© HAK CIPTA MILIK UNIVERSITAS ANDALAS

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
   a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
   b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEMINIVIRUS PENYEBAB PENYAKIT KERUPUK PADA TANAMAN TEMBAKAU (Nicotiana tabacum L.) DI KABUPATEN LIMA PULUH KOTA

SKRIPSI

RAHIL ADE RIFQAH
07 116 015

FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012

BIODATA

Penulis dilahirkan di Padang Kunik Kecamatan Pariaman Utara pada tanggal 29 Juni 1989 sebagai anak pertama dari delapan bersaudara, dari pasangan Ayahanda Admiral, S.Pd dan Ibunda Erlina, S.Pdi. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) diperoleh di SD N 20 Labung Sikapak Timur Kecamatan Pariaman Utara kota Pariaman (1995-2001). Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP N 6 Pariaman (2001-2003). Kemudian melanjutkan ke Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA N 2 Pariaman dan lulus pada tahun 2007. Penulis diterima di Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Andalas pada Agustus 2007.

Padang, Mei 2012

Rahil Ade Rifqah

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan Kehadirat Allah SWT yang selalu melimpahkan rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang berjudul **"Identifikasi dan Karakterisasi Molekuler Geminivirus Penyebab Penyakit Kerupuk pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum.* L) Di Kabupaten Lima Puluh Kota".** Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Juli 2011 sampai Januari 2012 di Kabupaten Lima Puluh Kota yaitu Kecamatan Sungai Kamuyang dan Situjuah Limo Nagari serta Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas.

Penulis menyampaikan terima kasih yang setulusnya kepada Ibu Ir. Martinius, MS dan Ibu Ir. Yenny Liswarni, MP serta Bapak Dr. Jumsu Trisno, SP, Msi selaku dosen pembimbing yang telah membimbing, memberi petunjuk, saran dan pengarahan mulai dari penyusunan proposal sampai penyusunan skripsi. Selanjutnya penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada Ketua Jurusan dan Sekretaris, seluruh staf pengajar, Karyawan Administrasi, Karyawan Perpustakaan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian dan rekan-rekan yang telah memberikan semangat dan bantuan yang berharga selama penulis menempuh pendidikan di Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang.

Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan secara umum dan ilmu pertanian khususnya.

P a d a n g, Mei 2012

R.A.R

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
ABSTRAK	xi
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Penyakit Virus Pada Tembakau	5
2.2 Geminivirus	6
2.3 Identifikasi Virus	8
2.4 Analisis Molekuler	9
III. BAHAN DAN METODE	11
3.1 Tempat Dan Waktu	11
3.2 Bahan Dan Alat	11
3.3 Metode Penelitian	11
3.4 Pelaksanaan	12
3.5 Parameter Pengamatan	15
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	19
4.1. Karakterisasi Gejala Penyakit Kerupuk di Lapangan	19
4.2. Persentase dan Intensitas Serangan Penyakit Kerupuk	22
4.3. Optimasi Isolasi DNA Tembakau	24
4.4. Optimasi Amplifikasi DNA dengan PCR	25
4.5. Karakterisasi Sekuen Fragmen Hasil Amplifikasi PCR	27
4.6. Analisis Filogenetik Geminivirus Berdasarkan Sekuen-Daerah *Common Region* (Top Region)	29
V. KESIMPULAN DAN SARAN	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	41

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1.	Tanaman tembakau terserang virus kerupuk di lapangan.....	12
2.	Variasi gejala penyakit kerupuk pada daun tembakau di Kabupaten Lima Puluh Kota	20
3.	Contoh hasil isolasi DNA total tembakau yang menunjukkan gejala penyakit kerupuk dari beberapa lokasi	24
4.	Produk PCR hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c715 yang divisualisasi pada gel agarose 1%	26
5.	Urutan DNA 1 isolat (ToLCSBV)	27
6.	Perbandingan hasil sekuensing 1 isolat (ToLCSBV) geminivirus dengan sekuen isolat geminivirus asal cabai Sumatera Barat dan GeneBank	29
7.	Filogenetik kekerabatan isolat ToLCSBV geminivirus Sumatera Barat berdasarkan runutan DNA *Top Region* terhadap isolat-isolat Indonesia dari data GeneBank dan data Trisno, 2010	32

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1.	Kriteria skala kerusakan penyakit kerupuk pada tembakau	16
2.	Kriteria tingkat keparahan serangan tanaman tembakau terhadap infeksi geminivirus	16
3.	Daftar Geminivirus yang digunakan untuk analisis kekerabatan dengan isolat tembakau Sumatera Barat.....	18
4.	Persentase serangan penyakit kerupuk di Kabupaten Lima Puluh Kota	22
5.	Intensitas penyakit kerupuk di Kabupaten Lima Puluh Kota	22
6.	Hasil analisis tingkat kesamaan genetik isolat ToLCSBV dengan geminivirus (data GeneBank) menggunakan program NCBI BLAST.....	28

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Jadwal kegiatan penelitian	41
2. Skema metode pengambilan daerah sampel di lapangan	42
3. Denah penghitungan tingkat serangan penyakit kerupuk	43

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

IDENTIFIKASI DAN KARAKTERISASI MOLEKULER GEMINIVIRUS PENYEBAB PENYAKIT KERUPUK PADA TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.) DI KABUPATEN LIMA PULUH KOTA

