

DETEKSI CMV DAN PYMoV PADA BENIH LADA (*Piper nigrum*) DENGAN TEKNIK ELISA

Detection of CMV and PYMoV on black pepper seedlings (Piper nigrum) using ELISA technique

Maya Mariana dan Miftakhurohmah

Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3 Bogor 16111
Telp 0251-8321879 Faks 0251-8327010
balittro@litbang.pertanian.go.id
maya.marliana@gmail.com

(diterima 10 Juni 2016, direvisi 08 Agustus 2016, disetujui 14 Oktober 2016)

ABSTRAK

Salah satu kendala penting pada budidaya tanaman lada yaitu penyakit kerdil yang disebabkan oleh *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) dan *Cucumber mosaic virus* (CMV). Tindakan pencegahan penyebaran penyakit dapat dilakukan salah satunya dengan penggunaan benih sehat bebas dari infeksi PYMoV dan CMV. Tujuan penelitian adalah mendeteksi keberadaan PYMoV dan CMV pada benih lada siap tanam secara serologi menggunakan teknik ELISA. Benih lada yang dideteksi berumur 5 bulan, berasal dari penangkar benih di Sukabumi (Jawa Barat) dan Purbalingga (Jawa Tengah). Varietas lada yang diambil di Sukabumi adalah Natar 1, Petaling, dan Lampung Daun Kecil., masing-masing sebanyak 10 sampel, sedangkan di Purbalingga hanya ada Natar 1, diambil 30 sampel. Di setiap lokasi pembibitan juga dilakukan pengamatan terhadap gejala infeksi virus yang ditemukan. Deteksi virus dilakukan secara *Double Antibody Sandwich* (DAS)-ELISA menggunakan antiserum *Banana streak virus* (BSV) untuk PYMoV dan antiserum CMV untuk deteksi CMV. Hasil ELISA dibaca nilai absorbansinya dengan elisa reader pada panjang gelombang 405 nm. Sampel dinilai positif, jika nilai absorbansinya 1,5 kali lebih besar daripada kontrol negatif. Gejala infeksi virus pada benih bervariasi, yaitu klorotik, belang, dan belang disertai perubahan bentuk daun. Hasil pengujian ELISA menunjukkan bahwa 66% benih lada dari Sukabumi dan 46% dari Purbalingga terinfeksi virus CMV. Namun, tidak ada satu pun yang menunjukkan reaksi positif terhadap antiserum PYMoV. Hal ini diduga karena konsentrasi PYMoV terlalu rendah sehingga tidak terdeteksi secara ELISA. Untuk mencegah penyebaran virus, deteksi virus pada benih lada penting dilakukan sebelum digunakan sebagai bahan tanaman.

Kata kunci: *Piper nigrum*, ELISA, virus

ABSTRACT

One important problem on the cultivation of black pepper plants is dwarf disease caused by *Piper yellow mottle virus* (PYMoV) and *Cucumber mosaic virus* (CMV). The purpose of this research was to detect the presence of CMV and PYMoV in black pepper seedlings ready for planting by serological test using ELISA method. Detection of viruses was performed on 5 months old of black pepper seedlings, were obtained from Sukabumi (West Java) and Purbalingga (Central Java) nurseries. The varieties were collected from Sukabumi i.e. Natar 1, Petaling and Lampung Daun Kecil, while from Purbalingga only Natar 1. Observation of the viruses symptoms also carried out in each nursery. Viruses detection were performed by *Double Antibody Sandwich* (DAS) -ELISA technique using antiserum *Banana streak virus* (BSV) for PYMoV and CMV antiserum for the detection of CMV. The absorbance value of ELISA results was read by ELISA reader at a wavelength of 405 nm. The symptoms of virus infection on black pepper seedlings were varied such as chlorotic, mottle and mottle accompanied with leaf malformation. ELISA test results showed that 66% of the black pepper seedlings from Sukabumi and 46% from Purbalingga were infected with CMV. However, none of the samples showed the positive reaction to PYMoV antiserum. This suggested that the concentration of PYMoV were still too low, hence it was not detected by ELISA. To prevent the virus spread, the viruses detection on black pepper seeds as plant material is important.

