantaranya adalah pengujian standar (*direct*) DAS ELISA dan *indirect* ELISA. Perbedaan kedua metode ini adalah pada tempat enzim terikat. Bila konjugasi enzim dilakukan pada imunoglobulin antivirus maka metode itu termasuk DAS ELISA, tetapi bila konjugasi enzim dilakukan pada imunoglobulin dari serum darah hewan maka metode tersebut diklasifikasikan sebagai Indirect ELISA.



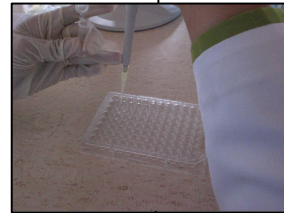
Gambar 8. Konfigurasi Indirect ELISA

Pengujian dalam skala besar lebih efektif dan mudah dilakukan dengan metode ELISA dibanding metode lainnya (Gambar 9). Untuk itulah metode ini paling dipilih dalam rangka screening ketahanan dan pengujian kesehatan benih yang umumnya berskala besar.



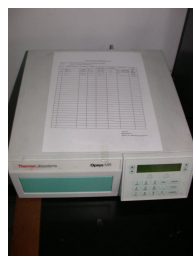
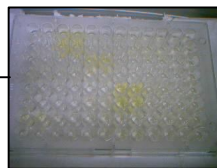
Penanaman & perkecambahan benih

Kecambah digerus untuk diambil sarnya, lalu uji sesuai runutan pada brosur (DAS ELISA atau Indirect ELISA)



ELISA Washer

Hasil akhir reaksi positif i



Pembacaan absorbansi pada ELISA Reader

Gambar 9. Alur pengujian metode ELISA (BUSKT 2005)

2.3.1.1. DAS ELISA (Alkaline phosphatase)

Alat dan Bahan:

- Sampel tanaman
- Kit antisera tersedia komersial (antisera, konjugate, kontrol positif, kontrol negatif),
- Bahan-bahan buffer ELISA (Washing Buffer, ekstrak buffer, *Coating buffer*, *Substrat Buffer*)
- *Plate ELISA*
- *ELISA reader*

- *ELISA washer*
- *Multichanel* mikropipet dan mikrotip
- Botol sprayer
- pNPP
- Pistil
- Plastik penggerus
- Timbangan analitik
- Refrigerator bersuhu 4C

Instruksi Kerja:

1. Isi lubang mikroplate dengan 100 µl antibodi virus target yang telah dilarutkan dalam *coating buffer* dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Inkubasikan pada kotak lembab pada temperatur ruang selama 4 jam atau pada suhu 4° C selama 1 malam.
2. Kosongkan mikroplate kemudian cuci dengan PBST 4-8 kali. Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
3. Isi lubang mikroplate dengan sampel tanaman yang telah digerus menggunakan ekstrak buffer dengan perbandingan 1 : 10 (berat/volume) sebanyak 100 µl. Siapkan pula kontrol positif dan kontrol negatif. Inkubasikan pada suhu ruang selama 2 jam atau pada suhu 4° C selama 1 malam.
4. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
5. Siapkan konjugat/ECI buffer 10 menit sebelum waktu inkubasi berakhir. Isi mikroplate dengan 100 µl enzim konjugat virus target yang telah dilarutkan dengan konjugat buffer dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Tutup plate dengan kertas towel lembab dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 2 jam.
6. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
7. Siapkan larutan pNPP dalam *substrat buffer* kira- kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 : 1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 µl larutan pNPP. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30 -60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 µl NaOH 3M.
8. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif (Gambar 10),
9. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai absorbansi

sampel lebih dari 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif (kit antisera). **Catatan : setiap sampel diulang paling sedikit dua kali .**



Gambar 10. Reaksi positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna (BUSKT, 2005)

2.3.1.2. Indirect ELISA (Alkaline phosphatase)

Alat dan Bahan:

- Sampel tanaman
- Kit antisera tersedia komersial (antisera, konjugate, kontrol positif, kontrol negatif),
- Bahan-bahan buffer ELISA (Washing Buffer, ekstrak buffer, *Coating buffer*, *Substrat Buffer*)
- *Non fat dried milk*
- *Plate ELISA*
- *ELISA reader*
- *ELISA washer*
- *Multichanel* mikropipet dan mikrotip
- Botol sprayer
- pNPP
- Pistil
- Plastik penggerus
- Timbangan analitik
- Refrigerator bersuhu
- Inkubator bersuhu 37°C

Instruksi Kerja:

1. Isi lubang mikroplate dengan sampel tanaman yang telah digerus menggunakan coating buffer dengan perbandingan 1 : 10 (berat/volume) sebanyak 100 µl. Siapkan pula kontrol positif dan kontrol negatif. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4° C selama 1 malam.

2. Kosongkan mikroplate kemudian cuci dengan PBST 4-8 kali. Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
3. Isi mikroplate dengan larutan 5 % *nonfat dried milk* dalam PBST. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
4. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
5. Larutkan antisera 1 dengan menggunakan *conjugate buffer* dengan perbandingan sesuai kit antisera.
6. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.5 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam.
7. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
8. Larutkan antisera 2 (*conjugate universal*) dengan menggunakan *conjugate buffer* dengan perbandingan sesuai kit antisera.
9. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.8 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
10. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
11. Siapkan larutan pNPP dalam substrat buffer kira- kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 :1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 µl larutan pNPP. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30 -60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 µl NaOH 3M.
12. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif.
13. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif kit antisera.

2.3.1.3 TAS ELISA (Modifikasi Indirect ELISA)

Alat dan Bahan:

- Sampel tanaman
- Kit antisera tersedia komersial (antisera, konjugate, kontrol positif, kontrol negatif),
- Bahan-bahan buffer ELISA (*Washing Buffer*, ekstrak buffer, *Coating buffer*, *Substrat Buffer*)
- *Non fat dried milk*
- *Plate ELISA*
- *ELISA reader*
- *ELISA washer*

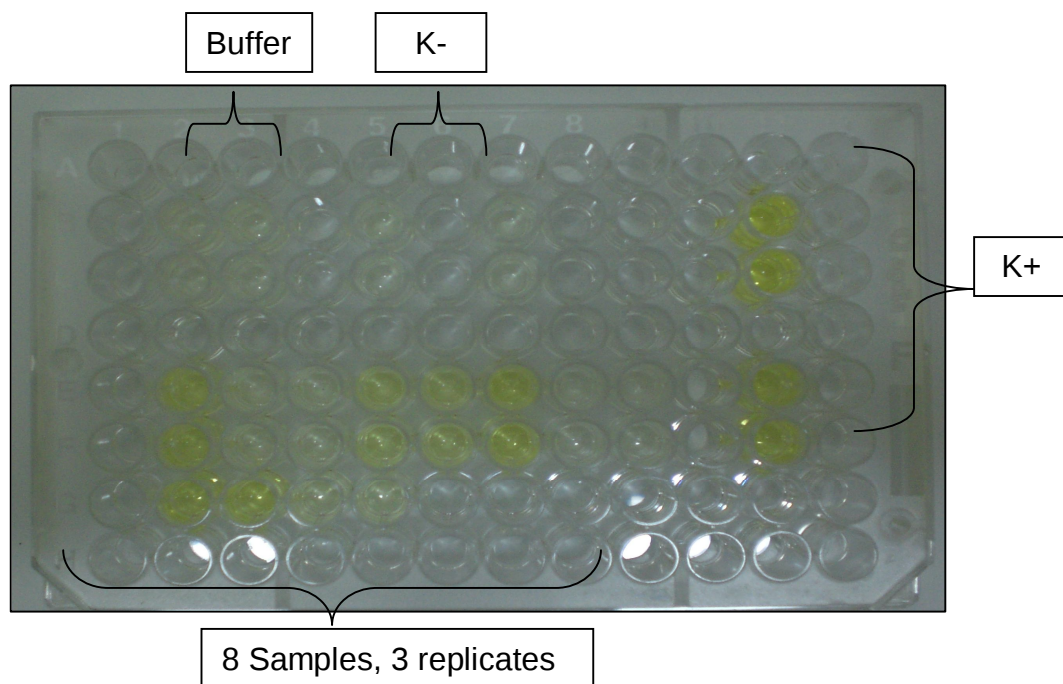
- *Multichanel* mikropipet dan mikrotip
- Botol sprayer
- pNPP
- Pistil
- Plastik penggerus
- Timbangan analitik
- Refrigerator bersuhu
- Inkubator bersuhu 37°C

Instruksi Kerja:

1. Isi lubang mikroplate dengan 100 µl antibodi virus target yang telah dilarutkan dalam *coating buffer* dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4° C selama 1 malam.
2. Isi lubang mikroplate dengan sampel tanaman yang telah digerus menggunakan *coating buffer* dengan perbandingan 1 : 10 (berat/volume) sebanyak 100 µl. Siapkan pula kontrol positif dan kontrol negatif. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4° C selama 1 malam.
3. Kosongkan mikroplate kemudian cuci dengan PBST 4-8 kali. Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.
4. Isi mikroplate dengan larutan 5 % *nonfat dried milk* dalam PBST. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
5. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
6. Larutkan antisera 1 dengan menggunakan *conjugate buffer* dengan perbandingan sesuai kit antisera.
7. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.5 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam.
8. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
9. Larutkan antisera 2 (*conjugate universal*) dengan menggunakan *conjugate buffer* dengan perbandingan sesuai kit antisera.
10. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.8 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
11. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
12. Siapkan larutan pNPP dalam substrat buffer kira- kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 :1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 µl larutan pNPP. Inkubasi

mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30 -60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 µl NaOH 3M.

13. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif (Gambar 11).
14. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai sampel lebih dari 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif kit antisera.



Gambar 11. Reaksi positif infeksi virus PMTV pada umbi kentang asal Canada (BBUSKP, 2009)

2.3.1.4. Permasalahan dalam proses ELISA

Berikut ini disajikan beberapa masalah yang sering terjadi pada saat pemeriksaan sampel menggunakan metode ELISA.

Masalah	Penyebab dan solusi
Tidak muncul warna pada plat	- Tahapan yang dilakukan tidak lengkap/salah - Buffer yang digunakan tidak tepat (kadaluarsa) - Enzim atau antiserum yang digunakan sudah tidak baik kualitasnya - Positif kontrol yang digunakan tidak sesuai untuk antiserum (IgG) yang digunakan
Warna yang muncul tidak spesifik	Apabila hanya muncul pada bagian pinggir penyebabnya adalah efek pinggir, untuk itu bagian pinggir dikosongkan atau hanya diisi dengan buffer Apabila warna muncul pada

	seluruh lubang plate, ada 4 kemungkinan : 1. Antiserum yang digunakan mengandung antibodi untuk antigen tanaman (kurang murni)
Masalah	Penyebab dan solusi
	2. Pencucian yang kurang sempurna 3. Substrat yang sudah tidak baik kualitasnya 4. Salah pada saat memasukkan Solusi : • Gunakan negatif kontrol yang tepat pada masing-masing plate. Gunakan substrat yang masih baik dan cek terlebih dahulu perubahan warnanya apabila sebelum cepat sekali berubah warna berarti substrat sudah jelek kualitasnya
Plate memperlihatkan hasil yang tidak konsisten	• Pencucian yang kurang sempurna • Salah memasukkan • Kontaminasi dari lubang lain dalam 1 plate Solusi : • Tambahkan tahapan pencucian. • Menangani plate dengan hati hati. • Buat peta untuk tiap lubang sehingga tidak salah memasukkan.
Warna muncul terlalu cepat	• Konsentrasi enzyme konjugat terlalu besar • Konsentrasi substrat terlalu tinggi Solusi Gunakan enzim konjugat dan konsentrasi substrat dengan nilai DO 405 nm sebesar 1 dalam waktu 30 sampai 60 menit, dengan antigen yang tepat.
Warna yang terbentuk tidak sempurna	• Adsorpsi reagen pada plate rendah • Gelembung pada tip pipet • Teknik memipet yang salah • Plate rusak • Pencampuran reagen yang tidak

	sempurna • Pengenceran terlalu rendah • Pencucian yang tidak sempurna
Masalah	Penyebab dan solusi
Perubahan warna terlalu lambat	• Konsentrasi enzim konjugat terlalu rendah • Kontaminasi yang menghambat aktivitas enzim contoh NaN₃ menghambat enzim peroksidase • Temperatur laboratorium yang terlalu rendah • Konsentrasi substrat terlalu rendah

2.3.2. Dot Immunobinding Assay (DIBA)

Alat dan Bahan:

- Sampel tanaman
- Kit antisera (Antiserum, konjugate, kontrol negatif, dan kontrol positif)
- Membran nitroselulosa
- Nitro blue tetrazolium (NBT)
- Bromo Chloro Indolyl Phosphate (BCIP)
- N,N-dimethylformamide (DMF)
- Aquabidest
- Bahan-bahan pembuat buffer DIBA (Lampiran)
- Shaker
- *Centrifuge*

Instruksi Kerja:

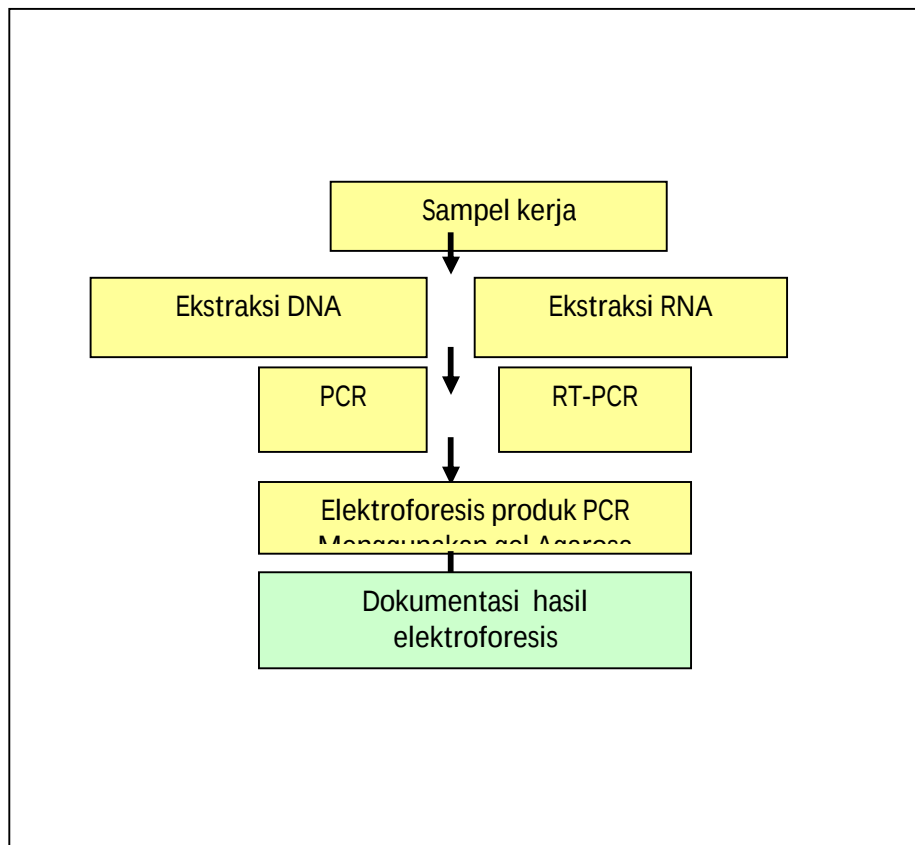
1. 0,1 g jaringan tanaman yang terinfeksi digerus bersama dengan 1 ml TBS 1X pH7,5 (2,42 g Tris base dan 8,76 g NaCl dalam 1000 ml dH₂O).
2. Sap dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit.
3. 3 ul supernatan ditetaskan pada membran nitroselulosa dan dikeringanginkan. Semua tahapan pekerjaan dilakukan pada suhu ruang.
4. Membran nitroselulosa direndam dalam 10 ml larutan bloking dan diinkubasi selama 60 menit sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm.
5. Membran dicuci dengan aquadest. Tiap pencucian berlangsung 5 menit pada shaker berkecepatan 50 rpm.

6. Membran dicuci kembali dengan tris-tween buffer saline (1X TTBS) (0,05 % Tween-20) sebanyak 3 kali, tiap pencucian berlangsung 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.
7. Membran direndam dalam 1X TBS yang mengandung 2% susu *non fat* yang telah mengandung antibodi, dan diinkubasi semalam pada suhu kamar pada shaker berkecepatan 50 rpm.
8. Membran dicuci 3 kali dengan 1XTTBS, setiap pencucian berlangsung 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.
9. Tambahkan konjugat yang diencerkan dalam 1XTBS yang mengandung 2% susu non fat
10. Inkubasi selama 60 menit pada shaker berkecepatan 50 rpm.
11. Membran dicuci 4 kali dengan 1XTTBS, tiap pencucian berlangsung selama 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.
12. Teteskan 30 ul NBT ke dalam 10 ml AP buffer dan digoyang selama 5 menit. Kemudian ditetaskan 30 ul BCIP ke dalam larutan NBT tersebut sambil tetap digoyang. Membran direndam dalam larutan tersebut sampai terjadi perubahan warna.
13. Inkubasi selama 5 – 10 menit pada inkubator bersuhu 37°C, atau suhu ruang pada kondisi tidak terpapar cahaya. Apabila reaksi positif akan terjadi perubahan warna menjadi ungu.
14. Reaksi dapat dihentikan bila dianggap cukup, dengan membuang larutannya dan diganti dengan aquabidest.