Abstrak

Penelitian bertujuan untuk mengidentifikasi dan karakterisasi isolat-isolat geminivirus yang berasosiasi dengan penyakit kerupuk pada tanaman tembakau. Penelitian dilaksanakan dalam bentuk deskriptif dengan teknik pengambilan sampel *purposive random sampling*, penghitungan persentase serangan dan intensitas serangan penyakit kerupuk dengan teknik rancangan acak sistematis. Tahapan penelitian terdiri dari karakterisasi gejala penyakit kerupuk, isolasi DNA, amplifikasi DNA dengan pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 pada daerah *common region* dan produk hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) disekuensing menggunakan mesin ABI-Prisma 3100-*Avant genetic analyzer*. Hasil sekuensing digunakan dalam analisis filogenetik untuk melihat kekerabatan isolat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyakit kerupuk telah tersebar di Kabupaten Lima Puluh Kota dengan rata-rata persentase serangan 25,8% tergolong pada kriteria serangan berat dan intensitas serangan 19,6% dengan karakterisasi gejala yang beragam. Hasil identifikasi didapat 10 isolat yang terdeteksi geminivirus dan 1 isolat yang disekuensing untuk dianalisis lebih lanjut. Isolat geminivirus pada tanaman tembakau Kabupaten Lima Puluh Kota memiliki tingkat kesamaan genetik dengan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* isolat asal dari gulma babadotan (*Ageratum conyzoides*) dan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* isolat asal cabai penyebab penyakit virus kuning keriting pada tanaman cabai dengan tingkat kesamaan genetik 94%. Analisis filogenetik isolat geminivirus pada tanaman tembakau Kabupaten Lima Puluh Kota membentuk kelompok tersendiri dengan isolat geminivirus GeneBank dan cabai Sumatera Barat berdasarkan asal/lokasi isolat. Isolat geminivirus pada tanaman tembakau yg ditemukan di Kabupaten Lima Puluh Kota merupakan geminivirus galur baru, sehingga dapat disebut dengan *Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat virus* (ToLCSBV).

Kata Kunci : Geminivirus, analisis sekuen, *Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat Virus* (ToLCSBV).

MOLECULER IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF GEMINIVIRUS CAUSED by CURL DISEASE OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) IN DISTRICT LIMA PULUH KOTA

Abstract

The research were aimed at identifying and characterizing geminivirus isolates associated with curl disease in tobacco plants. Research locations were detrmined by using purposive random sampling. Samplings were done by using systematic random techniques. Phases of the study consisted of the characterization of curl disease symptoms, DNA isolation, DNA amplification with primer pairs PAL1v 715 and PAR1c 1978 in the common region and the amplification products Polymerase Chain Reaction (PCR) were sequenced using ABI-Prism 3100 machine-Avant genetic analyzer. The results of sequencing were used in the phylogenetic analysis to view the genetic relationship of isolates. The results showed that the curl disease had been spread in district Lima Puluh Kota with the average percentage of damage was 25.8% classified as severe attacks and 19.6% intensity of damage with a variety of symptoms. Ten isolates were detected and a geminivirus isolates were sequenced for further analysis. Geminivirus isolates in district Lima Puluh Kota on tobacco plants had high level of genetic similarity with *Yellow Pepper Leaf Curl Virus* isolates Indonesia babadotan origin of weeds (*Ageratum conyzoides*) and *Pepper Yellow Leaf Curl Virus* isolates from Indonesia chili yellow curl virus a disease in pepper plants to the level of genetic similarity 94%. Phylogenetic analysis of gemini virus isolates in distric Lima Puluh Kota of tobacco plants formed a separate group with GeneBank and pepper geminivirus isolates of West Sumatra by origin / location of the isolates. Geminivirus isolates on tobacco plants in District Lima Puluh Kota was a new strain of geminivirus, so it was called the *Tobacco Leaf Curl virus of West Sumatra* (ToLCSBV).

Keywords: Geminivirus, sequence analysis, *Tobacco Leaf Curl Virus West Sumatra* (ToLCSBV).

UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

I. PENDAHULUAN

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) merupakan salah satu komoditi yang strategis dari jenis tanaman perkebunan yang mempunyai nilai ekonomis. Komoditi tembakau mempunyai arti yang cukup penting, tidak hanya sebagai sumber pendapatan bagi para petani, tetapi juga bagi negara. Tembakau (daunnya) digunakan sebagai bahan pembuatan rokok (Erwin, 2000).

Sumatera Barat merupakan salah satu sentra produksi tembakau di Indonesia yang terdapat di Kabupaten Lima Puluh Kota dengan produksi dari tahun ke tahun berfluktuasi. Tahun 2007 jumlah produksi adalah 200,40 ton dengan produktivitas 179,00 ton/ha, kemudian menurun menjadi 106,29 ton pada tahun 2008 dengan produktivitas 133,00 ton/ha. Pada tahun 2009 produksi mengalami peningkatan yakni naik menjadi 141,57 ton dengan produktivitas 228,00 ton/ha (BPS, 2010).

Terjadinya produksi yang berfluktuasi disebabkan oleh adanya serangan hama dan penyakit tumbuhan. Salah satu adalah penyakit kerupuk yang timbul selama penanaman tembakau. Gejala penyakit kerupuk biasanya mulai terlihat pada umur 2-3 minggu setelah tanam dan banyak terjadi pada waktu cuaca kering. Penyakit kerupuk ditularkan oleh serangga *Bemisia tabaci* Genn (kutu kebul) ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae*; (Trisusilowati, 1989; Hartati, 2007).