Key words: *Piper nigrum*, ELISA, virus

PENDAHULUAN

Lada merupakan salah satu tanaman rempah penghasil devisa negara. Saat ini, Indonesia berada di urutan kedua di dunia sebagai negara penghasil lada terbesar setelah Vietnam. Beberapa provinsi penghasil lada di Indonesia adalah NAD, Jambi, Kalimantan Barat, Kalimantan Timur, Lampung, Nusa Tenggara Barat, Sulawesi Selatan, Sulawesi Tenggara, Sumatera Selatan, Sumatera Utara, Bangka Belitung, dan DI Yogyakarta. Salah satu daerah yang saat ini juga sedang mengembangkan lada yaitu Kabupaten Purbalingga (Jawa Tengah) dengan luas lahan 456 ha (Sukanto 2014).

Produktivitas lada nasional masih banyak mengalami kendala yang disebabkan berbagai faktor, di antaranya adalah penyakit kerdil yang disebabkan oleh PYMoV (*Piper yellow mosaic virus*) dan CMV (*Cucumber mosaic virus*). Di Indonesia penyakit kerdil telah dilaporkan sejak tahun 1987 (Firdausil 1992). Menurut Balfas *et al.* (2002), penyebab penyakit kerdil adalah virus dengan partikel berbentuk batang pendek yang diidentifikasi sebagai PYMoV. Ciri-ciri tanaman lada yang terserang PYMoV menurut Bhat *et al.* (2003) yaitu daun mengalami klorosis, *vein clearing*, terjadi distorsi daun, penurunan vigor tanaman dan jumlah buah dalam dompolan berkurang. Selain PYMoV, CMV juga ditemukan berasosiasi dengan penyakit kerdil lada (Lakani 2006). Karakteristik tanaman yang terserang CMV yaitu daun mengecil, keriting, rapuh, daun mengeras dan terdapat bercak klorotik (Bhat *et al.* 2003). Serangan penyakit ini juga menyebabkan pertumbuhan tanaman lada menjadi terhambat sehingga buah yang terbentuk sedikit dan akibatnya produksi menurun (Sitepu dan Mustika 2000). Penularan virus ini terutama melalui bahan tanaman (setek) dan serangga vektor (Balfas 2009; Bhat *et al.* 2012; de Silva *et al.* 2002). Di Indonesia, serangga vektor virus CMV pada tanaman lada adalah *Aphis gossypii*, sedangkan untuk virus PYMoV serangga vektornya adalah *Planococcus*

minor dan *Ferrisia virgata* (Balfas *et al.* 2007). Perbanyakkan bahan tanaman lada umumnya dengan cara setek. Perbanyakkan dengan setek dapat menyebabkan penyebaran virus lebih luas, apabila bahan tanaman induk yang digunakan telah terinfeksi virus. Sebagian besar petani lada di Indonesia masih menggunakan benih asalan, yaitu benih dengan kualitas rendah. Hal ini dipicu di antaranya karena harga yang tinggi dan terbatasnya ketersediaan benih (Saefudin 2014; Wahyudi dan Wulandari 2015).

Penggunaan benih sehat adalah salah satu dasar budidaya lada agar tanaman dapat tumbuh dan berkembang, serta berproduksi secara optimal (Bhat *et al.* 2016). Oleh karena itu, penggunaan benih sehat dalam budidaya tanaman harus dilakukan, terutama benih bebas dari CMV dan PYMoV (Deeshma dan Bhat 2014). Salah satu cara untuk memastikan apakah benih lada yang akan ditanam bebas dari CMV atau PYMoV, maka dapat digunakan cara deteksi secara serologi (Bhat dan Siljo 2014; Bhat *et al.* 2013). Teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) merupakan salah satu teknik deteksi yang aplikatif dan umum digunakan untuk virus tanaman. Kelebihan metode ELISA antara lain hanya membutuhkan antiserum dalam jumlah sedikit, pengujian dapat dilakukan pada sap kasar tanaman, dapat mendeteksi sampel dalam jumlah banyak dengan lebih cepat, mudah dilakukan bahkan oleh tenaga yang tidak berpengalaman, dan hasilnya dapat dilihat secara kuantitatif dengan menggunakan *ELISA reader* (Boonham *et al.* 2014; Dijkstra dan de Jager 1998). Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi virus CMV dan PYMoV pada benih lada siap tanam di penangkar benih dengan metode ELISA.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium penyakit Kelompok Peneliti (Kelti) Proteksi, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (Balittro), Bogor sejak Mei sampai Juli 2015. Bahan yang digunakan adalah air destilata, bufer ekstraksi, larutan *Phosphate buffered saline tween* (PBST),