(Palfree dan Elliott 1982)

2.4 Metode Diagnosis Secara Molekuler

Identifikasi patogen penyebab penyakit dilakukan dalam rangka menentukan spesies virus penyebab penyakit yang terbawa oleh media pembawa. Pengelolaan sampel kerja (Media Pembawa) dalam identifikasi virus penyebab menggunakan metode molekuler (Gambar 12 dan 17) akan memudahkan Petugas Karantina melakukan tindakan pengujian di laboratorium.



Gambar 12. Alur kerja identifikasi virus penyebab dengan metode molekuler
Bila diperlukan dapat dilakukan sekuensing sebagai konfirmasi

Catatan :

2.4.1 *Polymerase chain reaction (PCR)*

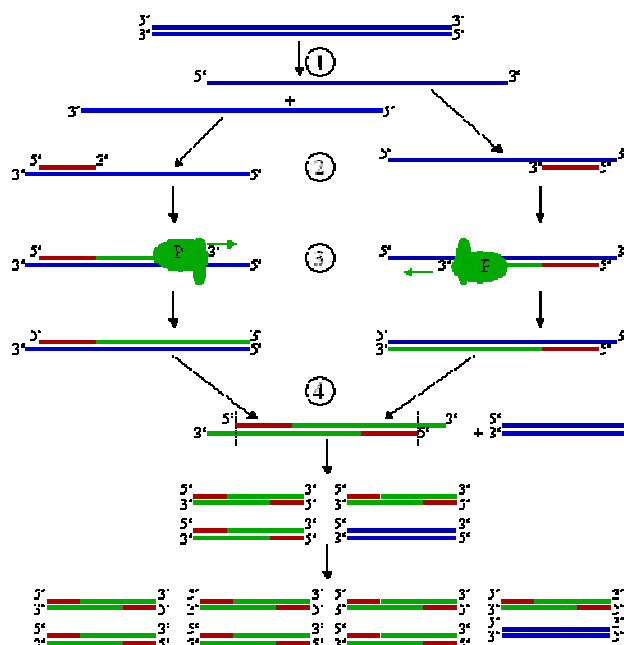
Polymerase chain reaction (PCR) merupakan sebuah metode yang digunakan untuk memperbanyak suatu fragmen DNA yang spesifik secara *invitro*. Posisi fragmen DNA yang spesifik tersebut ditentukan oleh sepasang primer yang akan menjadi cetakan awal untuk proses perbanyakan fragmen DNA selanjutnya dengan bantuan enzim polimerase dan deoxyribonucleotide triphosphate (dNTPs) yang dikondisikan pada suhu tertentu. Fragmen DNA, yang pada awalnya terdapat dalam konsentrasi yang sangat rendah akan diperbanyak menjadi cetakan fragmen DNA baru yang cukup untuk dapat divisualisasi pada gel agarosa . Secara prinsip, PCR merupakan proses yang diulang-ulang antara 20–30 kali. Setiap siklus terdiri dari tiga tahap. Berikut adalah tiga tahap bekerjanya PCR dalam satu siklus (Gambar 13):

1. Tahap **peleburan** (*melting*) atau **denaturasi**. Pada tahap ini (berlangsung pada suhu tinggi, 94–96°C) ikatan hidrogen [DNA](#) terputus (denaturasi) dan DNA menjadi berberkas tunggal. Biasanya pada tahap awal PCR tahap ini dilakukan agak lama (sampai 5 menit) untuk memastikan semua berkas DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan

DNA tidak stabil dan siap menjadi templat ("patokan") bagi primer. Durasi tahap ini 1–2 menit.

2. Tahap **penempelan** atau **annealing**. Primer menempel pada bagian DNA templat yang komplementer urutan basanya. Ini dilakukan pada suhu antara 45–60°C. Penempelan ini bersifat spesifik. Suhu yang tidak tepat menyebabkan tidak terjadinya penempelan atau primer menempel di sembarang tempat. Durasi tahap ini 1–2 menit.
3. Tahap **permanjangan** atau **elongasi**. Suhu untuk proses ini tergantung dari jenis DNA-polimerase (P pada gambar) yang dipakai. Dengan [Taq-polimerase](#), proses ini biasanya dilakukan pada suhu 76°C. Durasi tahap ini biasanya 1 menit.

Pada denaturasi awal (1) Dna akan dipisah menjadi untai tunggal. Kemudian primer melekat pada posisi target dari masing-masing untai DNA (2) pada saat annealing. Setelah itu taq polimerase melakukan ekstensi DNA dari ujung 3' primer pada tahap ekstensi. Lepas tahap 3, siklus diulang kembali mulai tahap 1. Tahap 4 pada gambar menunjukkan perkembangan yang terjadi pada siklus-siklus selanjutnya. Akibat denaturasi dan renaturasi, beberapa berkas baru (berwarna hijau) menjadi templat bagi primer lain. Akhirnya terdapat berkas DNA yang panjangnya dibatasi oleh primer yang dipakai dalam jumlah yang melimpah karena penambahan terjadi secara eksponensial.



Gambar 13. Tahapan pada proses penggandaan pita DNA

Ekstraksi DNA

Instruksi kerja Metode Dellaporta (Dellaporta *et al.* 1983):

1. Gerus 0,1 g jaringan tanaman menggunakan mortar dan pistil di dalam nitrogen cair. Lalu tambahkan 500 µl buffer ekstrak Dellaporta (lampiran 3) ke dalam mortar atau tabung lalu homogenkan dengan pestle. Untuk sampel yang dihomogenkan di dalam mortar masukkan ekstraksi jaringan tanaman ke dalam tabung 1,5 ml.
2. Tambahkan 33 µl 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) (w/v) dan vortex lalu inkubasi campuran pada suhu 65°C selama 10 menit.
3. Tambahkan 160 µl 5M potassium acetate (KoAc) dan vortex.
4. Sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm
5. Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru, tanpa terambil sisa endapan di dasar tabung.
6. Tambahkan 1 volume Phenol, chloroform, isoamylalcohol (PCI) dengan perbandingan 25:24:1 (sebagai contoh untuk 500 µl supernatan yang berhasil terambil dari tahap sebelumnya ditambahkan 500 µl PCI), vortex dengan kecepatan tinggi, dan sentrifuge pada 10.000 rpm selama 5 menit.
7. Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru lalu tambahkan 1 volume isopropanol, bolak balik tabung hingga beberapa kali, lalu sentrifuge 14.000 rpm 10 menit (atau 12.000 rpm 15 menit)
8. Total DNA akan menempel pada dasar tabung (umumnya berwarna putih namun tergantung jenis jaringan tanaman yang diekstrak), lalu buang isopropanol hingga hanya tersisa pelet di dasar tabung.
9. Cuci pelet dengan alkohol 70%, sentrifuge pada 10.000 rpm selama 5 menit, setelah itu buang cairan yang tersisa dan dikeringanginkan selama 15 menit hingga sisa-sisa ethanol di dalam tabung menguap. Lalu larutkan pelet dalam 50µl air bebas nuklease. Simpan DNA dalam suhu -20°C. **Catatan** : Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C.

Instruksi kerja metode CTAB

1. Siapkan buffer ekstrak (lampiran 3) yang akan digunakan sesuai kebutuhan lalu tambahkan 0,1% 2-ME ke dalam bufer, setelah itu panaskan dalam waterbath suhu 65°C selama lebih kurang 5 menit.
2. Gerus 0,1 g jaringan tanaman dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan pistil hingga menjadi serbuk. Tambahkan bufer ekstrak CTAB sebanyak 700 µl lalu aduk hingga merata.
3. Pindahkan ekstrak jaringan tanaman ke dalam tabung 1,5 ml.
4. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C dalam waterbath

5. Tambahkan 700 µl Chloroform, isoamylalcohol (CI) perbandingan 24:1 dan campur dengan vortex hingga merata, lalu sentrifuge pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit.
6. Setelah sentrifugasi akan terbentuk dua fase cairan pindahkan sebanyak 500 µl fase bagian atas cairan yang berisi DNA ke tabung 1,5 ml baru. Jangan sampai endapan ataupun fase bagian bawah ikut terbawa ke dalam tabung baru. Setelah itu ke dalam masing-masing tabung tambahkan sebanyak 500 µl isopropanol dalam keadaan dingin. Masukkan DNA yang dipresipitasi dengan isopropanol ke dalam freezer pada suhu -20°C selama 1 jam sampai semalam.
7. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit. Lalu buang cairan dalam tabung sehingga hanya tersisa pelet DNA pada dasar tabung (umumnya berwarna putih atau warna lain tergantung pada jenis jaringan tanaman yang diekstrak). Tambahkan 300 µl ethanol 70% dingin, goyangkan tabung dengan jari hingga pelet terlarut dalam ethanol lalu sentrifuge 13.000 rpm selama 5 menit.
8. Buang cairan di dalam tabung sehingga hanya tersisa pelet di dasar tabung, lalu keringkan tabung dalam inkubator suhu 37°C selama lebih kurang 15 menit atau pada suhu ruang selama kurang lebih satu jam hingga ethanol di dalam tabung menguap secara keseluruhan.
9. Larutkan DNA dalam air bebas nuklease. Simpan DNA dalam freezer suhu -20°C.

Instruksi kerja ekstraksi DNA menggunakan kit komersial (Qiagen Dneasy Kit)

1. Timbang jaringan sebanyak 0,1 gram dan lakukan dua kali ulangan,
2. Letakkan sampel uji ke dalam mortar yang telah steril, tuang Nitrogen cair, lalu gerus menggunakan mortil steril hingga seperti serbuk,
3. Tambahkan 400 µl buffer AP1 dan 4 µl RNase A stock solution, kemudian masukkan ke dalam tube 1,5 ml, dan vortex untuk menghomogenkan larutan,
4. Inkubasi selama 10 menit pada penangas air bersuhu 65°C, dan bolak-balik tube setiap 5 menit sekali,
5. Tambahkan 130 µl buffer AP2 kemudian vortex. Inkubasi di dalam refrigerator selama 5 menit,
6. Sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit,
7. Pipet supernatant (fase atas) lalu masukkan ke dalam Mini spin column (warna lila), dan sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit,
8. Pindahkan fraksi yang ada di tabung bawah ke dalam tabung baru (2 ml) tanpa menyertakan pellet yang terbentuk,
9. Tambahkan 1,5 volume buffer AP3/E dan campur dengan menggunakan pipet (dengan cara menghisap dan mengeluarkan campuran menggunakan mikropipet),

10. Ambil 650 ul campuran tersebut, termasuk apabila terdapat endapan yang terbentuk, masukkan ke dalam DNeasy mini spin column (warna putih). Sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Buang cairan yang ada di tabung 2 ml,
11. Ulangi cara ke 11 terhadap sisa campuran, buang tabung berikut cairan yang ada di dalamnya,
12. Letakkan DNeasy mini spin column ke tabung baru (tersedia), tambahkan 500 ul buffer AW, dan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang larutan yang ada di tabung.
13. Tambahkan 500 ul buffer AW ke dalam DNeasy Mini Spin Column, lalu sentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm,
14. Pindahkan DNeasy Mini Spin Column ke tabung baru 1,5 ml, tambahkan 50 ul sd 100 ul buffer AE (sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan) dan masukkan langsung ke DNeasy membrane, inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, lalu sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm,
15. Simpan pada rak tube pada refrigerator bersuhu - 20°C.

Protokol ekstraksi RNA

Berbeda dengan DNA, RNA memiliki sifat yang tidak stabil (mudah terdegradasi). Oleh karena itu, beberapa hal harus diperhatikan sebelum memulai ekstraksi RNA, diantaranya:

- Gunakan selalu sarung tangan pada saat melakukan ekstraksi RNA untuk menghindari terjadinya kontaminasi RNase dari permukaan kulit kita.
- Usahakan bekerja pada tempat yang terpisah dengan tempat kita melakukan ekstraksi DNA, dan bila memungkinkan gunakan pula alat yang berbeda.
- Gunakan selalu air bebas RNase untuk setiap bufer yang digunakan, atau perlakuan dengan *Diethylpyrocarbonate* (DEPC)
- Proses ekstraksi dilakukan dalam keadaan dingin

Instruksi kerja ekstraksi Metode Willey (Albrechtsen, 2006)

1. Sampel jaringan tanaman sebanyak 0,1 g digerus menggunakan nitrogen cair dalam mortar dan pestle, lalu ditambahkan 500 µl bufer ekstrak masukkan ke dalam tabung, kemudian ke dalam tabung tambahkan 500 µl fenol/kloroform/isoamilalkohol (PCI). Setelah itu larutan dicampur hingga homogen menggunakan vortex. Untuk sampel benih terlebih dahulu gerus sampel benih minimal 1.000 benih (sesuai kebutuhan) dengan nitrogen cair atau alat penggerus biji lalu ambil benih yang telah menjadi serbuk sebanyak 0,1 g, masukkan ke dalam tabung 1,5 ml tambahkan 500 µl bufer ekstrak dan 500 µl PCI (50:50:1) dan divortex pada kecepatan tinggi selama 1 menit.

2. Ekstrak jaringan tanaman kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000xg. Setelah sentrifugasi akan terbentuk dua fase cairan. Pisahkan cairan fase atas (supernatan), kemudian tambahkan chloroform/isoamylalkohol (50:1) sebanyak 1 volume supernatan, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 13.000 xg selama 1 menit.
3. Tambahkan 1 volume isopropanol ke dalam supernatan, lalu diinkubasi pada suhu -20°C selama 3 jam sampai satu malam atau pada suhu -80°C selama 30 menit.
4. Sentrifugasi 13.000 xg selama 3 menit, hingga terbentuk pelet. Pelet diresuspensi dengan penambahan 500 µl ethanol 70% kemudian diinkubasi di es selama 20 menit. Setelah sentrifugasi selama 3 menit pada kecepatan 13.000 xg pelet dikeringanginkan, kemudian dilarutkan dalam 50 µl air bebas RNase.

Instruksi kerja ekstraksi RNA menggunakan kit komersial (Qiagen Rneasy Plant Mini Kit

1. Timbang 0.01 gr bagian sampel uji.
2. Masukkan sampel dalam mortar dan gerus hingga halus dengan Nitrogen cair. Masukkan sampel yang telah dihaluskan kedalam tabung berukuran 2 ml.
3. Tambahkan 450 µl Buffer RLT atau RLC kedalam tabung dan divortex.
4. Ambil larutan dengan menggunakan pipet dan masukkan kedalam *QIAshredder spin column* (warna ungu) yang telah dimasukkan dalam tabung, sentrifugasi pada 15000 rpm selama 2 menit. Tuang supernatan ke dalam tabung steril ukuran 2 ml.
5. Tambahkan 0.5 volume etanol 96-100% (kurang lebih 225 µl) ke dalam larutan, kemudian resuspensi larutan dengan pipet agar homogen. *Catatan* : Untuk resuspensi disarankan untuk tidak disentrifugasi.
6. Tuang larutan ($\pm$ 650 µl) kedalam *RNeasy mini column (pink)* yang telah dimasukkan dalam tabung berukuran 2 ml. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 8000 x g atau 10000 rpm. Buang larutan. *Catatan* : gunakan kembali tabung pada tahap berikutnya (langkah g).
7. Tambahkan 700 µl Buffer RW1 ke dalam *RNeasy column*. Tutup tabung, dan sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 8000 xg atau 10000 rpm. Buang larutan dan tabung 2 ml.
8. Pindahkan *RNeasy column* kedalam tabung 2 ml baru. Pipet 500 µl Buffer RPE ke dalam *RNeasy column*. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 8000 xg atau 10000 rpm untuk mencuci column. Buang larutan. *Catatan* : Gunakan kembali tube untuk tahap berikutnya (langkah i).
9. Tambahkan 500 µl Buffer RPE kedalam *RNeasy column*. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 8000 xg atau 10000 rpm untuk mengeringkan *RNeasy silica-gel membrane*.

10. **Pilihan** : Letakkan *RNeasy column* kedalam tabung baru ukuran 2 ml dan buang tabung dan larutan yang telah digunakan pada tahap sebelumnya. Sentrifuge pada kecepatan maksimum selama 1 menit. *Catatan* : kecepatan sentrifuge maksimum 1 menit.
11. Untuk elusi, transfer *RNeasy column* ke dalam tabung ukuran 1.5 ml. Pipet 30-50 μ l *RNeasy free water* secara langsung kedalam *RNeasy silica-gel membran*. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 8000 xg atau 10000 rpm untuk elusi.
12. Bila RNA hasil ekstraksi > 20 μ g, ulangi tahap elusi (langkah j) untuk mengencerkan RNA menggunakan *RNase-free water*. Elusi dilakukan pada tube yang sama. Apabila ingin mendapatkan RNA dalam konsentrasi tinggi maka elusi RNA hanya cukup dilakukan satu kali (hanya sampai langkah 11).

Protokol PCR

Setelah ekstraksi DNA, maka dilakukan PCR menggunakan DNA hasil ekstraksi sebagai cetakan. Sebelum memulai tahapan PCR bersihkan terlebih dahulu meja kerja yang akan digunakan untuk pencampuran komponen PCR dalam tabung PCR dengan alkohol 70%. Untuk pencampuran di dalam laminar air flow atau biosafety cabinet, dilakukan prosedur yang sama namun sebelum memulai lakukan sterilisasi dengan UV selama 30 menit. Proses pencampuran komponen PCR sebaiknya dilakukan diatas es untuk menjaga suhu agar tetap dingin.