Menurut Trisusilowati (1992), tanaman tembakau yang terserang penyakit kerupuk memperlihatkan gejala tepi daun melengkung ke permukaan bawah atau menggulung ke arah permukaan atas daun, tulang daun menebal dan berkelok-kelok, terjadi enasi pada tulang daun di permukaan bawah, daun mengkerut tidak merata, daun menjadi kaku, apabila diremas akan pecah seperti kerupuk dan rapuh sehingga menurunkan kuantitas dan kualitas rokok. Penyakit ini disebabkan oleh *Tobacco Leaf Curl Virus* yang sudah banyak dilaporkan di berbagai negara seperti Thailand (Chiemsombat dan Kitipakorn, 1997; Samretwanich *et al.*, 2000), Banglades (Maruthi *et al.*, 2005), Spanyol (Morilla *et al.*, 2005) dan Indonesia di pulau Jawa (Hidayat *et al.*, 2008) yang kemudian diketahui disebabkan oleh Begomovirus. Di Indonesia geminivirus pertama kali dilaporkan menyerang tanaman tembakau yaitu virus kerupuk tembakau. Pada tahun 1984 virus kerupuk

yang menyebabkan penyakit kerupuk menjadi sangat penting, karena kerusakan mencapai 30% dari seluruh areal pertanaman tembakau di Bojonegoro (Poerbokoesoemo, 1984 *cit* Trisusilowati, 1989). Shew dan Lucas (1971) menyebutkan bahwa penyakit virus kerupuk ini tersebar luas dan menimbulkan kerugian hanya pada tanaman tembakau di daerah tropis.

Begomovirus termasuk kedalam famili Geminiviridae, yang merupakan kelompok terbesar penyebab penyakit pada tanaman. Kelompok geminivirus mempunyai karakter morfologi dengan dua partikel isometrik mempunyai genom ssDNA (Gutierrez, 2000). Geminivirus dikelompokkan dalam empat genus berdasarkan kisaran inang, serangga vektor dan organisasi genom. Genom Begomovirus (sub group III) ditularkan oleh serangga vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci* Genn) ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae,* menginfeksi tanaman dikotil dan mempunyai organisasi genom monopartit dan bipartit (Fauquet dan Stanley, 2003).

Perkembangan penyakit yang disebabkan oleh Begomovirus sangat cepat di lapangan, sehingga dibutuhkan suatu prosedur untuk mendeteksi geminivirus secara spesifik dalam membantu kajian epidemiologi dan pengendalian penyakit (Nakhla dan Maxwell, 1998). Tanaman inang dari geminivirus adalah tomat, cabai, cabai rawit, tembakau, gulma babadotan (*Ageratum conyzoides*) dan bunga kancing (*Gomphrena globosa*) (Hartati, 2007).

Metode yang telah dilakukan untuk mendeteksi geminivirus adalah metode serologi. Penggunaan metode ini telah dilakukan untuk mendeteksi virus kerupuk tembakau (Trisusilowati, 1989). Akan tetapi untuk saat ini penggunaan metode serologi kurang efektif untuk mendeteksi geminivirus, karena keragaman geminivirus yang cukup tinggi dan kesulitan untuk pembuatan antisera yang disebabkan oleh sifat fisik dan kimia partikel virus yang membuatnya sulit untuk dimurnikan dalam bentuk yang stabil, sifat imunogenik dari virion yang lemah, protein selubung terutama untuk virus-virus yang ditularkan oleh *Bemisia tabaci* ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae*, tidak dapat dibedakan melalui antisera poliklonal maupun monoklonal (Roberts *et al.,* 1984). Analisis molekuler melalui sidik jari DNA dan runutan asam nukleat telah banyak dikembangkan untuk melakukan karakterisasi maupun identifikasi virus tumbuhan. Teknik yang telah

banyak digunakan untuk mendeteksi dan identifikasi geminivirus yaitu identifikasi secara nonbiologi antara lain dengan pengamatan mikroskop elektron, uji immunologi atau serologi, hibridisasi asam nukleat menggunakan pelacak DNA dan melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan salah satu metode yang digunakan untuk mendeteksi geminivirus secara cepat dan akurat dari berbagai sampel tanaman sakit dan serangga vektor di berbagai negara. Sampel yang diperlukan sedikit dan dapat berupa bahan segar dan kering (Navot *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 1993; Wyatt dan Brown, 1996; Sulandari, 2004).

Pengujian dengan teknik PCR memerlukan sepasang primer yang spesifik untuk menginduksi pembentukan dan perbanyakan asam nukleat atau untai DNA dengan bantuan enzim *Taq polymerase* dalam mesin PCR atau *thermocycler.* Pemilihan primer yang tepat sangat menentukan keberhasilan identifikasi suatu virus. Teknik PCR sangat cocok digunakan untuk mendeteksi geminivirus karena replikasi geminivirus terjadi melalui ds DNA yang merupakan bentuk *replicative form* dan dapat digunakan sebagai templet DNA. Teknik ini telah berhasil untuk mendeteksi berbagai geminivirus yang menyerang tanaman tomat, buncis, cabai, kedelai dan ketela pohon yang sebelumnya sulit dideteksi dengan metode lain (Rojas *et al.*, 1993, Polston dan Anderson 1997). Metode PCR juga telah berhasil digunakan untuk mendeteksi geminivirus asal cabai yang dikumpulkan dari berbagai daerah di Indonesia terutama Jawa (Hidayat *et al*, 1999; Sulandari 2004),Sumatera Barat (Trisno, 2010), tomat (Aidawati *et al.,* 2005; Hartono, 2006; Santoso *et al.*, 2008) dan tembakau di Jember Jawa Timur (Hidayat *et al.,* 2008).