antiserum *Banana streak virus* (BSV) dan *Cucumber mosaik virus* (CMV), larutan *buffer conjugate*, larutan *buffer coating*, larutan substrat dan tablet PNP (*p'-nitrophenyl phosphate*).

Pengambilan sampel dan pengamatan gejala infeksi virus

Benih lada yang dianalisa diambil dari dua daerah pembibitan yaitu di Sukabumi (Jawa Barat) dan Purbalingga (Jawa Tengah). Varietas yang digunakan dipilih berdasarkan ketersediaan di daerah pembibitan. Pembibitan di Sukabumi memiliki tiga varietas yaitu Petaling, Natar 1 dan Lampung Daun Kecil, diambil 10 sampel untuk setiap varietas. Sedangkan varietas lada di pembibitan Purbalingga adalah Natar 1, diambil sebanyak 30 sampel. Pengambilan sampel dilakukan secara acak, baik yang bergejala terinfeksi virus maupun tidak bergejala.

Daun tanaman lada yang digunakan diambil dari benih lada yang berumur lebih dari 5 bulan. Bagian daun yang diambil adalah bagian pucuk, daun kedua atau ketiga. Selain pengambilan sampel, juga dilakukan pengamatan dan dokumentasi gejala infeksi virus yang ditemukan.

Deteksi serologi

Deteksi PYMoV dan CMV dilakukan secara *Double Antibody Sandwich* (DAS)-ELISA berdasarkan metode Clark dan Adams (1977) yang dimodifikasi. Deteksi PYMoV menggunakan antiserum *Banana streak virus* (BSV) kit (*Adgen Phyto-diagnostics*). Kontrol positif dan negatif menggunakan produk dari Adgen. Sampel daun ditimbang sebanyak 0,1 g, dimasukkan dalam plastik tebal. Bufer ekstraksi disiapkan sesuai kebutuhan, diencerkan dengan menambahkan aquades steril. Sampel daun dalam plastik ditambah bufer ekstraksi dengan perbandingan 1:5, kemudian digerus. Larutan sampel sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam plate sesuai peta yang telah dibuat, diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-4 jam, atau 18 jam pada suhu 4°C. Bufer konjugat disiapkan sesuai kebutuhan, diencerkan dengan akuades steril dengan perbandingan 1:5. Konjugat

dilarutkan dalam bufer konjugat dengan perbandingan 1:20. Setelah diinkubasi, plate dicuci dengan larutan PBST sebanyak 3-5 kali sampai bersih. Larutan konjugat sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam plate, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah inkubasi, plate dicuci dengan larutan PBST. Larutan pewarna dimasukkan sebanyak 100 µl ke dalam plate, diinkubasi pada ruang gelap selama 30-60 menit atau sampai terjadi perubahan warna menjadi kuning (terutama untuk kontrol positif).

Deteksi CMV menggunakan antiserum CMV, sesuai protokol dari Agdia (Agdia, Inc., Elkhart, USA). Kontrol positif dan negatif menggunakan produk dari Agdia. *Capture antibody* dilarutkan dalam *carbonate coating buffer* sesuai pengenceran yang dianjurkan. Larutan *capture antibody* dipipet sebanyak 100 µl dimasukkan ke dalam plate ELISA, plate dimasukkan ke dalam kotak lembab, dibiarkan selama 4 jam pada suhu ruang atau 18 jam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, plate dicuci dengan larutan PBST, pencucian diulang 2-4 kali. Sampel daun lada 0,1 g dalam plastik, ditambah larutan *general extract buffer* (GEB) sebanyak 500 µl, kemudian digerus. Larutan sampel dipipet sebanyak 100 µl, dimasukkan ke dalam plate ELISA sesuai peta yang telah dibuat, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam, atau 18 jam pada suhu 4°C. Setelah inkubasi, plate dicuci dengan PBST, pencucian diulang 7 kali. Enzim konjugat dari botol A dan B dilarutkan dalam ECI bufer, dengan pengenceran sesuai anjuran. Larutan enzim konjugat dimasukkan ke dalam plate ELISA sebanyak 100 µl, diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang. Selanjutnya plate dicuci dengan PBST, pencucian diulang 8 kali. Tablet PNP dilarutkan dalam bufer PNP, dimasukkan ke sumuran plate sebanyak 100 µl, diinkubasi selama 30-60 menit pada ruang gelap, atau sampai terjadi perubahan warna.