Pada saat melakukan metode PCR, pengendalian terhadap kondisi yang berjalan selama proses pencampuran hingga berjalannya reaksi PCR perlu dilakukan. Hal tersebut dapat dilakukan dengan melakukan PCR dalam tabung yang terpisah menggunakan cetakan air bebas nuklease dan tanaman sehat untuk kontrol negatif, serta DNA OPT/OPTK target sebagai kontrol positif. Apabila tidak ada cetakan DNA OPT/OPTK target, maka sangat disarankan untuk melakukan konfirmasi hasil pengujian PCR menggunakan metode DNA sekuensing.

Komposisi komponen PCR :

Komponen	Kons. dalam Reaksi PCR	Volume utk 1 sampel
10x PCR buffer	1x	2.5 μ l
dNTPs (10 mM)	200 μ M	0.5 μ l
Primer Target F 10 μ M	0.4 μ M	1 μ l
Primer Target R 10 μ M	0.4 μ M	1 μ l
Taq Polymerase 5U/ μ l	1,25 Unit	0.25 μ l
Cetakan DNA	10-100 pg	1-2,5 μ l (maks. 10% dari vol total)
Air bebas nuklease		Disesuaikan hingga 25 μ l
Volume total		25 μl

Keterangan: PCR dilakukan dalam tabung 0,2 atau 0,5 ml tergantung jenis block pada mesin *Thermal cycler* yang digunakan.

PCR menggunakan *mastermix* :

Komponen	Volume
mastermix	12,5 ml
Primer target F	1 µl
Primer target R	1 µl
Cetakan DNA	1-2,5 µl
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 25 µl
Volume total	25 µl

Keterangan : Setelah PCR, analisa hasil PCR ke dalam gel agarosa dapat langsung dilakukan tanpa pencampuran dengan loading dye.

PCR menggunakan *PCR bead* :

Komponen	Volume
Primer target F	1 µl
Primer target R	1 µl
Cetakan DNA	1 – 2,5 µl
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 25 µl
Volume total	25 µl

Keterangan: Sebelum dimulai pencampuran pastikan bead (bola kecil berwarna putih di dasar tabung) dalam keadaan baik (tidak lengket atau mencair).

Setelah proses pencampuran seluruh komponen PCR selesai, campurkan reaksi dengan cara mengetuk-ngetukkan tabung menggunakan jari telunjuk. Lalu sentrifuge cepat (3.000 rpm selama 10 detik) untuk menurunkan cairan yang menempel di dinding tabung. Letakkan tabung PCR di atas block mesin thermal cycler, dan operasikan program PCR sesuai dengan primer target.

Siklus PCR yang umum dipakai untuk amplifikasi DNA adalah:

1. 95°C 5 menit
 2. 95°C 45 detik
 3. 45-65°C 45 detik
 4. 72°C 1 menit
- No 2 sampai 4 diulang sebanyak 35 kali
5. 72°C 10 menit
 6. 10°C tak terhingga

Catatan:

Siklus PCR lihat lampiran

2.4.2 Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Sebagian besar komponen genetik virus tanaman adalah RNA, terutama jenis-jenis viroid yang hanya terdiri dari RNA. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa untuk melipatgandakan DNA dari cetakan yang berupa RNA

maka sebelumnya perlu dilakukan sebuah tahapan sebelum proses pelipatgandaan DNA yaitu transkripsi balik (sintesis cDNA dari RNA). Pada tahap ini cetakan RNA terlebih dahulu dirubah menjadi cDNA (complementary DNA) menggunakan enzim *reverse transcriptase* (RT).

Proses RT-PCR terdapat dua jenis berdasarkan tahap pengerjaannya, yaitu: satu langkah RT-PCR (one step RT-PCR) dan dua langkah RT-PCR (two step RT-PCR)

Protokol Dua langkah RT-PCR

Komposisi komponen untuk reaksi Sintesis cDNA

Berikut adalah komposisi reaksi sintesis cDNA untuk virus dari kelompok Potyvirus dengan enzim RT MMuLV :

Komponen	Vol. untuk 1 reaksi	Konsentrasi
10x Buffer RT	2.5µl	1x
dNTPs (10 mM)	1 µl	200 µM
Oligo d(T)/Primer R 10 µM	2 µl	0,8 µM
Rnase inhibitor 40 unit/µl	1 µl	40 unit
MMuLV RT 200 unit/µl	1 µl	200 unit
Template RNA	3 - 5 µl	
Air bebas Rnase	Sesuaikan hingga volume 20 µl	
Volume total	20 µl	

Inkubasi tabung PCR dalam mesin *Thermal cycler* dengan kondisi sebagai berikut:

- 25° C selama 5 menit,
- 37° C selama 90 menit,
- 70° C selama 15 menit.

Setelah sintesis cDNA lakukan PCR seperti pada prosedur yang dijelaskan sebelumnya, menggunakan cDNA yang didapatkan dari proses sintesis cDNA sebagai cetakan DNA.

Protokol Satu langkah RT-PCR

Komposisi komponen untuk proses RT-PCR menggunakan RT-PCR bead:

Komponen	Volume
Primer target F	1 µl

Primer target R	1 μ l
Cetakan RNA	3-5 μ l
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 50 μ l
Volume total	50 μl

Setelah proses pencampuran selesai masukkan tabung PCR ke dalam mesin *Thermal cycler* lalu lakukan RT-PCR dengan program seperti yang telah direkomendasikan (lihat lembar kerja).

Protokol Immunocapture RT-PCR / IC-RT-PCR (Albrechtsen 2006)

Bahan-Bahan:

- Sampel kerja
- Antibody (IgG) spesifik virus target .
- Coating Buffer (lihat lampiran)
- Washing Buffer (lihat lampiran)
- Extract buffer (lihat lampiran)
- Bahan PCR (mengacu pada protokol PCR dan RT-PCR)

Instruksi kerja:

1. Larutkan antibodi dalam *coating buffer* hingga mencapai konsentrasi 2 μ g IgG/ml. Kemudian masukkan 50 μ l *coating buffer* yang sudah berisi antibodi ke dalam tabung PCR 0,2 atau 0,5 ml (sesuaikan dengan blok PCR).
2. Tutup tabung dan inkubasi selama 2 sampai 3 jam pada suhu 37°C atau satu malam pada suhu 4°C.
3. Selama inkubasi siapkan ekstrak jaringan tanaman dengan menggerus jaringan tanaman dalam *extract buffer* dengan perbandingan 1:5 atau 1:10 pada suhu ruang.
4. Setelah inkubasi selesai, keluarkan *coating buffer* dengan pipet lalu cuci dengan 200 μ l *washing buffer* kemudian sentrifugasi tabung selama 15 detik pada kecepatan 5000 rpm dan keluarkan *washing buffer* dengan pipet.
5. Tambahkan 50 μ l ekstrak sampel tanaman ke dalam tabung, Hal sama dilakukan pula untuk kontrol negatif dan positif pada tabung yang berbeda. Untuk menghindari kontaminasi lakukan tahap tersebut secara berurutan mulai dari kontrol negatif, sampel uji dan terakhir kontrol positif.
6. Tutup tabung dan inkubasi selama 2 sampai 3 jam pada suhu 37°C atau satu malam pada suhu 4°C.

7. Keluarkan ekstrak tanaman menggunakan pipet dan cuci tabung dengan *washing buffer* seperti pada langkah ke-4 sebanyak dua kali. bilas dengan aquabidestilata.
8. Balikkan tabung di atas tissue untuk mengeringkan tabung. Lakukan hal yang sama untuk kontrol positif dan kontrol negatif.
9. Inkubasi tabung dalam *thermal cycler* pada suhu 95°C selama 5 menit
10. Pindahkan tabung ke dalam wadah yang berisi es atau freezer bersuhu -20°C selama 5 menit. Hal ini bertujuan untuk melepaskan materi RNA virus.
11. Tabung PCR tersebut selanjutnya digunakan untuk proses RT-PCR.

Catatan: Bila tidak tersedia kontrol positif untuk reaksi PCR dapat digunakan primer untuk deteksi kontrol internal DNA/ RNA. Cara ini dilakukan juga untuk tujuan melihat reaksi PCR berjalan dengan semestinya. Penggunaan primer kontrol internal ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (RubiscoL) dilaporkan telah berhasil digunakan dalam proses deteksi OPTK pada singkong (Alabi *et al* 2008), kelapa sawit dan padi (BBUSKP 2009). Primer kontrol internal dapat digunakan secara duplex PCR (Tabel 1).

Tabel 1. Sekuens primer kontrol internal

Jenis kontrol internal	Kode primer	Sekuens primer (5'-3')	Ukuran (bp)
DNA/RNA	RBCL-F535	CTT TCC AAG GCC CGC CTC A	171
	RBCL-R705	CAT CAT CTT TGG TAA AAT CAA GTC CA	
RNA	nad5f	GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT	181
	nad5r	CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA	

Dupleks PCR menggunakan *Ready to go PCR bead* (GE healthcare):

Komponen	Volume	Konsentrasi
Primer target F 10 µM	1 µl	0,4µM
Primer target R 10 µM	1 µl	0,4 µM
Primer RBCCF 10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Primer RBCCR 10 µM	0,5 µl	0,2 µM
Cetakan DNA	2-3 µl	
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 25 µl	
Volume total	25 µl	

Dupleks satu langkah RT-PCR menggunakan Ready to go RT-PCR bead (GE healthcare):

Komponen	Volume	Konsentrasi
Primer target F 10 µM	1 µl	0,2 µM
Primer target R 10 µM	1 µl	0,2 µM
Primer nad5f 10 µM	0,5 µl	0,1 µM
Primer nad5r 10 µM	0,5 µl	0,1 µM
Cetakan DNA	3-5 µl	
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 50 µl	
Volume total	50 µl	

Visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan gel agarosa

Marker digunakan sebagai penanda ukuran pita DNA dan umumnya tersedia dengan ukuran 50 bp, 100 bp, dan 1 Kb. Pembacaan marker dilakukan sesuai dengan manual yang disertakan bersama produk. Untuk panjang DNA target 200 sampai 1000 bp gunakan marker 100 bp Sedangkan panjang DNA di atas 1000 bp gunakan marker 1 Kb.

Pembuatan Agarose Gel

1. Tentukan konsentrasi *Agarose gel* yang akan digunakan dalam proses elektroforesis (konsentrasi 1% atau 1.5% - 2%).

Penghitungan :

$$\frac{1.5}{100} \times \text{kapasitas cetakan Agarose Gel (ml)} = \dots\dots\dots \text{gr Agarose}$$

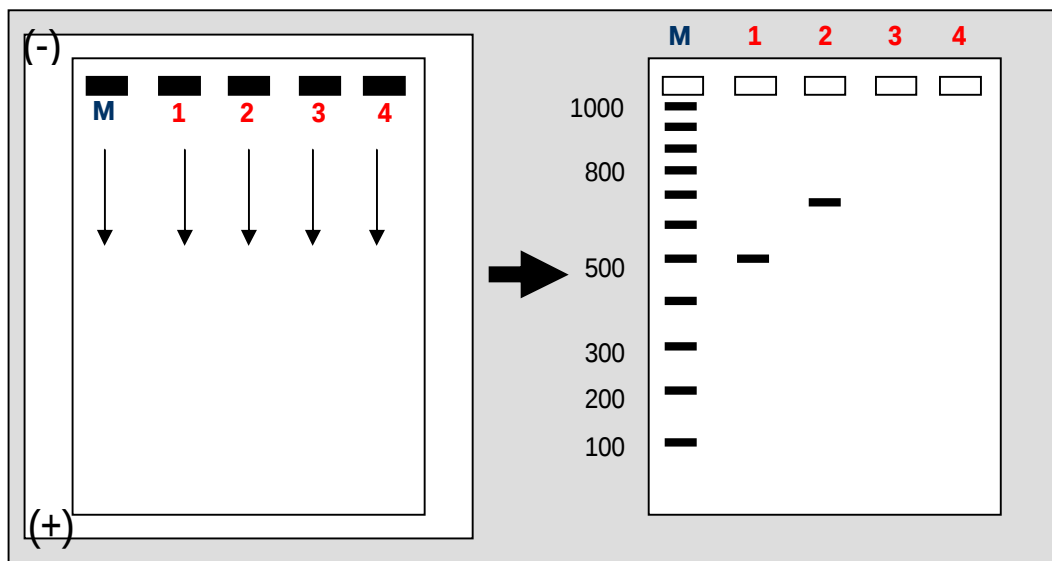
$$\frac{1.5}{100} \times 60 \text{ ml} = 0.9 \text{ gr serbuk Agarose}$$

Catatan : untuk hasil amplifikasi RT-PCR yang berukuran ≥ 1000 bp menggunakan konsentrasi Agarose gel yang kecil yaitu 1%, sedangkan untuk hasil amplifikasi yang berukuran ≤ 1000 bp menggunakan konsentrasi Agarose Gel 1.5% - 2%.

2. Gunakan Buffer TAE 1X atau TBE 1X untuk melarutkan Agarose.

Contoh : untuk konsentrasi Agarose Gel 1.5% pada kapasitas cetakan 60 ml maka larutkan 0.9 gr serbuk Agarose dalam 60 ml larutan Buffer TAE 1X atau TBE 1X.

3. Panaskan larutan Agarose tersebut pada alat pemanas atau Microwave hingga larutan terlihat jernih. Tunggu hingga larutan tersebut hangat- hangat kuku, kemudian tuang larutan dalam cetakan Agarose Gel yang telah dipasang *Comb* (sisir) untuk membuat lubang Gel.
4. Setelah larutan Agarose mengeras, cabut *comb* dari Gel dan masukkan cetakan dalam alat elektroforesis. Tuang Buffer TAE 1X atau TBE 1X kedalam alat elektroforesis hingga Agarose Gel terendam.
5. Siapkan bahan yang akan dielektroforesis (RNA, *Loading dye*, *Marker/Leadder*). Letakkan bahan tersebut diatas es agar kondisi RNA tetap terjaga kualitasnya
6. Siapkan potongan kertas parafilm. Teteskan *Loading dye* ($\pm 2 \mu\text{l}$) diatas kertas parafilm dan teteskan RNA ($\pm 5 - 10 \mu\text{l}$) diatas *Loading dye* kemudian diresuspensi kemudian masukkan kedalam *well* agarose gel.
7. Program alat elektroforesis (75 – 100 Volt, mA : 400, waktu : 30 – 45 menit). Tutup tabung elektroforesis, masukkan kabel hitam dan kabel merah pada lubang yang sesuai.
8. Setelah proses elektroforesis selesai, rendam *Agarose gel* didalam larutan *Ethidium Bromide* selama 30 menit kemudian bilas Agarose gel dengan Aquabidestilata. Selanjutnya lihat Penampakan RNA pada UV dan analisa hasilnya.



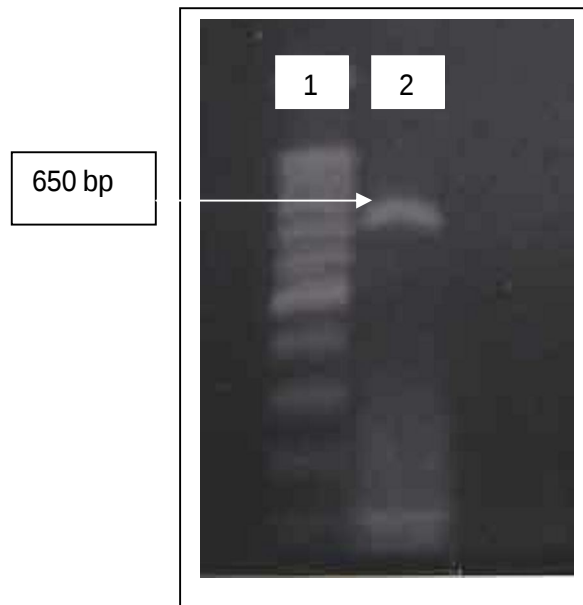
Gambar 14. Urutan pemuatan sampel ke dalam sumur sampel pada proses elektroforesis dari kiri ke kanan, dan pemuatan sampel dimulai dari kutub negatif tabung elektroforesis (kiri).

Setelah proses elektroforesis selesai maka dilakukan pembacaan hasil dengan pewarnaan ethidium bromide di bawah sinar UV dengan melihat ukuran pita disejajarkan dengan ukuran marker (pada contoh ini digunakan marker ukuran 100 bp) dengan angka terkecil dimulai pada bagian bawah gel dan posisi sumur sampel berada di atas (kanan). Keterangan: M= Marker, 1-4 = sampel 1 sampai 4 (BBUSKP 2009).

Pembacaan Hasil PCR/RT-PCR

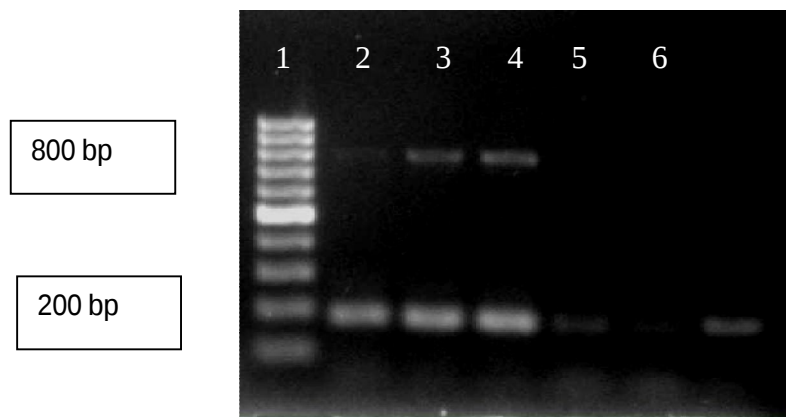
Hasil pengujian menggunakan metode PCR (Gambar 15) dan RT-PCR (Gambar 16) ditentukan berdasarkan panjang produk DNA yang dihasilkan dari proses PCR/ RT-PCR. Panjang produk PCR/ RT-PCR ditentukan dengan mensejajarkan pita DNA target (produk PCR/ RT-PCR) dengan marker yang memiliki skala penanda panjang DNA. Hasil positif ditentukan dari posisi pita DNA yang sesuai dengan panjang produk yang diharapkan.