Pemilihan primer untuk geminivirus dapat dilakukan pada daerah *common region* atau *intergenic region*, gen penyandi selubung protein dan protein yang berasosiasi untuk proses replikasi virus (Rojas *et al.*, 1993; Polston dan Anderson 1997). Primer spesifik yang digunakan untuk mengamplifikasi DNA pada daerah *common region* untuk geminivirus yaitu pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 yang hasil elektroforesis amplifikasi produk PCR didapatkan fragmen DNA dengan ukuran 1600 bp (Aidawati *et al.,* 2002). Penggunaan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 mampu mengidentifikasi dan karakterisasi *Tobacco Leaf*

Curl Virus pada tanaman tembakau di Jember Jawa Timur (Hidayat *et al.*, 2008) dan geminivirus pada cabai di Sumatera Barat (Trisno, 2010).

Sejauh ini, informasi mengenai identifikasi dan karakterisasi molekuler geminivirus dengan menggunakan teknik PCR terhadap penyakit kerupuk pada tembakau yang banyak menimbulkan kerugian dan mengurangi hasil produksi daun tembakau di Sumatera Barat belum ada dilaporkan. Berdasarkan permasalahan tersebut, penulis telah melakukan penelitian dengan judul " **Identifikasi dan Karakterisasi Molekuler Geminivirus Penyebab Penyakit Kerupuk Pada Tanaman Tembakau Di Kabupaten Lima Puluh Kota** ". Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi dan karakterisasi isolat-isolat geminivirus yang berasosiasi dengan penyakit kerupuk pada tanaman tembakau.

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Virus Pada Tembakau

Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) termasuk tanaman kelas *Dicotyledonaea*, ordo *Personatae*, famili *Solanaceae*, sub famili *Nicotianae* dan termasuk genus *Nicotiana*. Tembakau adalah produk pertanian yang diproses dari daun tanaman dari genus *Nicotiana*. Tembakau dapat dikonsumsi, digunakan sebagai pestisida, dan dalam bentuk nikotin tartrat dapat digunakan sebagai obat. Jika dikonsumsi, pada umumnya tembakau dibuat menjadi rokok dan tembakau kunyah (Abdullah dan Soedarmanto, 1986).

Di Indonesia, tembakau yang baik (komersial) hanya dihasilkan di daerah-daerah tertentu. Kualitas tembakau sangat ditentukan oleh lokasi penanaman dan pengolahan pascapanen. Akibatnya, hanya beberapa tempat yang memiliki kesesuaian dengan kualitas tembakau terbaik, tergantung produk sasarannya. Spesies yang sering dibudidayakan adalah *Nicotiana tobacum* dan *Nicotiana rustika* (Erwin, 2000).

Banyak faktor yang menyebabkan penurunan produksi, salah satu hambatan yang dapat menurunkan produktivitas tanaman tembakau adalah adanya organisme pengganggu tanaman (OPT) baik hama maupun patogen (jamur, bakteri dan virus). Di antara banyak patogen tembakau ini, virus merupakan patogen yang banyak menyerang dan sangat merugikan (Saleh *et al*., 1992).

Penyakit khususnya virus tembakau umumnya masih kurang disadari keberadaannya dan kerugian yang ditimbulkan oleh petani, karena tanaman yang terserang virus tidak menimbulkan kematian pada tanaman sehingga masih dapat memberikan hasil, tetapi kerugian yang ditimbulkan cukup banyak (Saleh *et al*., 1992). Penyakit disebabkan oleh virus yang telah dilaporkan menyerang tanaman tembakau di Indonesia antara lain adalah penyakit mosaik tembakau disebabkan olah *Tobacco Mosaic virus*, penyakit mosaik mentimun disebabkan oleh *Cucumber Mosaic Virus*, penyakit betok disebabkan oleh *Tobacco Etch Virus,* penyakit kerupuk disebabkan oleh *Tobacco Leaf Curl Virus* dan penyakit coreng disebabkan oleh *Tobacco Streak Virus* (Semangun, 2008; Saleh *et al*., 1992).

2.2 Geminivirus

Geminivirus merupakan salah satu kelompok virus yang banyak menimbulkan kerusakan pada berbagai tanaman yang dibudidayakan didaerah tropis maupun subtropis. Selain menyerang berbagai tanaman pertanian, geminivirus juga dapat menginfeksi berbagai gulma (Salati *et al.*, 2002; Sulandari, 2004). Beberapa jenis tumbuhan liar, gulma dan tanaman indikator seperti *Physalis floridana*, *Datura stramonium*, *Hyptis brevipes*, *Ageratum Conyzoides* (babadotan), *Crotalaria juncea* (orok-orok) yang biasa tumbuh liar di sekitar pertanaman cabai ternyata rentan terhadap serangan geminivirus isolat Segunung. *Physalis* sp., *Datura* sp., dan beberapa jenis gulma dari famili Solanaceae telah dilaporkan menjadi inang alternatif geminivirus (Torres-Patcheco *et al.* 1996; Sanchez-Campos *et al.* 1999; Sulandari *et al.*, 2006).

Geminivirus ini tidak ditularkan lewat biji dan juga mekanik, hanya dapat ditularkan melalui penyambungan dan vektor yaitu kutu kebul (*Bemisia tabaci*) ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae*. Kutu kebul ini selain sebagai hama yang sangat merugikan pada berbagai tanaman semusim di daerah tropis ataupun subtropis, juga dapat menularkan berbagai macam virus dari kelompok *Begomovirus* dan *Closterovirus*, khususnya *Crinivirus* (Sulandari, 2004).

Efektivitas penularan virus oleh kutu kebul ini dipengaruhi oleh berbagai faktor antara lain strain virus, biotipe serangga, dan jenis inang. Sifat hubungan virus dengan serangga vektornya dikendalikan oleh protein spesifik yang menyusun protein selubung virus dengan protein spesifik yang terdapat pada serangga vektornya. Interaksi keduanya akan berpengaruh dalam efektivitas penularan penyakit (Noris *et al.*, 1998).