Titer virus secara kuantitatif dibaca menggunakan *ELISA reader* model 550 (Bio-Rad, USA) pada panjang gelombang 405 nm. Hasil pembacaan dengan *ELISA reader* dinilai positif apabila

nilai absorbansinya 1,5 kali lebih besar daripada kontrol negatif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala penyakit pada benih lada

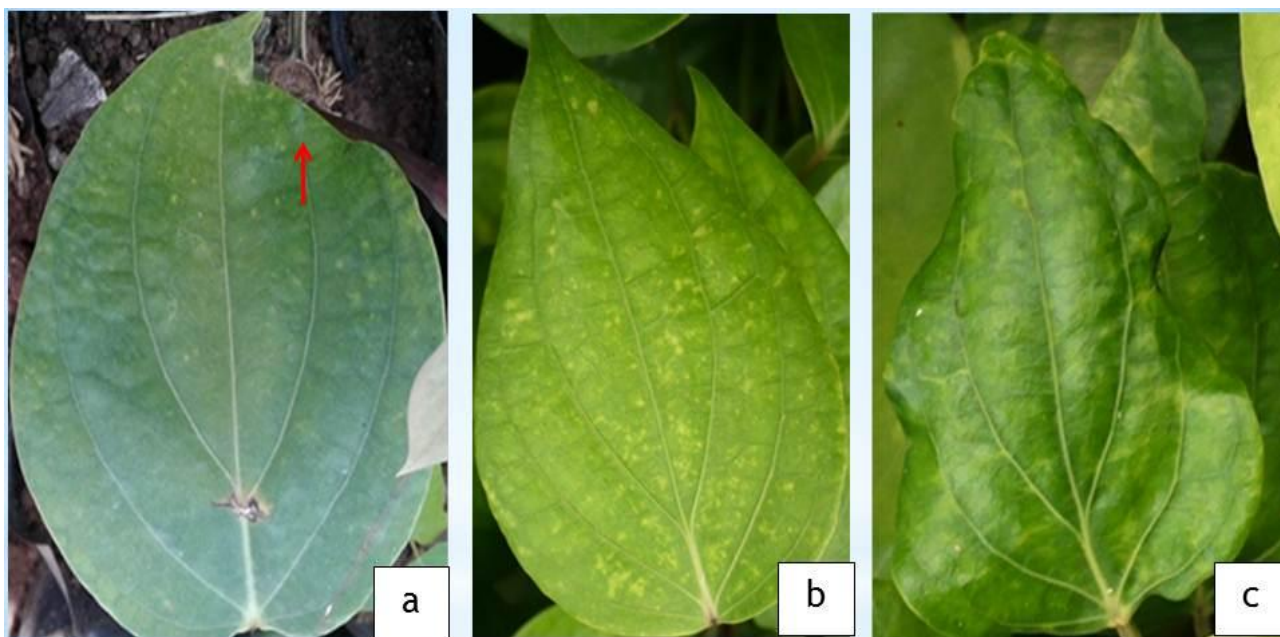
Berdasarkan pengamatan visual pada benih di kedua lokasi pembibitan, ditemukan benih yang terlihat sehat (tidak bergejala terinfeksi virus) dan benih yang menunjukkan gejala terinfeksi virus. Gejala infeksi virus yang ditemukan pada benih bervariasi, yaitu gejala klorotik, gejala belang disertai dengan perubahan bentuk (malformasi) daun, yaitu daun berkerut di bagian pinggirnya, serta gejala belang, yaitu munculnya warna kuning yang tidak merata pada daun (Gambar 1). Gejala infeksi virus pada pertanaman lada di Lampung dan Bangka juga ditemukan bervariasi (Lakani 2006).