Pembacaan Hasil PCR :



Gambar 15 . Hasil visualisasi pita DNA BSV sumber inokulum 1) marker 100 bp ; 2) BSV isolat Bogor (Rustiani. 2005).

Pembacaan Hasil RT-PCR :



Gambar 16. Hasil visualisasi *Turnip mosaic virus* (TuMV) pada benih kubis (panjang produk 800 bp) dan primer kontrol internal/nad5 (panjang produk 181 bp). M)Marker 100 bp. 1 sd 3 positif TuMV, sedangkan kolom 4 sampai 6 tidak terdeteksi adanya TuMV (Adiputra 2009).

Permasalahan dalam proses PCR

Beberapa hal teknis perlu diperhatikan agar metode PCR yang kita kerjakan mendapatkan hasil yang optimal. Ketika melakukan proses PCR kemungkinan akan terjadi beberapa permasalahan diantaranya sebagai berikut :

1. Tidak terdapat pita DNA hasil pelipatgandaan menggunakan kontrol positif dan kontrol internal.
2. *Smear* (garis putih terang vertikal) dan pita-pita DNA nonspesifik
3. Pita DNA terlalu tipis.

Beberapa hal dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut diantaranya adalah:

1. Tidak terdapat pita DNA hasil pelipatgandaan menggunakan kontrol positif dan kontrol internal
 - Proses ekstraksi DNA/RNA tidak berhasil mengekstrak DNA/RNA total dari jaringan tanaman. Ulangi proses ekstraksi dari awal. Periksa apakah reagen-reagen yang digunakan dalam keadaan baik (beberapa reagen harus disimpan dalam suhu tertentu). Selain itu kondisi jaringan tanaman dapat berpengaruh terhadap hasil ekstraksi. Usahakan menggunakan jaringan tanaman yang segar. Simpan semua sampel dalam suhu 4°C (untuk jangka waktu beberapa hari) atau -80°C (untuk jangka waktu yang lama). Untuk sampel yang disimpan dalam suhu -80°C harus segera diekstrak setelah dikeluarkan, karena sampel akan membusuk dengan cepat.
 - Periksa kondisi komponen PCR dan primer yang digunakan. Jika perlu gunakan Taq polimerase dari tabung yang baru untuk memastikan bahwa enzim polimerase yang kita gunakan tidak rusak.
 - Suhu anealing yang tidak tepat menyebabkan kontrol positif tidak akan bisa dilipatgandakan. Bila hal tersebut terjadi optimalkan suhu anealing hingga didapatkan suhu yang tepat.
 - Pastikan kondisi mesin PCR yang digunakan masih dalam keadaan baik.
2. *Smear* dan pita-pita DNA nonspesifik
 - Konsentrasi DNA yang terlalu besar akan menyebabkan terjadinya smear, kurangi volume larutan DNA/RNA yang digunakan.
 - Banyaknya kontaminan baik pada saat pencampuran komponen PCR maupun proses ekstraksi DNA/RNA yang berasal dari proses pelipatgandaan

DNA sebelumnya dapat menyebabkan terjadinya pelipatgandaan DNA non spesifik. Gunakan selalu kontrol negatif untuk melihat adanya kontaminan pada reaksi dan pisahkan ruang PCR dengan ruang ekstraksi DNA/RNA.

- Kualitas DNA/RNA yang buruk akan menyebabkan terjadinya proses pelipatgandaan di tempat-tempat lain selain pada target. Ulangi ekstraksi, jika perlu gunakan metode yang lain, untuk mendapatkan kualitas RNA yang lebih baik.
- Periksa apakah primer yang digunakan spesifik untuk target tersebut atau tidak. Hal tersebut dapat dilakukan dengan melakukan PCR ulang menggunakan primer yang sama melihat adanya DNA-DNA non spesifik pada proses sebelumnya atau melakukan PCR menggunakan kontrol tanaman sehat. Selain itu untuk memastikan apakah primer yang kita gunakan hanya dapat melipatgandakan DNA target apabila berpasangan dapat dilakukan PCR menggunakan masing-masing primer (F dan R) secara terpisah.

3. Pita DNA terlalu tipis

- Tambahkan jumlah cetakkan DNA/RNA
- Tambahkan jumlah siklus yang digunakan. Umumnya penambahan dilakukan sebanyak 5 kali. Contoh: 35 siklus menjadi 40 siklus
- Pastikan ethidium bromide yang digunakan untuk perendaman gel agarosa masih dalam keadaan baik (tetap berwarna violet) atau tambahkan waktu perendaman.
- Buffer TAE1x yang digunakan untuk perendaman gel agarosa dalam tabung elektroforesis sebaiknya diganti setiap lima sampai tujuh kali penggunaan.
- Optimalkan suhu annealing

Hal yang perlu diperhatikan ketika bekerja dengan metode PCR/ RT-PCR:

Selalu gunakan jas laboratorium pada saat bekerja melakukan pengujian.

Ethidium bromide bersifat karsinogenik (dapat menyebabkan kanker, maka semua pekerjaan yang dilakukan dengan ethidium bromide harus dilakukan dengan sangat hati-hati. Semua limbah atau sisa-sisa larutan ethidium bromide harus dipisahkan dari sampah lainnya dan diberi perlakuan sebelum dimusnahkan atau dibuang di tempat yang telah direkomendasikan.

Phenol dapat menyebabkan luka bakar. Bekerja dengan Phenol harus dilakukan dengan sangat hati-hati dan menggunakan pengaman yang baik (sarung tangan dan masker).

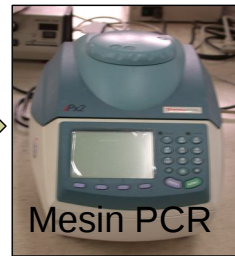
Beberapa bahan seperti Phenol, chloroform, dan 2-Mercaptoethanol memiliki bau yang sangat menyengat, beracun dan dapat mempengaruhi kesehatan manusia. Gunakan sarung tangan, dan masker. Penanganan bahan-bahan tersebut sebaiknya dilakukan di dalam lemari asam.



Mesin Isolasi
DNA / RNA

atau

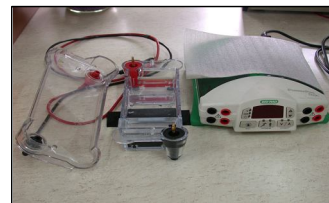
Kit
Ekstraksi
komersial



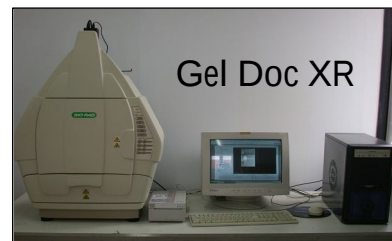
Mesin PCR



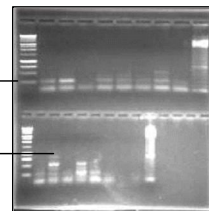
elektroforesis



Dokumentasi hasil elektroforesis



250 bp



Hasil visualisasi DNA

Gambar 17. Alur prosedur metode PCR (BUSKT 2005)

III. Matrikulasi Metode Diagnosis

3.1 MATRIKS DIAGNOSIS VIRUS TANAMAN OPTK KATEGORI A1

NO	NAMA ILMIAH/ NAMA UMUM/SINONIMI/ SCIENTIFIC NAME/COMMON NAME/SYNONIM	INANG/ HOST	MEDIA PEMBAWA/ CARRIER	PG	TI	DIBA	ELISA	PCR	RT PCR
1.	Cassava mosaic bigeminivirus Sin: African cassava mosaic disease, cassava African mosaic bigeminivirus, Indian cassava mosaic disease	(P): <i>Manihot esculenta</i> (ubi kayu, cassava), jarak (S): <i>Jatropha</i> sp.	batang (stem), umbi akar (tuber root)	√				√	
2.	Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV) Sin: alfalfa virus 1 & 2, lucerne mosaic virus, Marmor medicaginis, potato calico virus	(P): <i>Medicago sativa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), Cucurbitaceae, <i>Apium graveolens</i> var. rapaceum, <i>Apium graveolens</i> (seladeri, celery), <i>Cicer arietinum</i> , <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper, chili, red pepper), <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean), <i>Lactuca sativa</i> , <i>Vigna</i> sp. (kacang panjang, cowpea), <i>Vigna radiata</i> , <i>Trifolium incarnatum</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Viburnum opulus</i> (S): <i>Pisum sativum</i> , <i>Cajanus cajan</i> (kacang gude), <i>Cercis siliquastrum</i> , <i>Coriandum sativum</i> (tumar, coriander),	Semua bagian tanaman (all parts of plant), benih (seed) Vector: : <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Myzus persicae</i>	√	√	√	√		√

		<i>Cyphomandra betacea</i> , <i>Eutrema wasabi</i> , <i>Euonymus japonicus</i> , <i>Hibiscus cannabinus</i> , <i>Lavandula latifolia</i> , <i>Pelargonium</i> , <i>Vigna angularis</i> , <i>Solanum melongena</i> , <i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vinca minor</i> , <i>Vitis vinifera</i>							
3.	Potato black ringspot nepovirus (PBRSV) SIN: potato calico strain of tobacco ringspot virus, Andean potato calico strain of tobacco ringspot virus, Andean potato calico strains nepovirus	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato) (S): <i>Arracacia xanthorrhiza</i> , <i>Oxalis tuberosa</i>	umbi (tuber), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
4.	Andean potato latent tymovirus (APLV) Sin: Eggplant mosaic tymovirus, Andean potato latent str, Eggplant mosaic virus (Andean potato latent str.), potato (Andean) latent virus, Potato Andean latent tymovirus, Potato Andean latent virus	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), <i>Ullucus tuberosus</i> (ulluco)	umbi (tuber), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
5.	Andean potato mottle comovirus (APMoV) Sin: potato Andean mottle comovirus, potato Andean mottle virus	(P): <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper, chili, red pepper), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato) (S): <i>Gomphrena globosa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Physalis peruviana</i> , <i>Amaranthus hybridus</i> (bayam, spinach), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco)	umbi (tuber), tanaman (plant)	√	√	√	√	√	
6.	Apple chat fruit Sin: Apple chat fruit MLO	(P): <i>Malus domestica</i> (apel, apple), <i>Malus</i> spp.	mata tunas (eye bud), batang (stem), tanaman (plant), akar (root)						

7.	Apple mosaic ilarvirus Sin: European plumline pattern virus, Mountain ash variegation virus, Birch line pattern virus, Birch ringspot virus, Dutch plum line pattern virus, Hop A virus, Horse chestnut yellow mosaic virus, Rose mosaic virus, Hop virus A, Hop virus C, Mild apple mosaic virus, Severe apple mosaic virus	(P): <i>Betula</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Fragaria</i> , <i>Humulus lupulus</i> , <i>Malus domesticum</i> (apel, apple), <i>Prunus</i> , <i>Prunus americana</i> (aprikot, apricot), <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus dulcis</i> (almon, almond), <i>Ribes rubrum</i> , <i>Rubus</i> spp. (raspberry, blackberry, black raspberry) (S): <i>Prunus domesticum</i> (plam, plum), <i>Prunus persica</i> (peach)	buah (fruit), bunga (flower/inflorescence), akar (root), batang (stem)	√	√	√	√		√
8.	Apple Stem Grooving capillovirus (ASGV) Sin: apple topworking disease, Citrange stunt virus, <i>Citrus tatter leaf virus</i> , Virginia crab apple decline, Apple latent virus type 2, brown line virus disease, Cheno-podium dark green epi-nasty virus, Apple dark green epinasty virus, Apple E36 virus, Virginia crab batang (stem) grooving virus, Apple brown line virus	(P): <i>Citrus</i> , <i>Lilium</i> , <i>Malus pumila</i> , <i>Malus sylvestris</i> , <i>Malus toringo</i> , <i>Prunus mume</i> , <i>Prunus armeniaca</i> , <i>Pyrus communis</i> , <i>Pyrus pyrifolia</i> , (S): <i>Aronia melanocarpa</i> , <i>Cotoneaster bullatus</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Prunus avium</i> , <i>Pyronia veitchii</i> , <i>Sorbus aucuparia</i> , <i>Malus</i> sp, <i>Malus microMalus</i>	tanaman (plant)	√	√	√	√		√
9.	Apple stem pitting foveavirus (ASPV) Sin: apple Spy 227 epinasty & decline, pear stony pit, quince sooty ringspot, pear vein yellows, pear red mottle	(P): <i>Malus pumila</i> , <i>Pyrus communis</i> (S): <i>Crataegus monogyna</i> , <i>Cydonia oblonga</i> , <i>Malus sylvestris</i> , <i>Malus toringo</i> , <i>Pyronia veitchii</i> , <i>Sorbus discolor</i> .	tanaman (plant)	√	√	√	√		√
10.	Cherry rasp leaf nepovirus (CRLV) Sin: Apple flat apple virus, Flat apple virus	(P): <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus cerasus</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus mahaleb</i> , <i>Malus domesticum</i> (apel, apple) (S): <i>Rubus</i> spp. (raspberry)	tanaman (plant)	√	√				√
11.	Apple fruit crinkle viroid (AFCVd) Sin: apple green crinkle disease, apple green crinkle	(P) <i>Malus domesticum</i> (apel, apple)	tanaman (plant)	√	√				√

12.	Arabis mosaic nepo-virus (ArMV) Sin: ash ring and line pattern virus, hop nettlehead virus, raspberry yellow dwarf virus, rhubarb mosaic virus, forsythia yellow net virus, jasmine yellow blotch virus, Rhubarb-Mosaic-Virus (rhubarb mosaic virus)	(P): <i>Anagallis arvensis</i>, <i>Apium graveolens</i> var. <i>dulce</i>, <i>Armoracia rusticana</i>, <i>Asparagus officinalis</i> (asparagus, asparagus), <i>Astilbe</i> sp., <i>Bellis perennis</i>, <i>Beta vulgaris</i> (bit), <i>Buxus sempervirens</i>, <i>Capsella bursa-pastoris</i>, <i>Carum segetum</i>, <i>Chamaecyparis lawsoniana</i>, <i>Cucumis sativus</i>, <i>Cucurbita pepo</i>, <i>Cyphomandra betacea</i>, <i>Daphne mezereum</i>, <i>Daucus carota</i>, <i>Dianthus caryophyllus</i>, <i>Forsythia intermedia</i>, <i>Fragaria vesca</i>, <i>Fraxinus excelsior</i>, <i>Humulus lupulus</i>, <i>Jasminum officinale</i>, <i>Lactuca sativa</i>, <i>Lamium amplexicaule</i>, <i>Ligustrum vulgare</i>, <i>Melilotus officinalis</i>, <i>Mentha arvensis</i>, <i>Narsisus</i> sp., <i>Phaseolus coccineus</i>, <i>Plantago lanceolata</i>, <i>Polygonum aviculare</i>, <i>P. persicaria</i>, <i>Prunus avium</i>, <i>P.domestica</i>, <i>P.persica</i>, <i>Ranunculus repens</i>, <i>Rheum rhaponticum</i>, <i>Rheum hybridum</i>, <i>Ribes</i> sp., <i>Rosa</i> spp., <i>Rubus idaeus</i>, <i>R. procerus</i>, <i>Sambucus nigra</i>, <i>Senecio vulgaris</i>, <i>Solanum nigrum</i>, <i>Stellaria media</i>, <i>Syringa vulgaris</i>, <i>Taraxacum officinale</i>, <i>Trifolium repens</i>, <i>Tulipa</i> spp., <i>Urtica dioica</i>, <i>U. urens</i>, <i>Vitis vinifera</i>, <i>Trifolium repens</i>, <i>Vitis vinifera</i>. (S): <i>Alstroemeria</i>, <i>Fragaria</i>, <i>Fraxinus</i>, <i>Hordeum vulgare</i>, <i>Narsisus</i>, <i>Ribes nigrum</i>, <i>Rubus</i>	tanaman (plant), benih (seed) Vector: : <i>Xiphinema diversicaudatum</i> , <i>X. maderense</i> , <i>X. coxi</i> ,	√	√	√	√		√
-----	--	---	---	---	---	---	---	--	---