Geminivirus merupakan virus yang mempunyai genom DNA berutas tunggal dan selubung protein. Virion berbentuk ikosahedral kembar dengan ukuran sekitar 18 x 30 nm (*Geminate*) (Harrison, 1985). Geminivirus termasuk ke dalam famili Geminiviridae. Berdasarkan struktur genom, jenis serangga vektornya dan jenis tanaman inangnya famili ini dibedakan menjadi empat genus yaitu : *Mastrevirus, Curtovirus, Begomovirus* dan *Topocuvirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000; Fauquet *et al.*, 2000; Hull 2002).

Genus *Mastrevirus,* anggota jenisnya dicirikan dengan tipe *Maize Streak Virus,* mempunyai genom monopartit yang berukuran sekitar 2,6 – 2,8 kb, menyerang tanaman monokotil dan ditularkan oleh wereng daun. Genus *Curtovirus* anggota jenisnya dicirikan dengan tipe *Beet Curly Top Virus*. Pada *Curtovirus,* struktur genom dan jenis serangga vektornya sama dengan genus *Mastrevirus*, akan tetapi hanya menyerang tanaman dikotil. Genus *Begomovirus* atau sebelumnya dikenal sebagai subkelompok III anggotanya dicirikan dengan tipe *Bean Golden Mosaic Virus,* dengan struktur genom bipartit (beberapa monopartit), inangnya adalah tanaman dikotil, vektornya *Bemissia tabaci* Genn. *Topocuviorus* merupakan genus baru hasil pemisahan dari *Curtovirus.* Genus ini mempunyai struktur genom yang mirip dengan *Curtovirus* akan tetapi ditularkan oleh *treehopper* yaitu *Micrutalis malleifera* (Sulandari, 2004).

Begomovirus sebagian besar genomnya terdiri atas dua molekul (bipartit) yang masing-masing berukuran sekitar 2,78 kb dan terpisah menjadi dua, DNA-A dan DNA-B. Selain itu ada yang terdiri atas satu molekul saja atau monopartit yang berukuran sekitar 2,7-2,8 kb. Geminivirus dengan genom bipartit banyak ditemukan di Amerika, sedangkan yang monopartit banyak terdapat meliputi Eurasia, Afrika dan Australia. Geminivirus dengan genom monopartit pada umumnya hanya menginfeksi tanaman solanaceae (Hull, 2002).

Geminivirus yang monopartit dengan yang bipartit keduanya mempunyai ukuran, fungsi dan organisasi gen yang hampir sama khususnya pada DNA-A. Gen penyandi selubung protein virus (*coat protein*) merupakan daerah genom yang mempunyai runutan susunan DNA dengan derajat kesamaan yang tinggi (*conversed*) antara anggota geminivirus dalam satu genus (Rojas *et al.,* 1993, Wyatt dan Brown 1996). *Intergenic region* (IR) atau *common region* (CR), selain mempunyai derajat kesamaan runutan asam nukleat yang tinggi juga mempunyai derajat kesamaan yang rendah (*diversed*) antar anggota genus geminivirus (Matthews, 1992; Padidam *et al.,* 1995; Van Regenmortel *et al.,* 2000). Pada IR/CR terdapat promotor dan urutan basanya sebagai awal terjadinya transkripsi. Oleh karena bersifat *conversed* daerah genom tersebut banyak digunakan sebagai dasar pemilihan suatu primer (Matthews, 1992; Rojas *et al.,* 1997).

2.3 Identifikasi Virus

Deteksi dan karakterisasi penyebab penyakit pada tanaman, benih ataupun bahan vegetatif, selain untuk mengetahui sifat biologinya juga merupakan langkah awal yang sangat diperlukan dalam strategi pengelolaan penyakit. Banyak cara yang dapat dilakukan untuk karakterisasi virus. Karakterisasi virus antara lain dapat dilakukan melalui identifikasi secara biologi ataupun nonbiologi serta melalui analisis komponen patogennya. Identifikasi secara biologi antara lain dapat dilakukan dengan penularan ke tanaman indikator, penularan menggunakan vektor serangga dan kajian kisaran inang (Brown dan Ogle, 1997).

Deteksi geminivirus dengan metode konvensional seringkali tidak mungkin dilakukan karena kebanyakan geminivirus tidak dapat ditularkan secara mekanik dengan cairan perasan tanaman terinfeksi. Dengan demikian penggunaan bioassay untuk identifikasi dan evaluasi kisaran inang menjadi sulit untuk dilakukan. Beberapa geminivirus yang dapat ditularkan secara mekanik yaitu *Bean Dwarf Mosaic Virus* (Morales *et al.*, 1990), *Mungbean Yellow Mosaic Virus* (Honda *et al., 1983*) dan *Tomato Yellow Mosaic Virus* (Uzcateguin dan Ramon, 1978).

Metode yang selama ini dilakukan untuk mendeteksi geminivirus adalah metode serologi. Penggunaan metode ini telah dilakukan untuk mendeteksi virus kerupuk tembakau (Trisusilowati, 1989). Akan tetapi untuk saat ini penggunaan metode serologi kurang efektif untuk mendeteksi geminivirus karena keragaman geminivirus yang cukup tinggi dan kesulitan untuk pembuatan antiserum yang disebabkan oleh sifat fisik dan kimia partikel virus yang membuatnya sulit untuk dimurnikan dalam bentuk yang stabil, sifat imunogenik dari virion yang lemah, protein selubung terutama untuk virus-virus yang ditularkan oleh *B.tabaci* tidak dapat dibedakan melalui antisera poliklonal maupun monoklonal (Roberts *et al.*, 1984). Untuk mengetahui adanya komponen spesifik dari suatu virus dapat dilakukan dengan identifikasi secara nonbiologi antara lain dengan pengamatan mikroskop elektron, uji immunologi atau serologi, hibridisasi asam nukleat menggunakan pelacak DNA dan melalui teknik PCR. Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan primer universal telah terbukti dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi geminivirus dari tanaman yang

berbeda (Rojas *et al., 1993*; Wyatt dan Brown 1996; Chiemsombat *et al.,* 1990; Roye *et al.,* 1997). Teknik ini tidak hanya dapat mendeteksi asam nukleat virus pada jaringan tanaman terinfeksi tetapi juga berhasil mendeteksi asam nukleat dalam tubuh serangga vektor (Polston *et al.,* 1990; Chiemsombat *et al.,* 1990; Mehta *et al.,* 1994; Navot *et al.,* 1989).