Deteksi virus PYMoV dan CMV

Hasil ELISA deteksi virus PYMoV menggunakan antiserum BSV pada benih lada Sukabumi menunjukkan nilai absorbansi yang negatif untuk semua sampel, sedangkan dengan

menggunakan antiserum CMV terdapat 66% sampel positif terinfeksi CMV (Tabel 1). Hasil yang sama juga didapatkan dari sampel benih lada Purbalingga semua sampel negatif terinfeksi PYMoV (Tabel 2), sedangkan untuk deteksi virus CMV terdapat 46% sampel positif terinfeksi CMV.

Berdasarkan nilai absorbansi, sampel benih di kedua lokasi tidak ada yang positif terinfeksi PYMoV karena nilainya tidak ada yang lebih dari 1,5 kali nilai absorbansi kontrol negatif. Namun demikian, beberapa sampel menunjukkan nilai absorbansi yang lebih tinggi dari kontrol negatif (Tabel 1 dan 2). Bhadramurthy *et al.* (2005) juga melaporkan hasil nilai absorbansi sampel lada bergejala terinfeksi virus, mendekati kontrol negatif. Hal ini diduga karena titer virus pada sampel tersebut rendah. Deteksi lebih lanjut secara PCR menunjukkan PYMoV terdeteksi pada bibit lada di Sukabumi (Miftakhurohmah *et al.* 2016), dan di Purbalingga (data tidak ditampilkan). Hasil yang sama juga pernah dilaporkan pada deteksi PYMoV yang menginfeksi lada di Sri Lanka, yaitu menunjukkan hasil negatif secara ELISA, tetapi terdeteksi secara PCR (de Silva *et al.* 2002).



Gambar 1. Variasi gejala virus pada pembibitan lada di Sukabumi dan Purbalingga. a. Gejala klorotik, b. Gejala belang c. Gejala belang disertai dengan perubahan bentuk (malformasi) daun.

Figure 1. Variations of virus symptoms on black pepper nurseries in Sukabumi and Purbalingga. a. Chlorotic symptom, b. Mottle symptoms, c. Mottle symptom accompanied with leaf malformations.

Tabel 1. Hasil ELISA dengan antiserum BSV dan CMV pada sampel benih lada dari Sukabumi

Table 1. ELISA results with BSV and CMV antiserum on samples of black pepper seedlings from Sukabumi

No.	Sampel	Nilai Absorban		Hasil ELISA	
		BSV	CMV	BSV	CMV
	Kontrol Negatif	0,260	0,076	-	-
1	Petaling	0,062	0,093	-	-
2	Petaling	0,205	0,102	-	-
3	Petaling	0,230	0,094	-	-
4	Petaling	0,248	0,149	-	+
5	Petaling	0,365	0,151	-	+
6	Petaling	0,231	0,128	-	+
7	Petaling	0,231	0,126	-	+
8	Petaling	0,217	0,156	-	+
9	Petaling	0,251	0,132	-	+
10	Petaling	0,330	0,107	-	-
11	Natar 1	0,217	0,076	-	-
12	Natar 1	0,228	0,149	-	+
13	Natar 1	0,216	0,154	-	+
14	Natar 1	0,207	0,140	-	+
15	Natar 1	0,214	0,131	-	+
16	Natar 1	0,172	0,128	-	+
17	Natar 1	0,189	0,144	-	+
18	Natar 1	0,256	0,105	-	-
19	Natar 1	0,331	0,093	-	-
20	Natar 1	0,317	0,119	-	+
21	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,207	0,169	-	+
22	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,233	0,109	-	-
23	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,190	0,135	-	+
24	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,334	0,163	-	+
25	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,200	0,114	-	-
26	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,296	0,115	-	+
27	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,267	0,097	-	-
28	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,245	0,123	-	+
29	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,238	0,120	-	+
30	Lampung Daun Kecil (LDK)	0,235	0,138	-	+

Keterangan : (+) terdeteksi; (-) tidak terdeteksi.

Note : (+) detected, (-) undetected.