13.	Arracacha virus B (AVB) Sin: Arracacha B 'nepovirus', Arracacha B nepovirus (oca strain) Arracacha virus B (oca strain)	(P): <i>Arracacia xanthorrhiza</i> , <i>Oxalis tuberosa</i> (oca), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato) (S): <i>Brassica campestris</i> ssp.rapa, <i>Vigna</i> spp. (kacang panjang, cowpea), <i>Capsicum annuum</i> , <i>Hyoscyamus niger</i>	umbi (tuber), daun (leaf), suluran (stolon), benih (seed)	√	√	√	√		√
14.	Artichoke Italian latent nepovirus (AILV)	(P): <i>Cynara scolymus</i> (S): <i>Cichorium intybus</i> , <i>Gladiolus</i> hybrids, <i>Pelargonium zonale</i> hybrids, <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine) Vektor: <i>Longidorus apulus</i>	Daun (leaf), suluran (stolon), batang (stem) Vektor: <i>Longidorus apulus</i>	√	√	√	√		√
15.	Asparagus virus 2 ilarvirus (AV2) Sin: Asparagus virus II, Asparagus 2 ilarvirus, Asparagus virus C, Asparagus latent virus	(P) <i>Asparagus officinalis</i> (asparagus, asparagus)	pollen, benih (seed), suluran (stolon)	√	√				√
16.	Tobacco streak ilarvirus (TSV) Sin: Asparagus stunt virus, Asparagus stunt virus, <i>Datura quercina</i> virus, New logan virus, <i>Nicotiana</i> virus 8, <i>Nicotiana</i> virus vulnerans, strawberry necrotic shock virus, tractus orae, Black raspberry latent ilarvirus, Black raspberry latent virus, Bean red node strain, Black raspberry latent strain	(P): <i>Vigna</i> spp. (kacang panjang, cowpea), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper, chilies, red pepper), <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean), <i>Fragaria</i> , <i>Asparagus officinalis</i> (asparagus, asparagus), <i>Cynara scolymus</i> , <i>Gossypium herbaceum</i> , <i>Helianthus annuus</i> (bunga matahari, sunflower), <i>Lactuca sativa</i> (letus, lettuce), <i>Medicago sativa</i> , <i>Vigna</i> sp. (kacang panjang, cowpea), <i>Vigna angularis</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Rubus</i> sp. (black raspberry), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), <i>Trifolium pratense</i> (S): <i>Carica papaya</i> (pepaya, pawpaw), <i>Cichorium endivia</i> , <i>Cicer arietinum</i> , <i>Cucumis sativus</i>	buah (fruit), bunga (flower/inflorescence), daun (leaf), tunas (bud), akar (root), batang (stem), benih (seed)	√	√	√	√		√

		(mentimun, cucumber), <i>Cyphomandra betacea</i> , Dahlia, <i>Eustoma grandiflorum</i> , <i>Gladiolus hybrids</i> , <i>Melilotus alba</i> , raspberry, <i>Rubus ursinus</i> , <i>Trigonella foenumgraecum</i>							
17.	Avocado sun-blotch avsunviroid (ASBVd) Sin: avocado sunblotch virus, sunblotch viroid (avocado)	(P): <i>Persea americana</i> (alpokat, avocado) (S): <i>Cinnamomum cam-phora</i> , <i>Cinnamomum zeylanicum</i> , <i>Ocotea bullata</i> ,	kulit (bark), buah (fruit), bunga (flower/inflorescence), daun (leaf), suluran (stolon), batang (stem), benih (seed)	√	√				√
18.	Barley stripe mosaic hordeivirus (BSMV) Sin: barley false stripe virus, barley mosaic virus, oat stripe mosaic virus, barley mild stripe virus, barley yellow stripe (possibly)	(P): <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat) (S): Poaceae, <i>Secale cereale</i> (rye), <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum), <i>Panicum</i> spp. (millet)	polen, benih/biji (seed/grain), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
19.	Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) Sin: barley yellow dwarf luteoviruses; maize leaf fleck virus; wheat cereal yellow dwarf virus; cereal yellow dwarf virus; rice giallume virus; <i>Hordeum virus nanescens</i> ; red leaf disease of barley	(P): <i>Avena sativa</i> (oats), <i>Hordeum vulgare</i> (barley), <i>Lolium multiflorum</i> (Italian ryegrass), <i>Lolium perenne</i> (perennial ryegrass), <i>Oryza sativa</i> (rice), Poaceae (grasses), <i>Secale cereale</i> (rye), <i>Triticum aestivum</i> (wheat), <i>Triticum turgidum</i> (durum wheat), <i>Zea mays</i> (maize) (S): <i>Agrostis stolonifera</i> (creeping bentgrass), <i>Arrhenatherum elatius</i> (false oatgrass), <i>Bromus</i> (brome-grasses), <i>Bromus catharticus</i> (prairiegrass), <i>Elymus repens</i> (quackgrass), <i>Eragrostis curvula</i> (weeping lovegrass), <i>Festuca</i> (fescues), <i>Leersia oryzoides</i> (Rice cutgrass), <i>Miscanthus sinensis</i> (Eulalia),	Benih (seed), semua bagian tanaman (all part of plant)	√	√	√	√		√

		<i>Pennisetum clandestinum</i> (kikuyu grass), <i>Phleum pratense</i> (timothy), <i>Phragmites</i> (reed), <i>Saccharum officinarum</i> (sugarcane), <i>Setaria italica</i> (foxtail millet), <i>Sorghum bicolor</i> (sorghum), <i>Trifolium repens</i> (white clover), <i>Zea</i>							
20.	Bean pod mottle comovirus (BPMV) Sin: pod mottle virus, desmodium virus	(P): <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean), Fabaceae lain	Benih/biji, tanaman (plant), Vector: : <i>Ceratomyxa trifurcata</i> , <i>Epicala vittata</i> , <i>Diabrotica balteata</i> , <i>D. undecimpunctata</i> , <i>Colaspis flava</i> , <i>C. lata</i>	√	√	√	√		√
21.	Beet curly top curtovirus (BCTV) Sin: Beet curly top geminivirus, Beet curly top hybrigeminivirus, sugarbeet curly top virus, tomato yellow virus, sugar beet curly-leaf virus, sugarbeet virus 1, tomato yellows virus, western yellow blight virus, potato green dwarf virus	P: <i>Beta vulgaris</i> (bit gula, sugar beet), <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper, chilies, red pepper), <i>Vigna</i> sp. (kacang panjang, cowpea), Cucurbitaceae, <i>Beta vulgaris</i> (bit, beetroot), <i>Cucumis sativus</i> (mentimun, cucumber), <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Vigna</i> spp. (buncis, common bean). (S) : <i>Linum usitatissimum</i> (flax), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato)	tanaman (plant), Vector: : <i>Neololium tenellus</i> , <i>N. opacipennis</i>	√	√	√	√	√	
22.	Beet leaf curl rhabdovirus (BLCV) Sin: Beta virus 3, Rubenkräusel-Virus, Rübenkräusel sugar beet leaf crinkle virus, sugar beet leaf curl rhabdo virus, sugar beet virus 3, Beet leaf crinkle virus, sugar beet leaf curl virus	(P): <i>Beta</i> spp. (S) <i>Atriplex</i> , <i>Spinacia</i> , <i>Tetragonia tetragonioides</i>	Daun (leaf), root, batang (stem), tanaman (plant), Vector: : <i>Pesma quadratum</i>	√	√	√	√		√
23.	Carnation mottle carmo Virus (CarMV)	(P): <i>Dianthus caryophyllus</i> , <i>D. barbatus</i> , <i>Begonia</i> spp., <i>Sapo</i>	suluran (stolon), tanaman (plant)	√	√	√	√		√

	Sin: carnation mottle carmovirus	<i>naria officinalis</i> , <i>Daphne odora</i> , <i>D.superbus</i> , <i>Tetragonia tetragonioides</i> , <i>Vaccaria hispanica</i>							
24.	Carnation ringspot virus (CRSV) Sin: carnation ringspot dianthovirus	(P): <i>Dianthus</i> (carnation), <i>Dianthus barbatus</i> (sweet williams), <i>Dianthus caryophyllus</i> (carnation), <i>Malus sylvestris</i> (crab-apple tree), <i>Prunus avium</i> (sweet cherry), <i>Prunus cerasus</i> (sour cherry), <i>Prunus domestica</i> (plum), <i>Pyrus communis</i> (European pear), <i>Prunus salicina</i> (Japanese plum), <i>Vitis vinifera</i> (grapevine)	daun (leaf), benih (seed), bibit tanaman (seedling)	√	√	√	√		√
25.	Anyelir necrotic fleck closterovirus (CNFV) Sin: carnation streak virus, carnation yellow fleck virus	(P): <i>Dianthus caryophyllus</i> (S): <i>Dianthus barbatus</i> , <i>D.chinensis</i> , <i>Saponaria vaccaria</i> , <i>Silene armeria</i>	bunga (flower/inflorescence), akar (root), daun (leaf), batang (stem), Vector: : <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphididae</i>	√	√	√	√		√
26.	Cassava brown streak carlavirus (CBSaV) Sin: Cassava brown streak potyvirus, Cassava brown streak-associated (?) carlavirus	(P): <i>Manihot esculenta</i> (ubi kayu, cassava)	tunas (bud), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
27.	African cassava mosaic bigeminivirus (ACMV) Sin: African cassava mosaic virus, Indian cassava mosaic disease, cassava latent virus, cassava mosaic virus,	(P): <i>Manihot esculenta</i> (ubi kayu, cassava), <i>Ricinus</i> spp. (S): <i>Hewittia sublobata</i> , <i>Laportea (=Fluerya) aestuans</i> , <i>Manihot glaziovii</i> , <i>Jatropha</i> sp.	Tanaman (plant), tunas (bud), suluran (stolon)	√	√	√	√	√	
28.	Citrus cachexia viroid Sin: <i>Citrus</i> xyloporosis viroid, <i>Citrus</i> xyloporosis 'virus'	(P): <i>Citrus</i> spp.(jeruk, orange)	tanaman (plant), batang (stem)	√	√				√
29.	Citrus impietratura virus Sin: <i>Citrus</i> impietratura disease	(P): <i>Citrus</i> spp.(jeruk, orange)	bagian tanaman (part of-part of plant) except benih (seed)	√	√				√

30.	Citrus leaf rugose ilarvirus (CiLRV) Sin: Citrus variegation virus, Citrus crinkly leaf ilarvirus, Citrus variegation ilarvirus	(P): <i>Citrus aurantifolia</i> , <i>C. limon</i> , <i>C. paradise</i> (S): <i>Vigna</i> spp. (kacang panjang, cowpea), <i>Vigna unguiculata</i> (kacang tunggak)	tunas (bud), benih (seed)	√	√	√	√		√
31.	Cocoa necrosis nepo virus (CoNV) Sin: Cacao swollen shoot virus - strain S	(P): <i>Theobroma cacao</i> (kakao, cocoa)	akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/inflorescence), buah (fruit), Vector: : <i>Planococcoides njalensis</i> , <i>Ferrisia virgata</i> , <i>Planococcus citri</i> , <i>Longidorus</i> spp.	√	√	√	√		√
32.	Cocoa swollen shoot badnavirus (CSSV) Sin: Cocoa Red Mottle Virus, Cocoa Vein Clearing Virus, cacao virus I, theobroma virus I	(P): <i>Theobroma cacao</i> (kakao, cocoa) (S): <i>Ceiba pentandra</i> (kapuk randu, kapok)	akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/inflorescence), buah (fruit), Vector: : <i>Planococcoides njalensis</i> , <i>P. citri</i> , <i>Phenacoccus hargreavesi</i> , <i>Pseudococcus concavocerrari</i> , <i>Ferrisia virgata</i> , <i>Pseudococcus longisPinus merkusii</i> (tusam, pinetree), <i>Delococcus tafoensis</i> , <i>Paraputo anomlus</i>	√	√	√	√	√	
33.	Cocoa yellow mosaic tymovirus (CYMV)	(P): <i>Theobroma cacao</i> (kakao, cocoa) (S): <i>Cola nitida</i> , <i>Culcasia scandens</i>	akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/inflorescence), buah (fruit)	√	√	√	√		√

34.	Coconut cadang-cadang cocadviroid (CCCVd) Sin: palm cadang-cadang viroid	(P): <i>Cocos nucifera</i> (kelapa, coconut), <i>Elaeis guineensis</i> (kelapa sawit, oilpalm), <i>Arenga pinnata</i> , <i>Borassus flabelifer</i> (lontar, palmyra palm), <i>Chloris</i> , <i>Phoenix dactylifera</i> (S): <i>Corypha elata</i> , <i>Livistona rotundifolia</i> , <i>Arecaceae</i> , <i>Pandaceae</i> , <i>Zingiberaceae</i> , <i>Marantaceae</i> (<i>Maranta</i> sp.), <i>Commelinaceae</i>	benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant) Vector: <i>Brevipalpus phoenicis</i>	√	√				√
35.	Coconut Tinangaja viroid (CtiVd)	(P): <i>Cocos nucifera</i> (kelapa, coconut)	benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant)	√	√				√
36.	Coffee ringspot nucleorhabdovirus (CoRSV) Sin: Coffee ringspot habdovirus	(P): <i>Coffea</i> spp. (kopi, coffee)	benih (seed), tanaman (plant)	√	√				√
37.	Coffee Blister Spot Virus	(P): <i>Coffea</i> spp. (kopi, coffee)	benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant)						
38.	Cotton anthocyanosis virus (CAV) Sin: Cotton anthocyanosis (?) luteovirus; cotton small leaf virus	(P): <i>Gossypium barbadens</i> (kapas, Gallini cotton), <i>Gossypium hirsutum</i> (kapas, Bourbon cotton) (S): <i>Abelmoschus esculentus</i> , <i>Hibiscus cannabinus</i> , <i>Sida rhombifolia</i> , <i>S. micrantha</i>	tunas (bud), tanaman (plant), Vector: : <i>Aphis gossypii</i> , <i>Aphididae</i>	√					√
39.	Cotton leaf crumple bigeminivirus (CLCrV) Sin: cotton leaf crumple bigeminivirus	(P): <i>Gossypium barbadens</i> (kapas, cotton), <i>Vigna</i> spp. (buncis, cowpea) (S): <i>Abutilon</i> , <i>Althaea</i> , <i>Castanospermum australe</i> , <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean), <i>Gossypium</i> , <i>Hibiscus cannabinus</i> , <i>Malva parviflora</i> , <i>Phaseolus acutifolius</i> , <i>Vigna angularis</i>	tanaman (plant), Vector: : <i>Bemisia tabaci</i>	√	√	√	√	√	
40.	Cotton leaf curl bigeminivirus (CLCuV) Sin: cotton leaf curl bigeminivirus,	(P): <i>Gossypium barbadens</i> (kapas, cotton), <i>Abelmoschus esculentus</i> , <i>Hibiscus cannabinus</i>	tanaman (plant), Vector: : <i>Bemisia tabaci</i>	√	√	√	√	√	

	cotton leaf curl geminivirus	(S): <i>Abelmoschus esculentus</i> , <i>Althea rosae</i> , <i>Corchorus fascicularis</i> , <i>Hibiscus cannabius</i> , <i>H. escu lentus</i> , <i>H. sabdarifa</i> , <i>Malvaviscus arboreus</i> , <i>Sida alba</i>							
41.	Cotton leaf mottle bigeminivirus	(P): <i>Gossypium barbadens</i> (kapas, cotton)	akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/inflorescence), buah (fruit), Vector: : <i>Bemisia tabaci</i>	√	√	√	√	√	
42.	Cowpea chlorotic mottle bromovirus (CCMV) Sin: bean yellow stipple virus, virus del moteado Amarillo, marmor flavopunctum	(P): <i>Vigna</i> spp. (kacang panjang, cowpea), <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean) (S): <i>Arachys hypogaea</i> (kacang tanah, groundnut, peanut), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Beta vulgaris</i> (bit), <i>Cajanus cajan</i> (kacang gude), <i>Cassia occidentalis</i> , <i>C. tora</i>	tanaman (plant) Vector: : <i>Ceratoma ruficornis</i> , <i>C. trifurcata</i> , <i>Diabrotica balteata</i> , <i>D. undecimpunctata</i> , Coleoptera	√	√	√	√		√
43.	Cucumber green mottle mosaic tobamovirus (CGMMV) Sin: bottlegourd Indian mosaic virus, cucum ber green mottle mosaic watermelon strain (W), cucumber virus 2, cucumber virus 3, cucumber virus 4, cucumis virus 2, tobacco mosaic virus watermelon strain-WV	(P): <i>Cucumis sativus</i> (mentimun, cucumber), <i>Citrullus vulgaris</i> (semangka, watermelon), <i>Cucumis melo</i> (melon, melon), <i>Lagenaria siceraria</i> , <i>Momordica charantia</i> (S): <i>Prunus americana</i> (apricot)	benih (seed), akar (root), tanaman (plant), tanah (soil), air (water), pupuk (manure), media tanam (planting medium), Vector: : <i>Raphidopalpa fevicollis</i> , <i>Cuscuta</i> spp.	√	√	√	√		√
44.	Cymbidium ringspot tombusvirus (CyRSV)	(P): Orchidaceae (<i>Cymbidium</i>) (S): <i>Trifolium repens</i> , <i>Vigna unguiculata</i>	tanaman (plant)	√	√	√	√		√
45.	Dendrobium vein necrosis (?) closterovirus (DVNV)	(P): Orchidaceae	tanaman (plant), umbi (corn)	√	√	√	√		√
46.	Grapevine Bulgarian latent nepovirus GBLV Sin: Virus CM112	(P): anggur, <i>Vitis</i> spp.	stek, tanaman, biji	√	√	√	√		√