2.4 Analisis Molekuler

Teknik molekuler untuk karakterisasi maupun deteksi geminivirus tumbuhan banyak dikembangkan akhir-akhir ini. Teknik PCR berkembang sangat cepat untuk mendeteksi berbagai virus tumbuhan. Deteksi virus secara PCR akan memberikan hasil yang akurat, cepat dan sangat peka. Teknik PCR memerlukan jumlah sampel sedikit dan sampel dapat berupa bahan segar, sudah dikeringkan atau beku. Teknik PCR dapat mengatasi kendala pada pengujian geminivirus secara serologi (Wyatt dan Brown, 1996).

Pengujian dengan teknik PCR memerlukan sepasang primer yang spesifik yang akan menginduksi pembentukan dan perbanyakan rangkain asam nukleotida atau untaian DNA tertentu dengan bantuan enzim *Taq polymerase* dalam mesin PCR atau *thermocycler*. Pemilihan primer yang tepat sangat menentukan keberhasilan identifikasi suatu virus. Pada geminivirus, primer dapat dipilih pada bagian *common region* atau *intergenic region*, gen yang menyandikan selubung protein virus maupun protein yang berasosiasi dengan proses replikasi virus (Polston dan Anderson, 1997). Untuk keperluan taksonomi geminivirus banyak digunakan primer dari gen penyandi protein selubung yaitu AV1 ORF DNA-A karena daerah ini mempunyai derajat kesamaan yang tinggi antara anggota geminivirus (Idris dan Brown, 1998). Penyusunan primer tersebut misalnya Av 494 dan Ac 1084 yang akan mengamplifikasi sebagian gen protein selubung virus berukuran sekitar 550 bp. Berdasarkan ukuran fragmen DNA tersebut dapat digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan geminivirus pada berbagai tanaman pertanian, tanaman hias dan gulma (Wyatt dan Brown, 1996). Penggunaan primer yang disusun dari daerah AL1 dan AR1 yaitu PAL1v 1978 dan PARIc 496 antara lain dapat teramplifikasi untain DNA sekitar 1,3 kb dari TYLCV-Egi (Rojas *et al.,* 1993), dan ToYLCV (*Tomato Yelow Leaf Curl Virus*)

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

pada tomat di Jepang (Kato *et al.*, 1998). Teknik PCR selain dapat digunakan untuk mendeteksi geminivirus yang menyerang tanaman, juga dapat mengetahui keberadaan geminivirus dan lokasi virus di dalam tubuh serangga vektornya (Metha *et al.*, 1994).

Teknik PCR menggunakan primer universal telah terbukti dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi geminivirus dari tanaman dan tempat yang berbeda (Hidayat *et al.*, 1999; Aidawati *et al.*, 2002; Sudiono *et al.*, 2001 dan Sulandari *et al.*, 2006). Teknik ini tidak hanya dapat mendeteksi asam nukleat geminivirus pada jaringan tanaman terinfeksi tetapi juga dapat mendeteksi geminivirus dalam tubuh serangga vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci)* ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae* (Aidawati dan Hidayat, 1999 *cit* Trisno 2010).

Keragaman geminivirus dapat dilihat dari pola pita PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Lenght Polymorphism*). Hasil restriksi pola RFLP dari fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menunjukkan strain geminivirus yang berbeda. Pola PCR-RFLP fragmen DNA-A dan DNA-B isolat Guadeloupe, Martinique, dan Puerto Rico adalah sama, sehingga diduga tanaman tomat tersebut terinfeksi oleh virus yang sama (Polston *et al.*, 1997). Momo *et al.*, (1993) *cit* Trisno (2010) mengatakan bahwa fragmen DNA geminivirus yang menginfeksi tomat di Georgia Selatan dan Florida Utara setelah dipotong enzim EcoRI dan ClaI polanya sama dengan ToYLCV yang menginfeksi tomat, tetapi berbeda dengan ToMoV. Hasil penelitian Hidayat *et al.* (1999) menunjukkan bahwa pola enzim retriksi virus cabai isolat Cugenang berbeda dengan virus cabai isolat Segunung dan sama dengan isolat Baranangsiang. Dengan metode yang sama Sudiono *et al.* (2001) berhasil menganalisis pola enzim restriksi dari fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR dan menunjukkan adanya strain geminivirus yang berbeda pada tomat, yaitu isolat Bandung, Cisaat, dan Cibeunying adalah sama, tetapi berbeda dengan isolat Ciloto, Aidawati (2006) menambahkan dengan PCR-RFLP (enzim retriksi BamHl, EcoRI, HindIII dan Pstl) didapatkan isolat-isolat geminivirus pada tomat dari lokasi yang berbeda mempunyai keragaman yang berbeda. Selain itu, keragaman geminivirus dapat juga dilakukan berdasarkan analisis runutan susunan asam nukleatnya.