Perbandingan hasil deteksi terhadap ketiga varietas benih lada di Sukabumi menunjukkan varietas Petaling 60% positif terinfeksi CMV, varietas Natar 1 dan Lampung Daun Kecil 70% positif terinfeksi CMV (Tabel 1). Hasil ini menunjukkan ketiga varietas tersebut memiliki tingkat kerentanan yang hampir sama terhadap infeksi CMV. Penelitian terdahulu juga mendapatkan hasil jika PYMoV dan CMV mampu menginfeksi seluruh varietas lada yang diuji (Lakani 2006).

Adanya sampel positif terdeteksi virus di kedua lokasi pembibitan menunjukkan bahwa benih dapat terinfeksi virus di tempat pembibitan. Hal yang sama terjadi di India, penyebaran CMV lada yang luas diperkirakan melalui bahan tanaman setek batang (Sarma et al. 2001). Menurut de Silva et al. (2002), CMV dapat ditularkan oleh vektor, tanaman induk sakit, cara penyambungan dan secara mekanik, sedangkan virus PYMoV dapat ditularkan melalui tanaman induk yang sakit dan serangga vektor (Bhat et al. 2003).

Tabel 2. Hasil ELISA dengan antiserum BSV dan CMV pada sampel benih lada dari Purbalingga
 Table 2. ELISA result with BSV and CMV antiserum on samples of black pepper seedlings from Purbalingga

No.	Sampel	Nilai Absorban		Hasil ELISA	
		BSV	CMV	BSV	CMV
	Kontrol Negatif	0,206	0,280	-	-
1	Natar 1	0,200	0,525	-	+
2	Natar 1	0,165	0,501	-	-
3	Natar 1	0,200	0,315	-	+
4	Natar 1	0,197	0,448	-	+
5	Natar 1	0,210	0,449	-	+
6	Natar 1	0,173	0,540	-	-
7	Natar 1	0,182	0,324	-	-
8	Natar 1	0,215	0,318	-	-
9	Natar 1	0,245	0,342	-	-
10	Natar 1	0,216	0,359	-	+
11	Natar 1	0,179	0,518	-	-
12	Natar 1	0,218	0,348	-	+
13	Natar 1	0,173	0,640	-	-
14	Natar 1	0,198	0,339	-	+
15	Natar 1	0,192	0,525	-	+
16	Natar 1	0,221	0,435	-	+
17	Natar 1	0,230	0,576	-	-
18	Natar 1	0,217	0,318	-	-
19	Natar 1	0,233	0,402	-	-
20	Natar 1	0,218	0,313	-	+
21	Natar 1	0,197	0,516	-	-
22	Natar 1	0,193	0,406	-	+
23	Natar 1	0,205	0,474	-	-
24	Natar 1	0,218	0,418	-	-
25	Natar 1	0,228	0,319	-	-
26	Natar 1	0,267	0,391	-	+
27	Natar 1	0,261	0,587	-	+
28	Natar 1	0,236	0,622	-	+
29	Natar 1	0,212	0,439	-	+
30	Natar 1	0,227	0,627	-	+

Keterangan : (+) terdeteksi; (-) tidak terdeteksi.

Note : (+) detected, (-) undetected.

Perbanyakan bahan tanaman di kedua kebun dilakukan dengan cara setek. Hal ini dapat menjadi penyebab utama tersebarnya virus di pembibitan terutama jika tanaman induk yang digunakan sebagai sumber benih sudah terinfeksi virus, meskipun tidak menunjukkan gejala. Keberadaan virus pada tanaman tidak dapat diamati hanya berdasarkan gejala saja (Bhat dan Siljo 2014; Miftakhurohmah dan Balfas 2014). Pada beberapa tanaman lada, ditemukan infeksi CMV dan PYMoV yang tidak menimbulkan gejala (Bhadramurthy *et al.* 2008; Bhat *et al.* 2012).

Selain karena perbanyakan secara vegetatif, tempat pembibitan baik di Sukabumi maupun Purbalingga tidak dilakukan di dalam ruangan yang bebas serangga sehingga kemungkinan juga terjadi penularan virus melalui vektor. Menurut Bhat (2012), salah satu teknik untuk mendapatkan bibit lada bebas virus adalah memelihara bibit dalam rumah kaca bebas serangga.