47.	Grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV) Sin: Hungaryn chrome mosaic virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine) (S): <i>Apium graveolens</i>	kulit (bark of) , batang (stem), daun (leaf), tunas (bud), akar (root), benih (seed)	√	√	√	√		√
48.	Grapevine stem pitting associated closterovirus Sin: grapevine corky bark closterovirus, grapevine batang (stem) pitting disease, grapevine stem pitting virus, grapevine virus A, Legno Riccio (possibly), Rugose wood (possibly), Grapevine corky bark disease	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine)	tunas (bud), suluran (stolon), kulit (bark of) , batang (stem), daun (leaf), tunas (bud), akar (root)., Vector: : Pseudococcidae.	√	√	√	√		√
49.	Grapevine fan leaf nepovirus (GFLV) Sin: Grapevine veinbanding virus, Grapevine yellow mosaic virus, Grapevine arricciamento virus, Grape vine infectious degeneration virus, Grapevine roncet virus, Grapevine urticado virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine) (S): <i>Cucumis sativus</i> , <i>Vigna</i> spp. (buncis, cowpea)	tunas (bud), suluran (stolon), tanaman (plant), benih (seed), Vector: : <i>Xiphinema index</i> , <i>X. Italye</i>	√	√	√	√		√
50.	Grapevine fleck virus (GFKV) Sin: grapevine marbrure virus, grapevine phloem-limited isometric virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine)	Batang (stem), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
51.	Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaV) Sin: grapevine B virus, grapevine leafroll disease, grapevine leaf roll closterovirus, grapevine C virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine)	kulit (bark), akar (root), batang (stem), daun (leaf), Vector: : <i>Pseudococcus longispinus merkusii</i> (tusam, pinetree), <i>P. calceolariae</i> , <i>P. maritimus</i> , <i>P. affinis</i> , <i>P. viburni</i> , <i>Planococcus ficus</i> , <i>P. citri</i> , <i>Heliococcus bohemius</i> , <i>Phenacoccus</i> , <i>Prunus cerasus</i>	√	√	√	√		√

			(ceri, cherry)s, <i>Pulvinaria vitis</i> , <i>Parthenolecanium corni</i> , <i>Neopulvinaria innummerabilis</i> , <i>Pulvinaria vitis</i>						
52.	Grapevine vein necrosis virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine)	tanaman (plant), batang (stem)	√	√	√	√		√
53.	Johsongrass Mosaic Virus Sin: Johnsongrass mosaic potyvirus	(P): <i>Pennisetum glaucum</i> (pearl millet), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane), <i>Sorghum bicolor</i> (sorghum), <i>Sorghum halepense</i> (Johnson grass), <i>Urochloa brizantha</i> (palisadegrass), <i>Zea mays</i> (jagung, maize)	benih (seed), bagian tanaman (all part of plant)	√	√	√	√		√
54.	Maize chlorotic dwarf waikavirus (MCDV) Sin: Maize chlorotic dwarf machlovirus, Maize chlorotic dwarf MCDV group, Maize chlorotic dwarf ribotungrovirus, maize chlorotic dwarf waikavirus, Ohio corn stunt agent	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize) (S): <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum), <i>Setaria</i> spp.	tanaman (plant), Vector: : <i>Amblysellus grex</i> , <i>Dalbulus maidis</i> , <i>Endria inimica</i> , <i>Exitianus exitiosus</i> , <i>Graminella nigrifrons</i> , <i>Graminella sonora</i> , <i>Macrosteles severini</i> , <i>Planicephalus flavo costatus</i> , <i>Stirellus bicolor</i>	√	√	√	√		√
55.	Maize chlorotic mottle machlomovirus (MCMV) Sin: maize mottle virus, Peru corn virus	(P): <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum) (S): <i>Bromus arvensis</i> , <i>Panicum virgatum</i> , <i>Setaria glauca</i> , <i>Zea diploperennis</i>	biji (grain), tanaman (plant) Vector: : <i>Chaetocnema pulicaria</i> , <i>Diabrotica</i> spp., <i>Frankliniella williamsii</i> , <i>Oulema melanopus</i> , <i>Systema frontalis</i>	√	√	√	√		√

56.	Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV) Sin: sorghum red stripe virus; maize mosaic virus; European maize mosaic virus; Indian maize mosaic virus; maize stripe mosaic virus; maize dwarf mosaic potyvirus	(P): <i>Sorghum halepense</i> (Johnson grass), <i>Zea mays</i> (jagung, maize), <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> (sweetcorn) (S): <i>Avena sativa</i> (oats), <i>Panicum miliaceum</i> (millet), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	benih (seed), semua bagian tanaman (all part of plant)	√	√	√	√		√
57.	Maize mosaic nucleorhabdovirus (MMV) Sin: Maize stripe Indian virus, sorghum chlorosis virus, <i>Zea mays</i> virus	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum) (S): <i>Axonopus</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Rottboellia cochin chinensis</i> , <i>Sorghum halepense</i> , <i>Zea mexicana</i>	tanaman (plant), Vector: : <i>Peregrinus maidis</i>	√	√	√	√		√
58.	Maize rayado fino marafivirus (MRFV)	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize)	tanaman (plant), Vector: : <i>Dalbulus maidis</i> , <i>D.elimatus</i> , <i>Baldulus tripsaci</i> , <i>Graminella nigrifrons</i>	√	√	√	√		√
59.	Maize Rough Dwarf fiiivirus (MRDV) Sin: cereal tillering disease reovirus, cereal tillering disease virus	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum), <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley) (S): <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Avena sativa</i> (oat, oats)	tanaman (plant), Vector: : <i>Delphacodes propinqua</i> , <i>Dicranotropis hamata</i> , <i>Laodelphax striatellus</i> , <i>Javasella pellucida</i> , <i>Ribauto delphax notabilis</i> , <i>Sogatella vibix</i>	√	√	√	√		√
60.	Maize streak virus (MSV) Sin: Sereal African streak virus, Maize mottle virus, Maize streak monogeminivirus, maize streak virus A, sugarcane streak virus	(P): <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum), Poaceae (S): Oat, <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley), <i>Secale cereale</i> (rye)	tanaman (plant), Vector: : <i>Cicadulina mbila</i> , <i>C.arachidis</i> , <i>C. bipunctella</i> , <i>C. triangula</i> , <i>C. bimaculata</i> , <i>C. similis</i> , <i>C.latens</i> , <i>C.ghaurii</i> , <i>C.parazeae</i> .	√	√	√	√		√

			<i>Nesoclutha declivata</i>						
61.	Maize stripe tenuivirus (MSpV) Sin: maize chlorotic stripe virus, sorghum chlorosis virus	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum) (S): <i>Avena sativa</i> (oat, oats) , <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley), <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane), <i>Secale cereale</i> (rye)	tanaman (plant), Vector: : <i>Peregrinus maidis</i>	√	√	√	√		√
62.	Maize White Line Mosaic Virus (MWLMV) Sin: Maize dwarf ringspot virus, Maize white line virus	(P): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize)	tanaman (plant)						√
63.	Orchid fleck rhabdovirus (OFV) Sin: dendrobium leaf streak virus, dendrobium virus, probably laelia red leafspot, short orchid rhabdovirus, orchid rhabdovirus, phalae nopsis chlorotic spot virus, phalaenopsis hybrid virus, phalae nopsis virus	(P): Orchidaceae	tanaman (plant)	√	√	√	√		√
64.	Papaya ring spot potyvirus strain W (PRSV) Sin: papaya distortion mosaic virus, papaya leaf distortion virus, papaw distortion ringspot virus, papaw mosaic virus, watermelon mosaic virus 1 (type P), Guadeloupe papaya ringspot, papaya ringspot - type W has been shown to be watermelon mosaic virus 1 potyvirus)	(P): <i>Carica papaya</i> (S): Cucurbitaceae	tanaman (plant), bibit (seedling), buah (fruit), bunga (flower/inflorescence) Vektor: <i>Myzus persicae</i> , <i>Aphis coreopsidis</i> , <i>A. craccivora</i> , <i>A. fabae</i> , <i>A. gossypii</i> , <i>Toxoptera citricida</i>	√	√	√	√		√
65.	Papaya mosaic virus (PapMV) Sin: Argentine plantago potexvirus;	(P): <i>Carica papaya</i> (papaya, papaw)	daun (leaf), bibit tanaman (seedling),	√	√	√	√		√

	Papaya mosaic potexvirus; Babaco yellow mosaic virus; Australian alternanthera potexvirus; Olive vein yellow virus; Portulaca virus; Salvia potexvirus; Trichosanthes virus; Ullucus potexvirus; Boussingaultia mosaic virus; Papaya mild mosaic virus; Pawpaw mild mosaic virus; Argentine plantago virus		bagian tanaman (part of plant)						
66.	Papaya necrosis virus (Papaya droopy necrosis virus (PDNV), papaya apical necrosis virus (PANV))	(P): <i>Carica papaya</i> (papaya, papaw)	tanaman (plant)	√	√				
67.	Pea enation mosaic enamovirus (PEMV) Sin: pea enation mosaic virus-1, pea enation mosaic virus 'group'	(P): <i>Vicia faba</i> (S): <i>Cicer arietinum</i> , <i>Lathyrus odoratus</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Medicago arabica</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Trifolium incarnatum</i> , <i>Vicia sativa</i>	benih (seed), tanaman (plant) Vector: : <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Myzus persicae</i>	√	√	√	√		√
68.	Pea streak carlavirus Sin: Alfalfa latent virus, pea streak carlavirus, pea streak virus, Steinklee virus, Wisconsin pea streak virus	(P): <i>Pisum sativum</i> (kapri, sweet pea), (S): Leguminosae, <i>Medicago sativa</i> , <i>Cicer arietinum</i>	tanaman (plant)	√	√	√	√		√
69.	Peach rosette mosaic nepovirus (PRMV) Sin: grape decline virus, grapevine degeneration virus, rosette mosaic virus	(P): <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine), <i>Prunus persica</i> (S): <i>Vaccinium corymbosum</i> , <i>Rumex crispus</i> , <i>Solanum carolinense</i> , <i>Taraxacum officinale</i>	benih (seed), batang (stem), daun (leaf), buah (fruit), suluran (stolon), tanah (soil), media tanam (planting medium), Vector: : <i>Xiphinema americanum</i> , <i>Longidorus diadecturus</i>	√	√	√	√		√
70.	Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCSV)	(P): <i>Arachis hypogaea</i> (kacang tanah, groundnut, peanut) (S): <i>Canavalia ensiformis</i> , <i>Cyamopsis tetragonoloba</i> , <i>Glycine max</i> ,	tanaman (plant)	√	√	√	√		√

		<i>Vigna</i> sp. (kacang panjang, cowpea), <i>Spinacia oleracea</i> , <i>Vicia faba</i> (kacang babi, broad bean), <i>Vigna radiata</i> <i>Vigna unguiculata</i>							
71.	Peanut clump pecluvirus Sin: peanut clump furovirus, Indian peanut clump virus (IPCV)	(P): <i>Arachys hypogaea</i> (kacang tanah, groundnut, peanut), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Setaria italica</i> (foxtail millet)	Benih/biji (seed/grain), tanaman (plant), Vector: : <i>Polymyxa graminis</i>	√	√	√	√		√
72.	Peanut green mosaic potyvirus Sin: peanut chlorotic mottle virus (PCMV)	(P): <i>Arachys hypogaea</i> (kacang tanah, groundnut, peanut), <i>Vigna</i> sp. (kacang panjang, cowpea), <i>Tetragonia tetragonioides</i>	tanaman (plant), Vector: : <i>Aphis gossypii</i> , <i>Myzus persicae</i>	√	√	√	√		√
73.	Peanut stunt cucumovirus (PSV) Sin: Black locust true mosaic virus, Clover blotch virus, Groundnut stunt virus, Peanut common mosaic virus, Robinia mosaic virus	(P): <i>Arachys hypogaea</i> (kacang tanah, groundnut, peanut), <i>Glycine max</i> (kedelai, soybean), <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), pea, <i>Vigna</i> spp. (buncis, cowpea)	benih (seed), tanaman (plant), Vector: : <i>Aphis craccivora</i> , <i>A. spiraecola</i> , <i>Myzus persicae</i>	√	√	√	√		√
74.	Potato mop-top pomovirus (PMTV) Sin: Potato mop-top furovirus	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato)	umbi (tuber), tanaman (plant) Vector: : <i>Spongospora subterranea</i>	√	√	√	√		√
75.	Potato spindle tuber pospiviroid (PSTV) Sin: Potato spindle viroid, Spindle tuber viroid, Potato gothic virus, tomato bunchy top viroid	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Persea americana</i> (alpokat, avocado) (S): <i>Beta vulgaris</i> var <i>saccharifera</i> (bit gula, sugar beet)	benih (seed), umbi (tuber, polen, tanaman (plant), Vector: : <i>Macrosiphum euphorbiae</i> , <i>Myzus persicae</i>	√	√				√
76.	Potato Vein Yellowing crinivirus (PVYV) Sin: Potato vein-yellowing disease, Potato yellow vein disease	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato)	umbi (tuber), tanaman (plant), Vector: : <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	√	√	√	√		√
77.	Potato T trichovirus (PV-T)	P: <i>Solanum tuberosum</i> (kentang,	umbi (tuber), benih	√	√	√	√		√

	Sin: Potato T capillovirus	potato) S: <i>Oxalis tuberosa</i> , <i>Ullucus tuberosus</i>	(seed), tanaman (plant)						
78.	Potato U Nepovirus (PV-U)	(P): <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Beta vulgaris</i> (bit, beetroot), <i>Cucumis sativus</i> (mentimun, cucumber), <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomat, tomato)	umbi (tuber), benih (seed), Vector: : <i>Longidorus</i> sp.	√	√	√	√		√
79.	Raspberry ring spot nepovirus (RpRSV) Sin: Raspberry Scottish leaf curl virus, Red currant ringspot virus, Red currant ringspot virus	P: <i>Rubus</i> spp. (raspberry), <i>Fragaria vesca</i> (arbei, strawberry), <i>Prunus cerasus</i> (ceri, cherry), <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine), <i>Prunus cerasus</i> (ceri, cherry), <i>Prunus domesticum</i> (plam, plum), <i>Prunus americana</i> (aprikot, apricot), <i>Prunus persica</i> (persik, peach), <i>Fragaria vesca</i> (arbei, strawberry) <i>Ligustrum vulgare</i> , <i>Narsisus pseudonar cissus</i> , <i>Ribes</i> , <i>Weigela</i> S: <i>Daphne</i> , <i>Forsythia</i> , <i>Phlox</i> , <i>Cynara scolymus</i>	benih (seed), pollen, tanaman (plant), Vector: : <i>Longidorus elongatus</i> , L. <i>macrosoma</i>	√	√	√	√		√
80.	Rice Black Streaked Virus (RBSDV) Sin: Rice black-streaked dwarf fiiivirus; Rice black streak virus; Rice streak (dwarf) virus; Black streaked dwarf disease	(P): <i>Avena sativa</i> (oat, oats), <i>Hordeum vulgare</i> (barley), <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Zea mays</i> (jagung, maize) (S): <i>Beckmannia syzigachne</i> (american sloughgrass), <i>Eleusine coracana</i> (finger millet), <i>Festuca arundinacea</i> (reed fescue), <i>Lolium multiflorum</i> (Italian ryegrass), <i>Lolium perenne</i> (perennial ryegrass), <i>Panicum miliaceum</i> (millet), <i>Phleum pratense</i> (timothy), <i>Poa annua</i> (annual meadowgrass), <i>Secale cereale</i> (rye), <i>Setaria italica</i> (foxtail millet),	benih (seed), bagian tanaman (part of plant)	√	√	√	√		√

		<i>Sorghum bicolor</i> (sorghum), <i>Triticum</i> (wheat)							
81.	Rice Dwarf phytoereovirus (RDV) Sin: Rice mosaic virus, Rice stunt, Oryza virus 1	(P): <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy)	tanaman (plant)Vector: : <i>Nephotettix</i> <i>cincticeps</i> , <i>N.</i> <i>nigropictus</i> , <i>Nephotettix</i> spp., <i>Recilia dorsalis</i>	√	√	√	√		√
82.	Rice hoja blanca tenuivirus (RHBV) Sin: Echinochloa hoja blanca virus	(P): <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Avena sativa</i> (oat, oats) (S): <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley), <i>Secale cereale</i> (rye)	tanaman (plant), Vector: : <i>Tagosodes</i> <i>orizicolus</i>	√	√	√	√		√
83.	Rice stripe tenuivirus (RSV)	(P): <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy) (S): <i>Zea mays</i> (jagung, corn, maize), <i>Triticum aestivum</i> (gandum, wheat), <i>Avena sativa</i> (oat, oats) , <i>Hordeum vulgare</i> (barli, barley), <i>Secale cereale</i> (rye)	tanaman (plant), Vector: : <i>Laodelphax</i> <i>striatellus</i> , <i>Terthron</i> <i>albovittatum</i> , <i>Unkanodes</i> <i>sapporona</i> , <i>U.</i> <i>albifascia</i>	√	√	√	√		√
84.	Rice transitory yellowing nucleo rhabdovirus (RTYV)	(P): <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy)	tanaman (plant), Vector: : <i>Nephotettix</i> <i>cincticeps</i> , <i>N.</i> <i>nigropictus</i> , <i>N.</i> <i>virescens</i>	√	√	√	√		√
85.	Rice yellow mottle sobemovirus (RYMV)	(P): <i>Oryza sativa</i> (padi, paddy)	tanaman (plant), Vector: :, <i>Sesselia</i> <i>pusilla</i> , <i>Chaetocnema</i> spp., <i>Dactylispa</i> spp., <i>Diadraspa viridicya</i> nea, <i>Trichispa</i> <i>sericea</i> , <i>Chrysomelidae</i> lain	√	√	√	√		√
86.	Prunus necrotic ringspot ilarvirus (PNRSV) Sin: rose line pattern virus, European plum line pattern virus, hop B virus,	(P): <i>Prunus persica</i> , <i>Prunus</i> <i>cerasus</i> , <i>Prunus persica</i> , <i>Rosa</i> spp. (mawar, rose), <i>Prunus</i> <i>domesticum</i> (plam, plum), <i>Prunus</i>	benih (seed), polen, batang (stem), tanaman (plant)	√	√	√	√		√

	hop C virus, peach ringspot virus, plum line pattern virus, prunus ringspot virus, red currant necrotic ringspot virus, rose chlorotic mottle virus, rose vein banding virus, rose yellow vein mosaic virus, sour cherry necrotic ringspot virus	<i>dulcis</i> (almon, almond), <i>Humulus</i> , <i>Cucumis sativus</i> (ketimun, cucumber)							
87.	Rose streak virus (RSV)	(P): <i>Rosa</i> spp. (mawar, rose)	batang (stem), tanaman (plant)						
88.	Satsuma dwarf orange nepovirus (SDV) Sin: <i>Citrus</i> mosaic virus, Natsudaidai dwarf virus, Navel orange infectious mottling virus, <i>Citrus</i> satsuma dwarf nepovirus, <i>Citrus</i> (navel orange) infectious mottling virus	(P): <i>Citrus</i> spp. (jeruk, orange)	mata tunas (eyebud), benih (seed), tanaman (plant)	√	√	√	√		√
89.	Squash mosaic comovirus (SqMV) Sin: cucurbit ring mosaic virus, muskmelon mosaic como virus, muskmelon necrotic mosaic virus, squash mosaic comovirus, pumpkin mosaic virus, watermelon stunt virus	(P): Cucurbitaceae, <i>Citrullus vulgaris</i> (semangka, watermelon), <i>Cucumis melo</i> (melon), <i>Cucumis sativus</i> (mentimun, cucumber), <i>Cucurbita maxima</i> (waluh, labu parang, pumpkin), <i>C. pepo</i>	benih (seed), tanaman (plant), Vector: : <i>Acalymma trivittata</i> , <i>A. thiemei</i> , <i>Diabrotica undecimpunctata</i> , <i>D. bivitula</i> , <i>Epilachna chrysomelina</i> ; <i>E. paenulata</i>	√	√	√	√		√
90.	Strawberry crinkle virus (SCV) Sin: strawberry crinkle rhabdovirus, strawberry latent virus A, strawberry crinkle cytorhabdovirus, strawberry latent virus B, strawberry latent A, (mild form), strawberry latent A, strawberry latent B, strawberry lesion A, strawberry lesion B, strawberry vein chlorosis	(P): <i>Fragaria</i> (strawberry), <i>Fragaria ananassa</i>	bunga (flower), buah (fruit), bibit tanaman (seedling)	√	√	√	√		√
91.	Strawberry latent C rhabdovirus (SLCV)	(P): <i>Fragaria vesca</i> (arbei, strawberry)	suluran (stolon), Vector: : <i>Chaetosiphon</i>	√	√	√	√		√