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan melalui kegiatan survei dan pengambilan sampel di Kabupaten Lima Puluh Kota dan isolasi DNA tanaman di Laboratorium Pemuliaan dan Bioteknologi Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Penelitian ini telah dilaksanakan dari bulan Juli 2011 – Januari 2012 (Lampiran 1).

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tabung mikro (*eppendorf*), tip, pistil plastik, *waterbath*, *microcentrifuge*, mesin PCR, bak elektroforesis, *UV transiluminator* (dokumen gel), mesin ABI-Prisma 3100-*Avant genetic analyzer*. Bahan yang digunakan yaitu alkohol, sampel daun tanaman tembakau yang terinfeksi Geminivirus, pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715, larutan buffer (Tris 0,1 M (pH 9,0), EDTA 0,1 M, SDS 1%), potassium asetat (8 M), fenol : kloloforom (1:1), etanol absolut, etanol 70%, TBE, lamda DNA, *gel agarosa* 1%, pewarna etidium bromida, *loading day*, air bisteril (ddH_2O), *tissue* dan alat tulis.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian laboratorium dalam bentuk deskriptif, dengan menganalisis runutan asam nukleat dari masing-masing isolat geminivirus yang berasal dari Kabupaten Lima Puluh Kota yang merupakan sentra tanaman tembakau di Sumatera Barat dengan menetapkan 2 kecamatan yaitu kecamatan Sungai Kamuyang dan Situjuah Limo Nagari dengan teknik pengambilan sampel menggunakan metode *purposive random sampling*. Dari masing-masing kecamatan diambil satu jorong dan dari jorong tersebut diambil tiga lahan pertanaman tembakau milik petani (Lampiran 2), sedangkan untuk menghitung persentase serangan dan intensitas penyakit menggunakan metode rancangan acak sistematis (Rivai, 2006) (Lampiran 3). Tahapan penelitian ini terdiri dari isolasi DNA dengan metode Dellaporta *et al.* (1983), amplifikasi DNA dengan pasangan

primer PAL1v 1978 dan PAR1c715 . Amplifikasi dilakukan dengan metode Rojas *et al.* (1993), dan produk hasil amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) disekuensing menggunakan mesin ABI-Prisma 3100-*Avant genetic analyzer*. Hasil sekuensing digunakan dalam analisis filogenik untuk melihat kekerabatan isolat.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Pengambilan Sampel Tanaman Sumber Virus dan Penghitungan Tingkat Serangan Penyakit Kerupuk di Lapangan

Pengambilan sampel tanaman sumber isolat virus dengan syarat yang ditentukan berdasarkan variasi gejala di lapangan dan dilakukan karakterisasi gejala penyakit pada tanaman tembakau seperti gambar di bawah ini :

Gambar 1. Tanaman tembakau terserang virus kerupuk di lapangan

Penghitungan persentase dan intensitas tanaman terserang dengan metoda rancangan acak sistematis dengan menetapkan 20% tanaman sampel yang mewakili seluruh tanaman tembakau di lapangan. Cara pengambilan tanaman sampel dimulai dari bedengan pertama dan tanaman pertama yang di tetapkan sebagai sampel pertama, setiap bedengan diambil empat tanaman sampel sampai bedengan ke 20 dengan jumlah tanaman sampel 40 batang tanaman tembakau (Lampiran 3).

3.4.2 Isolasi DNA Tanaman

Sampel-sampel daun tembakau yang terinfeksi geminivirus diisolasi DNA-nya dengan metode Dellaporta *et al.,* (1983) yang dimodifikasi. Sampel daun tanaman (± 100 mg) dimasukkan ke dalam tabung mikro (*eppendorf*), ditambahkan 100 µl bufer (Tris 0,1 M (pH 9,0), EDTA 0,1 M, SDS 1%) kemudian digerus dengan pistil plastik. Setelah digerus sampel diinkubasi selama 30 menit pada suhu 65^0C dalam *waterbath*. Selanjutnya 3,5 µl potassium asetat (8 M) ditambahkan, dan tabung disimpan dalam lemari pendingin selama 30 menit pada suhu -20^0C. Selanjutnya disentrifugasi selama 15 menit dengan menggunakan *microcentrifuge* pada kecepatan 10.000 rpm. Setelah disentrifugasi supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru dan diekstraksi sebanyak satu kali dengan campuran fenol : kloroform (1:1). Setelah disentrifugasi lapisan atas dipindahkan ke tabung mikro, ditambahkan 2,5 x volume etanol absolut, dicampur dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu -20^0C. Setelah itu, tabung mikro disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 10.000 rpm. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 500 µl etanol 70% dan disentrifugasi. Setelah itu etanol dibuang, pelet dikeringanginkan selama 15 menit dalam vakum, kemudian dilarutkan dalam 25 µl air bisteril (ddH_2O).

3.4.3 Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

DNA hasil ektraksi diamplifikasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) berdasarkan metode Rojas *et al.* (1993). Primer yang digunakan adalah : 1). PAL1v 1978 (5'-GCATCTGCAGGCCCACATYGTCTTYCCNGT-3') dan 2). PAR1c 715 (5'-GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA-3') yang dirancang untuk mengamplifikasi gen yang menyandikan protein untuk

MILIK
UPT PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS ANDALAS

replikasi, *common region* dan selubung protein. Setiap reaksi PCR (25 µl) terdiri atas 1 µl DNA templet, 1 µl masing-masing primer (PAL1v 1978 dan PAR1c 715), 1,5 unit Taq polymerase 0,2 µl , buffer 2,5 µl, $MgCl_2$ 1 µl dan dNTPs 0,5 µl (Amersham Pharmacia Biotech) dan ddh_2O 17,8 µl. Amplifikasi DNA dilakukan sebanyak 30 siklus yang melalui tiga tahap yaitu pemisahan utas DNA pada suhu 94^0C selama 1 menit, penempelan primer pada 55^0C selama 2 menit dan sintesis DNA pada 72^0C selama 2 menit (Rojas *et al.,* 1993). Khusus untuk siklus terakhir ditambah tahapan sintesis selama 10 menit, kemudian siklus berakhir dengan suhu 4^0C.