Selain bahan tanaman terinfeksi virus, peralatan untuk perbanyakan tanaman yang tidak steril juga dapat menyebarkan virus. Rwegasira

dan Chrissie (2015) melaporkan penularan *Cassava brown streak virus* (CBSV) (Potyvirus) pada setek tanaman singkong sebesar 22% melalui alat potong. Demikian juga teknik penyambungan pada tanaman tomat menggunakan alat potong terkontaminasi *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) atau *Tomato mosaic virus* (ToMV), menghasilkan bahan tanaman dengan tingkat infeksi virus tertinggi sebesar 25% (Bausher 2013).

Deteksi virus pada benih lada yang akan ditanam di lapang harus dilakukan untuk mencegah terjadinya penyebaran virus. Hal ini disebabkan penggunaan benih terinfeksi virus akan menjadi sumber inokulum di lapang, yang selanjutnya virus dapat disebarkan serangga vektornya pada tanaman lada lain oleh karena itu benih yang sudah positif terinfeksi virus sebaiknya dimusnahkan. Selain itu, untuk menghasilkan benih sehat sebaiknya perbanyak benih dilakukan menggunakan peralatan steril, dan pemeliharaan benih dilakukan dalam tempat bebas serangga vektor.

KESIMPULAN

Deteksi secara serologi dengan metode ELISA pada benih lada siap tanam menunjukkan 66% benih di Sukabumi dan 46% di Purbalingga positif terinfeksi CMV, sedangkan terhadap antiserum BSV, tidak ada sampel yang bereaksi positif. Benih dari tiga varietas lada di Sukabumi menunjukkan tingkat kerentanan yang sama terhadap infeksi CMV. Keberadaan virus pada benih lada di kedua daerah pembibitan menunjukkan pentingnya deteksi virus pada benih lada sebelum ditanam di lapang sebagai salah satu cara pencegahan penyebaran virus.

DAFTAR PUSTAKA

- Balfas, R. (2009) Status Penelitian Serangga Vektor Penyakit Kerdil pada Tanaman Lada. *Perspektif*. 8 (1), 42–51.
- Balfas, R., Lakani, I., Samsudin & Sukanto (2007) Penularan Penyakit Kerdil dengan Tiga Jenis Serangga Vektor. *Jurnal Littri*. 13 (4), 136–141.
- Balfas, R., Supriadi, Mardiningsih, T.L. & Sugandi, E. (2002) Penyebab dan Serangga Vektor Penyakit Keriting pada Tanaman Lada. *Jurnal Littri*. 8 (1), 7–11.
- Bausher, M.G. (2013) Serial Transmission of Plant Viruses by Cutting Implements during Grafting. *HortScience*. 48 (1), 37–39.
- Bhadramurthy, V., Bhatl, A.I., George, J., Thankamani, C.K. & Mathew, P.A. (2008) Variation in The Concentration and Indexing Black Pepper Plants for PYMoV and CMV through DAS-ELISA. *Journal of Spices and Aromatic Crops*. 17 (2), 197–201.
- Bhadramurthy, V., Retheesh, S.T., Bhat, A.I., Madhubala, R., Hareesh, P.S. & Pant, R.P. (2005) Development of ELISA-Based Technique for The Detection of A Putative Badnavirus Infecting Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Indian Phytopathology*. 58 (3), 314–318.
- Bhat, A.I. (2012) Characterization and Management of Piper Yellow Mosaic Virus. In: Rao, G. et al. (eds.) *Recent Trends in Plant Virology*. Studium Press LLC, pp.105–116.
- Bhat, A.I., Devasahayam, S., Sarma, Y.R. & Pant, R.P. (2003) Association of A Badnavirus in Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Transmitted by Mealybug (*Ferrisia virgata*) in India. *Current science*. 84 (12), 1547–1550.
- Bhat, A.I., Hohn, T. & Selvarajan, R. (2016) Badnaviruses: The Current Global Scenario. *Viruses*. 8 (6). doi:10.3390/v8060177.
- Bhat, A.I. & Siljo, A. (2014) Detection of Viruses Infecting Black Pepper by SYBR Green-Based Realtime PCR Assay. *Journal of Plant Pathology*. 96 (1), 105–109. doi:10.4454/JPP.V96I1.036.
- Bhat, A.I., Siljo, A. & Deeshma, K.P. (2013) Rapid Detection of Piper Yellow Mottle Virus and Cucumber Mosaic Virus Infecting Black Pepper (*Piper nigrum*) by Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Journal of Virological Methods*. 193 (1), 190–196. doi:10.1016/j.jviromet.2013.06.012.
- Bhat, A.I., Siljo, A. & Devasahayam, S. (2012) Occurrence of Symptomless Source of Piper Yellow Mottle Virus in Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Varieties and A Wild Piper species. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 45 (9), 37–41. doi:10.1080/03235408.2011.591121.

- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. & Mumford, R. (2014) Methods in Virus Diagnostics: From ELISA to Next Generation Sequencing. *Virus Research*. 186, 20–31. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- Clark, M.F. & Adams, A.N. (1977) Characteristics of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology*. 34 (3), 475–483. doi:10.1099/0022-1317-34-3-475.
- Deeshma, K.P. & Bhat, A.I. (2014) Further Evidence of True Seed Transmission of Piper Yellow Mottle Virus in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal Plant Crops*. 42, 289–293.
- Dijkstra, J. & de Jager, C. (1998) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. In: Dijkstra, J. & de Jager, C. (eds.) *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Heidelberg: Springer, pp.348–362.
- Firdausil, A. (1992) Stunted Disease of Black Pepper. In: Proceedings of International Workshop on Black Pepper Diseases. pp.220–225.
- Lakani, I. (2006) Deteksi dan Identifikasi Penyebab Penyakit Belang (Mottle) pada Tanaman Lada (*Piper Nigrum* L.) di Indonesia. Institut Pertanian Bogor.
- Miftakhurohmah & Balfas, R. (2014) Karakteristik Biologi dan Molekuler serta Pengendalian Virus Penyebab Penyakit Kerdil pada Lada. *Perspektif*. 13 (1), Perspektif, 53–62.
- Miftakhurohmah, Mariana, M. & Wahyuno, D. (2016) Deteksi Piper Yellow Mottle Virus (PYMoV) Penyebab Penyakit Kerdil pada Tanaman Lada secara Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bul. Littro* 27 (1), 77–84.
- Rwegasira, G. & Chrissie, M. (2015) Efficiency of Non-Vector Methods of Cassava Brown Streak Virus Transmission to Susceptible Cassava plants. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 15 (4), 10335–10351. doi:10.4314/ajfand.v15i4.
- Saefudin (2014) Tantangan dan Kesiapan Teknologi Penyediaan Bahan Tanam Mendukung Peningkatan Produktivitas Nasional Tanaman Lada (*Piper nigrum* L.). *Perspektif*. 13 (2), 111–125.
- Sarma, Y.R., Kiranmai, G., Sreenivasulu, P., Anandaraj, M., Hema, M., Venkatramana, M., Murthy, A.K. & Reddy, D.V.R. (2001) Partial Characterization and Identification of A Virus Associated with Stunt Disease of Black Pepper (*Piper nigrum*) in South India. *Current Science*. 80 (3), 459–462.
- de Silva, D., Jones, P. & Shaw, M. (2002) Identification and Transmission of Piper Yellow Mottle Virus and Cucumber Mosaic Virus Infecting Black Pepper (*Piper nigrum*) in Sri Lanka. *Plant Pathology*. 51, 537–545.
- Sitepu, D. & Mustika, I. (2000) Disease of Black Pepper and Their Management in Indonesia. In: Ravindran, P. (ed.) *Black Pepper (Piper nigrum L.)*. Hardwood Academic Publisher, pp.297–308.
- Sukamto (2014) *Bibit Bermutu Lada : Awal Sukses Keberhasilan*. Berita Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. <http://balittro.litbang.pertanian.go.id/ind/index.php/en/latest-news/270-bibit-bermutu-lada-awal-sukses-keberhasilan>. [Diakses: 1 Februari 2016].
- Wahyudi, A. & Wulandari, S. (2015) *Pengembangan Sistem Pembibitan sebagai Basis Pengembangan Usaha Tani Lada di Bangka Barat*. Dalam: *Prosiding Seminar Perbenihan Tanaman Rempah dan Obat*. pp.137–143.