			<i>fragaefolii</i>						
92.	Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV) Sin: Strawberry mild yellow edge disease; Strawberry yellow edge; Strawberry mild yellow edge potexvirus; Strawberry mild yellow edge associated virus; Strawberry xanthosis; strawberry virus 2	(P): <i>Fragaria</i> (strawberry), <i>Fragaria ananassa</i> (strawberry), <i>Fragaria chiloensis</i> (Chilean strawberry), <i>Fragaria ovalis</i> , <i>Fragaria vesca</i> (wild strawberry), <i>Fragaria virginiana</i> (scarlet strawberry (UK))	Bunga (flower), buah (fruit), bibit tanaman (seedling)	√	√	√	√		√
93.	Strawberry latent ring spot nepovirus (SLRSV) Sin: <i>Aesculus</i> line pattern virus, rhubarb virus 5	(P): <i>Apium graveolens</i> , <i>Asparagus officinalis</i> (asparagus, asparagus), <i>Fragaria vesca</i> (arbei, strawberry), <i>Lilium</i> , <i>Narsisus</i> , <i>Prunus americana</i> (aprikot, apricot), <i>Prunus avium</i> , <i>Prunus domesticum</i> (plam, plum), <i>Prunus persica</i> (persik, peach), <i>Rheum hybridum</i> , <i>Ribes nigrum</i> , <i>R.rubrum</i> , <i>Rubus fruticosa</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine). (S): <i>Aesculus</i> , <i>Humulus lupulus</i> , <i>Pastinaca sativa</i>	benih (seed), tanaman (plant), Vector: : <i>Xiphinema diversicaudatum</i> , <i>X. coxi</i> , <i>Paralongidorus maximus</i>	√	√	√	√		√
94.	Strawberry vein banding virus (SVBV) Sin: Strawberry veinbanding caulimovirus; Strawberry virus 5	(P): <i>Fragaria vesca</i> (wild strawberry), <i>Fragaria</i> (strawberry), <i>Fragaria ananassa</i> (strawberry)	daun (leaf), bibit tanaman (seedling)	√	√	√	√		√
95.	Sugarcane bacilliform badnavirus (SCBV)	(P): <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	tunas (bud), batang (stem), mata tunas (eye-bud)	√	√	√	√		√
96.	Sugarcane mild mosaic virus (SCMMV)	(P): <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	bagian tanaman (part of plant)	√	√	√	√		√
97.	Sugarcane yellow leaf luteovirus (ScYLV)	(P), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane) (S): <i>S.robustum</i> , <i>S. sinensis</i> , <i>S.spontaneum</i>	batang (stem), suluran (stolon), tanaman (plant), Vector: : <i>Melanaphis sacchari</i> , <i>Rhopalosiphum</i>	√	√	√	√		√

			<i>maidis</i>						
98.	Tomato Aspermy cucumovirus (TAV) Sin: Chrysanthemum aspermy virus, Chrysanthemum mild mottle virus, tomato aspermy cucumovirus, Chrysanthemum mosaic virus, cucumis virus 1, lycopersicon virus 7	(P): <i>Chrysanthemum</i> spp. (krisan, chrysant), aster, <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper, chilies, red pepper), <i>Lycopersicum esculentum</i> (tomat, tomato), Canna sp., Liliun sp., <i>Mentha spicata</i> , <i>Petunia hybrida</i> , <i>Zinnia elegans</i>	benih (seed), tanaman (plant), Vector: : <i>Myzus persicae</i>	√	√	√	√		√
99.	Tomato ringspot virus (ToRSV) Sin: Tomato ringspot nepovirus, Prunus stem pitting virus, blackberry (Himalaya) mosaic virus, Nicotiana 13 virus, Tobacco ringspot virus 2, peach stem pitting virus, prune brown line virus, gravelins yellow vein virus, Red currant mosaic virus, winter peach mosaic virus, apple union necrotic nepovirus	(P) : <i>Fragaria chiloensis</i> (Chilean strawberry), <i>Malus domestica</i> (apple), <i>Nicotiana tabacum</i> (tobacco), Pelargonium (pelargoniums), <i>Prunus</i> (stone fruit), <i>Prunus armeniaca</i> (apricot), <i>Prunus avium</i> (sweet cherry), <i>Prunus cerasus</i> (sour cherry), <i>Prunus domestica</i> (plum), <i>Prunus persica</i> (peach), <i>Prunus salicina</i> (Japanese plum), <i>Ribes</i> (currants), <i>Rubbus</i> (blackberry, Raspberry), <i>Rubbus idaeus</i> (raspberry), <i>Vitis vinifera</i> (grapevine),	benih (seed), tanaman (plant), bagian tanaman (part of plant).	√	√	√	√		√
100.	Agropyron mosaic virus Sin: Agropyron mosaic rymovirus, Agropyron green mosaic virus, Agropyron yellow mosaic virus, Agropyron streak mosaic virus, couch grass streak mosaic virus, wheat virus 2, Marmor agropyri, Agropyron mosaic PV75 severe isolate, Agropyron mosaic PV101 isolate, Agropyron mosaic mild isolate	<i>Elymus repens</i> (quackgrass), <i>Triticum aestivum</i> (wheat), <i>Triticum turgidum</i> (durum wheat)		√	√	√	√		√

Keterangan

PG : Pengenalan gejala

TI : Tanaman indikator, kolom yang berwarna abu-abu menandakan belum ditemukan referensi yang akurat untuk jenis tersebut.

3.2 Matriks Diagnostik Virus Tanaman Optk Kategori A2

NO	NAMA LAMIAH/ ORDO / FAMILI / NAMA UMUM	INANG	MEDIA PEMBAWA	PG	TI	DIBA	ELISA	PCR	RT PCR
1	Banana streak badnavirus	<i>Musa</i> spp. (pisang, banana)	Tanaman and bagian tanaman (plant and part thereof) <i>Musa</i> spp. (pisang, banana)	√	√	√	√	√	
2	Bean Golden mosaic bigeminivirus			√	√	√	√	√	
3.	Sweet potato feathery mottle virus	<i>Ipomoea batatas</i> (ubi jalar, sweet potato)	Benih (seedling of) <i>Ipomoea batatas</i> (ubi jalar, sweet potato)	√	√	√	√		√
4.	Fiji disease phytoereovirus	<i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	Benih tanaman (seedling of) <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	√	√	√	√	√	
5.	Maize dwarf mosaic potyvirus	<i>Zea mays</i> (jagung, corn , maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum), <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane)	Benih (seedling of) <i>Saccharum officinarum</i> (tebu, sugarcane), <i>Zea mays</i> (jagung, corn , maize), <i>Sorghum bicolor</i> (sorgum, sorghum)	√	√	√	√		√
6.	Onion yellow dwarf potyvirus	<i>Allium ascalonicum</i> (bawang merah, shallot)	Benih/umbi (seeds/bulb of): <i>Allium cepa</i> , <i>A. ascalonicum</i> , <i>A. porrum</i> , <i>A. sativum</i>	√	√	√	√		√
7.	Tomato spotted wilt tospovirus TSWV Sin: pineapple yellow spot virus, tomato spotted wilt virus group,	(P): <i>Lycopersicon esculentum</i> (tomat, tomato), <i>Capsicum annuum</i> (paprika, bell-pepper) ,	Stek (stoke), tanaman (plant of) Vektor: <i>Frankliniella bispinosa</i> , <i>F. intonsa</i> ,	√	√	√	√		√

dahlia oakleaf virus, dahlia ringspot virus, dahlia yellow ringspot virus, groundnut ringspot virus, mung bean leaf curl virus	<i>Lactuca sativa</i> (selada, lettuce), <i>Pisum sativum</i> (kapri, sweet pea), <i>Nicotiana tabacum</i> (tembakau, tobacco), <i>Solanum tuberosum</i> (kentang, potato), Solanaceae, <i>Alstroemeria</i>, <i>Ananas comosus</i> (nenas, pineapple), <i>Anemone coronaria</i>, <i>Apium graveolens</i> (selder, celery), <i>Arachis hypogaea</i> (kacang tanah (soil), groundnut, peanut), <i>Aster</i>, <i>Begonia</i>, <i>Bidens pilosa</i>, <i>Benincasa hispida</i>, <i>Calceolaria</i>, <i>Chrysanthemum x morifolium</i>, <i>Carica papaya</i> (papaya, pawpaw), <i>Cichorium endivia</i>, <i>Cicer arietinum</i>, <i>Citrullus lanatus</i> (semangka, watermelon), <i>Columnea hirta</i>, <i>Canavalia gladiata</i>, <i>Capsicum annuum</i> (cabai, hot pepper), <i>Callistephus chinensis</i>, <i>Catharanthus roseus</i>, <i>Cucumis sativus</i> (mentimun, cucumber), <i>Cucurbita pepo</i>, <i>Crotalaria juncea</i>, <i>Cyphomandra betacea</i>, <i>Cynara scolymus</i>, <i>Cyclamen</i>, <i>Dahlia</i>, <i>Dieffenbachia</i>, <i>Eustoma grandiflorum</i>, <i>Ficus elastica</i>, <i>Ficus pumila</i>, <i>Gerbera</i> spp. , <i>Gerbera jamesonii</i>, <i>Galinsoga parviflora</i>, <i>Glycine max</i> (kedele, soybean), <i>Gossypium hirsutum</i> (kapas, cotton), <i>helianthus annuus</i>	<i>F.fusca</i>, <i>F.occidentalis</i>, <i>F. schultzei</i>, <i>F. tenuicornis</i>, <i>Thrips palmi</i>, <i>T. setosus</i>, <i>T. tabaci</i>, <i>T.flavus</i>, <i>Scirtothrips dorsalis</i>						
---	---	---	--	--	--	--	--	--

		(bunga matahari, sunflower), <i>Impatiens walleriana</i> , <i>Jacquemontia tamnifolia</i> , <i>Kalanchoe</i> , <i>Lens culinaris</i> ssp. <i>culinaris</i> (lentil), <i>Lathyrus sativus</i> , <i>Lupinus</i> spp. (Lupine), <i>Mentha</i> <i>piperita</i> , <i>Nicandra</i> <i>physalodes</i> , <i>Nicotiana rustica</i> , <i>Oncidium</i> , <i>Ocimum basilicum</i> , <i>Pelargonium</i> , <i>Petunia</i> <i>hybrida</i> , <i>Phaseolus</i> , <i>Vigna</i> <i>radiata</i> (kacang hijau, mungbean), <i>Vigna mungo</i> , <i>Vigna cylindrica</i> (buncis, common bean), <i>Physalis</i> <i>peruviana</i> , <i>Phalaenopsis</i> , <i>Sechium edule</i> , <i>Senecio</i> <i>cruentus</i> , <i>Stephanotis</i> <i>floribunda</i> , <i>Sinningia</i> , <i>Sinningia speciosa</i> , <i>Solanum</i> <i>melongena</i> (terung, eggplant , aubergine), <i>Tagetes</i> , <i>Tephrosia purpurea</i> , <i>Vicia faba</i> , <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vitis vinifera</i> (anggur, grapevine), <i>Valerianella</i> <i>locusta</i> , <i>Zinnia elegans</i> , <i>Zantedeschia aethiopica</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Calendula officinalis</i> , <i>Canna</i> <i>indica</i> , <i>Coleus</i> , <i>Mirabilis</i> <i>jalapa</i> , <i>Saintpaulia ionantha</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Valeriana</i> <i>officinalis</i>						
--	--	--	--	--	--	--	--	--

Lampiran 1

Lembar Kerja Per OPTK

BADAN KARANTINA PERTANIAN
01-DV-09

Barley stripe mosaic virus

Akronim:

BSMV

Kisaran Inang:

Inang merupakan semua jenis dari famili Gramineae (Atabekov & Novikov 1989)

Taksonomi

Virus Group: Virus

Family: Unassigned virus family

Genus: Hordeivirus

Nama Umum:

Inggris: stripe mosaic of barley

Perancis: mosaïque striée de l'orge

Jerman: Streifenmosaikvirus der Gerste

Status

OPTK Kategori A1 Golongan I Berdasarkan Kepmentan no. 38/tahun 2006

Deteksi di Lapang:

BSMV pada umumnya mengakibatkan abnormalitas pada daun dan seluruh tanaman mengalami pengerdilan. Namun gejala ini tergantung pada strainnya. Gejala bervariasi mulai dari garis-garis kecil sampai memenuhi seluruh daun hingga ke belang-belang elipsoid. Tanaman yang terinfeksi BSMV akan menyebabkan bijinya menjadi lebih kecil dan mengkerut.

Diagnosis dan Identifikasi

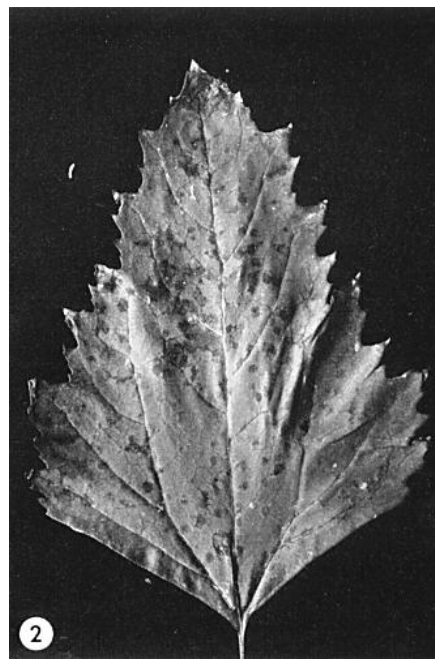
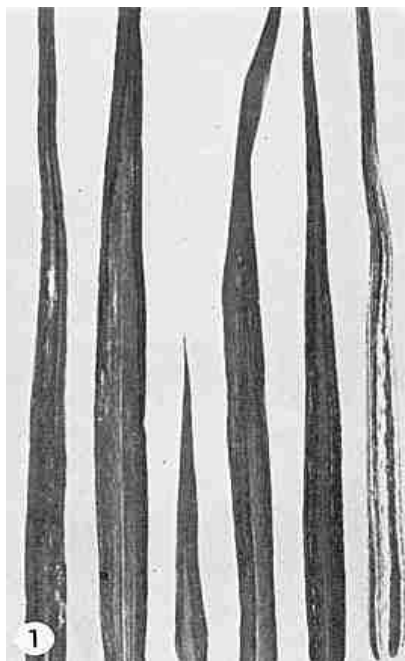
1. Tanaman Indikator

BSMV dapat ditransmisikan secara mekanis pada tanaman indikator. Gejala umumnya muncul pada 10 sampai 14 hari setelah inokulasi dengan sap tanaman yang telah terinfeksi BSMV.

Berikut adalah beberapa jenis tanaman yang dapat digunakan untuk diagnosis (Atabekov & Novikov 1989).

1. *Hordeum vulgare* (barley), *Triticum aestivum* (wheat) and *Avena sativa* (oat): gejala belang mosaik sistemik yang bervariasi
2. *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, *C. album*. Gejala lesio klorotik berwarna kuning dengan ukuran besar
3. *Beta vulgaris* (beet). Gejala lesio klorotik lokal berwarna kuning

Gambar (Atabekov dan Novikov 1989):



2. DAS ELISA

Penyiapan sampel pengujian:

1. Untuk sampel benih, dilakukan penanaman di dalam wadah plastik sebanyak 400 benih tanaman untuk setiap subsampel. Penanaman dilakukan selama 3-7 hari hingga kecambah yang tumbuh telah cukup untuk dilakukan pengujian
2. Untuk sampel tanaman selain benih, seperti daun dapat langsung dilakukan pengujian. Agar pengujian lebih akurat pilih daun dengan perkembangan gejala yang paling baik.

Cara kerja:

DAS ELISA dilakukan seperti protokol yang tertera pada pedoman diagnosis virus tanaman.

3. RT-PCR

Penyiapan sampel

Dikerjakan seperti pada metode DAS ELISA

Ekstraksi RNA

Prosedur ekstraksi RNA dikerjakan seperti pada prosedur ekstraksi RNA tanaman dalam pedoman diagnosis virus tanaman.

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Satu langkah RT-PCR menggunakan Bead RT-PCR

Komposisi komponen RT_PCR menggunakan bead

Komponen	Volume
Primer target F	1 µl
Primer target R	1 µl
Cetakan RNA	3-5 µl
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 50 µl
Volume total	50 µl

Primer yang digunakan berdasarkan Fenwick *et al.* 2009 :

BSMV Gamma F: 5'- GAA GAT GCA GGA GCT GAA ACT TTC-3'

BSMV Gamma R: 5'-TGG TCT TCC CTT GGG GGA CCG AGG-3'

Panjang produk: 400 bp

Program RT-PCR :

1. 42°C 45 menit
 2. 95°C 5 menit
 3. 95°C 30 detik
 4. 55°C 45 detik
 5. 72°C 1 menit
- Ulangi langkah 3-5 sebanyak 26 kali
6. 72°C 10 menit
 7. 10°C tak terhingga

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan sesuai dengan cara kerja yang tertera pada pedoman diagnosis virus tanaman.

Daftar Pustaka

- Atabekov JG, Novikov VK. 1989. Barley stripe mosaic virus Di dalam: Description of Plant viruses. Association of Applied Biologists.
<http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=344>
- CABI. 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford: CAB International.
- Fenwick A, Larson RL, Reeves PA, Hill AL, Panella L. 2009. Efficacy of Barley stripe mosaic virus to induce gene silencing of a gene repressing flowering in sugar beet.
www.ars.usda.gov...Panella%20_Physiology%20-%20Fenwick

BADAN KARANTINA PERTANIAN
02-DV-09

Beet curly top virus

Akronim:

BCTV

Kisaran Inang:

Inang utama:

Apium graveolens (celery), *Beta vulgaris* (beetroot), *Beta vulgaris* var. *saccharifera* (sugarbeet), *Capsicum annuum* (bell pepper), *Capsicum frutescens* (chilli), *Cucumis sativus* (cucumber), *Cucurbitaceae* (cucurbits), *Lycopersicon esculentum* (tomato), *Phaseolus vulgaris* (common bean), *Vigna unguiculata* (cowpea)

Inang lainnya:

Linum usitatissimum (flax), *Nicotiana tabacum* (tobacco), *Solanum tuberosum* (potato)

Inang liar:

Jenis-jenis *Capsicum*

Taksonomi

Family: Geminiviridae

Genus: Curtovirus

Species: Beet curly top virus

Nama Ilmiah lain:

Beet curly top geminivirus

beet curly top hybrigeminivirus

sugarbeet curly top virus

tomato yellow virus

tomato yellows virus

sugarbeet curly-leaf virus

sugarbeet virus 1

western yellow blight virus

potato green dwarf virus

Status

OPTK Kategori A1 Golongan I Berdasarkan Kepmentan no. 38/tahun 2006

Deteksi di Lapang:

Virus ini menyebabkan gejala *bunchy*, dan daun terpelintir. Pada *sugarbeet* gejala yang paling jelas adalah tergulungnya bagian daun ke arah dalam dan gejala clearing dari urat daun muda pada bagian terdalam. Awalnya gejala ini terbatas pada daun-daun termuda tetapi kemudian infeksi mencapai seluruh daun. Selanjutnya gejala seperti kutil tumbuh pada urat daun dari permukaan bawah daun. Daun berwarna gelap, warnahijau kusam, tebal, kering dan rapuh. Pada keadaan tertentu, tetesan bening dan lengket keluar dari petiola, punggung daun bagian tengah, atau urat daun pada permukaan daun bagian bawah dari tanaman yang terinfeksi. Cairan ini selanjutnya menjadi hitam, lengket, kemudian kering menjadi kerak berwarna coklat. Pada tanaman tomat di lapang, terdapat daun yang menggulung ke arah dalam sepanjang ibu tulang daun menyebabkan daun terkulai tetapi tidak layu. Daun-daun kemudian menebal dan kering serta dapat berubah warna menjadi kuning dengan urat daun berwarna ungu. Inti batang mengering menyebabkan batang menjadi berrongga. Ketika gejala pada daun mulai tampak, tanaman mulai terhenti pertumbuhannya dan mengeras. Apabila tanaman tersebut berbuah maka buahnya akan matang secara prematur dan benih gagal terbentuk. Selama itu akar mulai membusuk dimulai dari bagian ujung akar. Tangkai dan daun berwarna coklat dan tanaman akhirnya mati (CABI 2007)

Diagnosis dan Identifikasi

1. Tanaman Indikator

Beberapa jenis tanaman yang digunakan untuk diagnosis (Thomas dan Mink 1979)

Cucumis sativus (cucumber). Semaian yang tumbuh akan mati. Tanaman muda yang tumbuh dewasa akan menjadi kerdil, ruas-ruasnya memendek. Buah-buahan terjadi malformasi.

Nicotiana tabacum (tobacco). Daun-daun muda mengerdil dengan urat daun membengkak dan terdistorsi bagian daunnya tergulung ke bawah, membentuk rosette pada titik tumbuh. Pertumbuhan normal berlanjut setelah beberapa minggu kemudian.

2. RT-PCR

Penyiapan sampel pengujian:

4. Untuk sampel benih, dilakukan penanaman di dalam wadah plastik sebanyak 400 benih tanaman untuk setiap subsampel. Penanaman dilakukan selama 3-7 hari hingga kecambah yang tumbuh telah cukup untuk dilakukan pengujian
5. Untuk sampel tanaman selain benih, seperti daun dapat langsung dilakukan pengujian. Agar pengujian lebih akurat pilih daun dengan perkembangan gejala yang paling baik

6. Untuk sampel umbi kentang ambil bagian stolon dan tunasnya.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan protokol ekstraksi DNA pada pedoman diagnosis virus tanaman.

Polymerase Chain Reaction

PCR dilakukan menggunakan ready to go PCR bead dengan komposisi sebagai berikut:

Komponen	Volume
Primer target F	1 µl
Primer target R	1 µl
Cetakan DNA	2-3 µl
Air bebas nuklease	Sesuaikan volume hingga 25 µl
Volume total	25 µl

Primer (Strausbaugh 2008) yang digunakan sebagai berikut

BCTV-C12097F 5'- TGCTCCAATAAGGTGCTTCCAGTG-3'

BCTV-C22387R 5'-TTTCCTCTGTCCTCATTACAAACG-3'

Panjang produk: 469 bp

Program PCR :

1. 95°C 5 menit

2. 95°C 30 detik

3. 54°C 45 detik

4. 72°C 1 menit

Ulangi langkah 3-5 sebanyak 29 kali

5. 72°C 10 menit

6. 10°C tak terhingga

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan sesuai dengan cara kerja yang tertera pada pedoman diagnosis virus tanaman.

Daftar Pustaka

CABI. 2007. Crop Protection Compendium. Wallingford: CAB International.

Strausbaugh, C. A., Wintermantel, W. M., Gillen, A. M., and Eujayl, I. A. 2008. Curly top survey in the western United States. *Phytopathology* 98:1212-1217.

Thomas PE. Mink GI. 1979. Beet curly top virus. Di dalam: Description of Plant viruses. Association of Applied Biologists. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=210>

Lampiran 2

Jenis dan Kondisi Tanaman Indikator

Kondisi tanaman yang digunakan sebagai tanaman uji (tanaman indikator)

Spesies/ kultivar	Umur tanaman (hari)	Stage of development
<i>Beta vulgaris</i>	20-25	2
<i>Brassica pekinensis</i>	20-25	4-5
<i>Capsicum annuum</i>	35	3
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	28	3-well developed
<i>Chenopodium quinoa</i>	28	4-well developed
<i>Crotalaria juncea</i>	8	Kotiledon
<i>Cucumis sativus</i>	10	Kotiledon
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	10	Kotiledon + first undivided
<i>Datura stramonium</i>	22	2-well developed
<i>Glycine max</i>	14	Kotiledon + 1
<i>Gomphrena globosa</i>	40-50	2-3 pasang
<i>Helianthus annuus</i>	16	1 pasang
<i>Lycopersicon esculentum</i>	21-28	2-3
<i>Nicotiana benthamiana</i>	35	3 well-developed
<i>Nicotiana clevelandii</i>	35	5-6
<i>Nicotiana glutinosa</i>	35	2 well-developed
<i>Nicotiana occidentalis-37 B</i>	30	5
<i>Nicotiana rustica</i>	30	1 well-developed

Lampiran 3

Bahan Pengujian untuk Metode ELISA dan PCR

Komposisi dan cara pembuatan buffer Direct DAS ELISA (protokol Agdia)

PBST-Tween (PBST)

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades.

8.0 g NaCl

1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.2 g KH_2PO_4

0.2 g KCl

0.5 g Tween-20

Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4

Coating Buffer

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades

1.59 g Na_2CO_3

2.93 g NaHCO_3

0.2 g NaN_3

Atur derajat keasamannya hingga pH 9.6, simpan pada suhu 4°C

Ekstrak Buffer

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml PBST

1.3 g Na_2SO_3

20.0 g PVP MW 24-40.000

0.2 g NaN_3

2.0 g Chicken Albumin, Grade II

20.0 g Tween-20

Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4, simpan pada suhu 4°C

Konjugat/ECI Buffer

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml PBST

2.0 g Bovine Serum Albumin (BSA)

20.0 g PVP MW 24-40.000

0.2 g NaN_3

Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4, simpan pada suhu 4°C

Substrat Buffer

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 800 ml Akuades

0.1 g MgCl_2

0.2 g NaN_3

97.0 ml Diethanolamine

Atur derajat keasamannya sampai dengan pH 7.4 menggunakan larutan HCl, kemudian tambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml, simpan pada suhu 4°C.

Komposisi dan cara pembuatan buffer Indirect ELISA (protokol Adgen)

Coating Buffer (Carbonate Buffer)

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades

1.59 g Na_2CO_3

2.93 g NaHCO_3

Atur derajat keasamannya hingga pH 9.6, simpan pada suhu 4°C

PBS

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades.

8.0 g NaCl

1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0.2 g KH_2PO_4

0.2 g KCl

Atur derajat keasamannya hingga pH 7.2

PBST-Tween (PBST)

1.0 l PBS

0.5 g Tween-20

Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4

Blocking Buffer

5 g non fat dried milk powder

100 ml PBST

Ab Dilution Buffer/ Conjugate Buffer

0.2 g Bovine Serum Albumin (BSA)

100 ml PBST

Substrat Buffer

Larutkan garam-garam berikut ini dalam 800 ml Akuades

0.1 g MgCl_2

97.0 ml Diethanolamine

Atur derajat keasamannya sampai dengan pH 9.8 menggunakan larutan HCl, kemudian tambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml, simpan pada suhu 4°C.

Komposisi dan cara pembuatan buffer DIBA

TBS (5X)

Untuk 1000 ml:

12,1 g Tris base

43,8 g NaCl

Tambahkan 800 ml dH₂O, ukur pH 7,5, kemudian tambahkan dH₂O hingga 1000 ml.

Blocking solution

Untuk 100 ml

2 g non fat milk

2 g Triton X-100

100 ml TBS 1X

Substrat solution

75 mg NBT (Nitro blue tetrazolium) dialutkan dalam N, N-dimethylformamide (DMF), sehingga konsentrasinya 75 mg/ ml.

50 mg BCIP (Bromo chloro indolyl phosphate) dialutkan dalam N, N-dimethylformamide (DMF), sehingga konsentrasinya 50 mg/ml.

AP Buffer

0,1 M Tris-HCl

0,1 M NaCl

5 mM MgCl₂

Ukur pH hingga 9,5

Stop Solution

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

Ukur pH hingga 7,5

Bahan- bahan yang dibutuhkan PCR

1. Metode Dellaporta

Buffer ekstrak Dellaporta

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 100 ml
Tris base	100 mM pH.8	1,21 g
EDTA	50 mM	1,861 g
NaCl	500 mM	2,92 g

Larutkan semua bahan dalam akuades 100 ml. Setelah melarutkan Tris, sesuaikan pHnya dengan HCl dan NaOH hingga pH 8. Sterilisasi bufer dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Tambahkan 1% (v/v) 2-mercaptoethanol (2-ME) ke dalam bufer yang akan digunakan (2-ME harus digunakan dalam keadaan segar).

Buffer TE

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 100 ml
Tris base	10 mM pH.8	0,1211 g
EDTA	1 mM	0,0372 g

Sterilisasi larutan menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit

2. Metode CTAB

Bufer ekstrak CTAB

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 100 ml
CTAB	2%	2 g
NaCl	1,4 M	8,1816 g
Tris	100 mM	1,211 g
EDTA	20 mM	0,7444 g
Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)	1%	1.0 g

Larutkan dalam 80 ml akuades steril. Atur pH larutan hingga 8.0 lalu tambahkan akuades steril hingga mencapai volume 100 ml.

3. Metode Willey

Akuades dengan perlakuan DEPC

Tambahkan DEPC ke dalam akuades steril (lebih baik digunakan aquabidestilata) dengan konsentrasi 0,1% (v/v) dan inkubasi larutan pada suhu 37°C selama 1 jam, kemudian disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

Larutan stok EDTA 0,5 M pH 8,0

Larutkan 18,61 g EDTA ke dalam 80 ml akuades (atau aquabidestilata) steril atur pH menggunakan NaOH hingga mencapai angka 8,0. Lalu sesuaikan volume hingga 100 ml, aduk hingga rata. Setelah itu tambahkan DEPC sebanyak 100 µl (0,1%) dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, untuk kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan stok EDTA ini selanjutnya digunakan untuk membuat bufer-bufer berikutnya.

Buffer ekstraksi Willey

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 100 ml
Tris HCl	50 mM pH.8,5	0,787 g
EDTA 0,5M	10 mM	10 ml
NaCl	200 mM	1,168 g

Larutkan semua bahan dalam 80 ml air yang sudah diberi perlakuan DEPC. Setelah semua bahan terlarut sesuaikan volume hingga 100 ml. Bufer tidak diberi perlakuan DEPC. Sterilisasi buffer pada suhu 121°C selama 15 menit.

4. Immunocapture RT-PCR

Coating buffer

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 200 ml
Na ₂ CO ₃	15 mM	0,318 g
NaHCO ₃	35 mM	0,588 g
NaN ₃	3 mM	0,039 g

Setelah dilarutkan dalam akuades steril atur pHnya menjadi 9,6.

Extract buffer

Bahan	Konsentrasi	Jumlah untuk 200 ml
Tris HCl	20 mM	0,6302 g
NaCl	138 mM	1,613 g
PVP-40	1 mM	0,008 g
Tween-20	0,05%	100 µl
KCl	3 mM	0,044 g
NaN ₃	3 mM	0,039 g

Larutkan dalam akuades steril. Disarankan menggunakan air bebas RNase (air dengan perlakuan DEPC).

Washing buffer (PBS-Tween)

Cara pembuatan Washing buffer untuk IC-RT-PCR sama dengan cara pembuatan washing buffer untuk ELISA.

5. Buffer untuk elektroforesis

50xTAE stock (1x= 40 mM Tris base, 40 mM acetic acid, 1 mM EDTA)

Bahan	Volume
Akuades steril	500 ml
Tris base	242.0 g
Glacial acetic acid	57.1 ml
EDTA	18.61 g

Sesuaikan akuades steril hingga volume larutan mencapai 1 liter lalu sterilisasi larutan dengan autoclave, dan disimpan pada suhu ruang.

5x TBE stock (1x= 89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)

Bahan	Volume
Akuades steril	500 ml
Tris base	54 g
Boric acid	27,5
EDTA	3,72 g

Sesuaikan akuades steril hingga volume larutan mencapai 1 liter lalu sterilisasi larutan dengan autoclave, dan disimpan pada suhu ruang.

Setelah didapatkan larutan stock encerkan hingga konsentrasi 1x sebagai larutan yang akan digunakan untuk bekerja.

Lampiran 4

Alat-alat Pengujian untuk Metode ELISA dan PCR

Gambar Alat-alat untuk pengujian Virus Tanaman :



1. Vortex



2. PH Meter



3. Vortex



4. Alat-alat gelas



5. Mikropipet & tips



6. Mikropipet untuk 5 ml



7. ELISA Washer



8. Mikroplate



9.ELISA Reader



10. Sentrifuge



11. Medicoool



12. Mesin PCR



13. Tabung Nitrogen



14. Elektroforesis tank



15. Microwave



16. Mesin Fast PCR



17. Refrigerator -20C



18. Biosafety Cabinet



19. Gel Documentation



20. Refrigerator -80C



21. Timbangan analitik



22. Autoclave



23. Laminar Air Flow



24. Bath Tub