3.4.4 Elektroforesis

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel agarosa 1% dalam bufer Tris-borate EDTA (TBE) 0,5 X dengan tegangan 50 dan 100 volt (Maniatis *et al.*, 1989 dimodifikasi) dan diamati dengan UV transiluminator setelah diberi pewarna dengan etidium bromida.

3.4.5 Perunutan Asam Nukleat Produk Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR dari primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 digunakan untuk perunutan DNA (sekuensing) untuk mempelajari keragaman genetik antar isolat dari daerah yang berbeda. Perunutan DNA menggunakan ABI PRISMA model 3100 versi 3,7 yang dilaksanakan di Laboratorium Dasar Universitas Andalas Padang dan PT. Genetika Jakarta.

3.4.6 Analisis Keragaman Genetik

Hasil perunutan DNA dianalis menggunakan program NCBI BLAST (http://www.nebi.nlm.nih.gov/BLAST) untuk melihat kesamaan genetiknya dibandingkan dengan runutan asam nukleat (DNA) yang ada di GeneBank. Analisis keragaman berdasarkan runutan DNA daerah "*top region*" dilakukan menggunakan program Online Analysis Tools Phylogene (www.Genebee.msu.su/servisce)

3.5 Parameter Pengamatan

3.5.1 Karakterisasi Gejala Penyakit Kerupuk di Lapangan

Karakterisasi gejala diamati pada pertanaman tembakau di lapangan. Pengamatan meliputi : warna daun dan bentuk daun. Hasil pengamatan ditampilkan dalam bentuk deskripsi gejala dan gambar yang diambil di lapangan.

3.5.2 Persentase Serangan dan Intensitas Penyakit

3.5.2.1 Persentase Tanaman Terserangan

Persentase serangan (%) diamati pada tiap lokasi sampel dengan menggunakan rumus :

$$P = \frac{a}{b} \; x \; 100\%$$

Keterangan :

P = Persentase tanaman terserang

a = jumlah tanaman sakit

b = jumlah tanaman keseluruhan

3.5.2.2 Intensitas Penyakit

Intensitas penyakit kerupuk tembakau diamati berdasarkan pada kategori serangan skala yang dikemukakan oleh Lapidot *et al.* (2001) yang dimodifikasi (Tabel 1). Intensitas penyakit dihitung menggunakan rumus :

$$I = \frac{\sum(ni \; x \; vi)}{N \; x \; z}$$

Keterangan :

I = Intensitas daun yang terserang

ni = Jumlah daun yang diamati dari setiap kategori skala

vi = Nilai skala dari setiap kategori

N = Jumlah daun yang diamati

Z = Nilai skala yang tertinggi

Tabel 1. Kriteria skala kerusakan penyakit kerupuk pada tembakau (Lapidot *et al.*, 2001. dimodifikasi).

Skala	Kriteria kerusakan *Tobacco Leaf Curl Virus* (TLCV)	Tingkat kerusakan (%)
0	Tidak ada gejala	0
1	Daun keriting dimulai pada daun muda	1-20
2	Semua daun hampir keriting	>20-40
3	Daun keriting, dan melengkung keatas, daun-daun mengecil dan tanaman masih tumbuh	>40-60
4	Tanaman kerdil, daun muda sudah keriting dan melengkung keatas dan pertumbuhan sudah terhenti	>60

Tabel 2. Kriteria tingkat keparahan serangan tanaman tembakau terhadap infeksi geminivirus (Green and Kaloo, 1994. dimodifikasi).

Persentase serangan (%)	Kriteria Serangan
0	Tidak ada
X≤10	Ringan
10<X≤20	Sedang
20<X≤30	Berat
30<X≤50	Sangat berat
X>50	Fuso

3.5.3 Optimasi Isolasi DNA

Optimasi isolasi DNA dilakukan untuk mendapatkan kualitas DNA yang baik. Metode standar yang digunakan yaitu metode Dellaporta *et al.* (1983) dengan melakukan beberapa modifikasi pada tahapan-tahapannya.

3.5.4 Optimasi Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Optimasi PCR dilakukan untuk mendapatkan komposisi PCR dan hasil amplifikasi DNA yang baik. Hidayat *et al.* (2008), mengatakan bahwa amplifikasi DNA tembakau yang terinfeksi geminivirus menggunakan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 menghasilkan fragmen DNA berukuran 1600 bp.

3.5.5 Karakterisasi Sekuen Fragmen Hasil Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Parameter karakterisasi molekuler dilakukan berdasarkan hasil perunutan asam nukleat (DNA) dari bagian *Top Region* dan membandingkan dengan runutan DNA yang terdapat dalam data GeneBank.

3.5.6 Analisis Filogenetik Geminivirus

Keragaman di antara isolat-isolat geminivirus dianalisis dengan cara membandingkan kekerabatan isolat geminivirus penyebab penyakit kerupuk tembakau dengan data GeneBank dan data isolat cabai Geminivirus Sumatera Barat (Tabel 3). Hasil analisis filogenetik tersebut berupa dendogram kesamaan genetik yang menunjukkan hubungan kesamaan antar isolat.

Tabel 3. Daftar geminivirus yang digunakan untuk analisis kekerabatan dengan isolat tembakau Sumatera Barat.

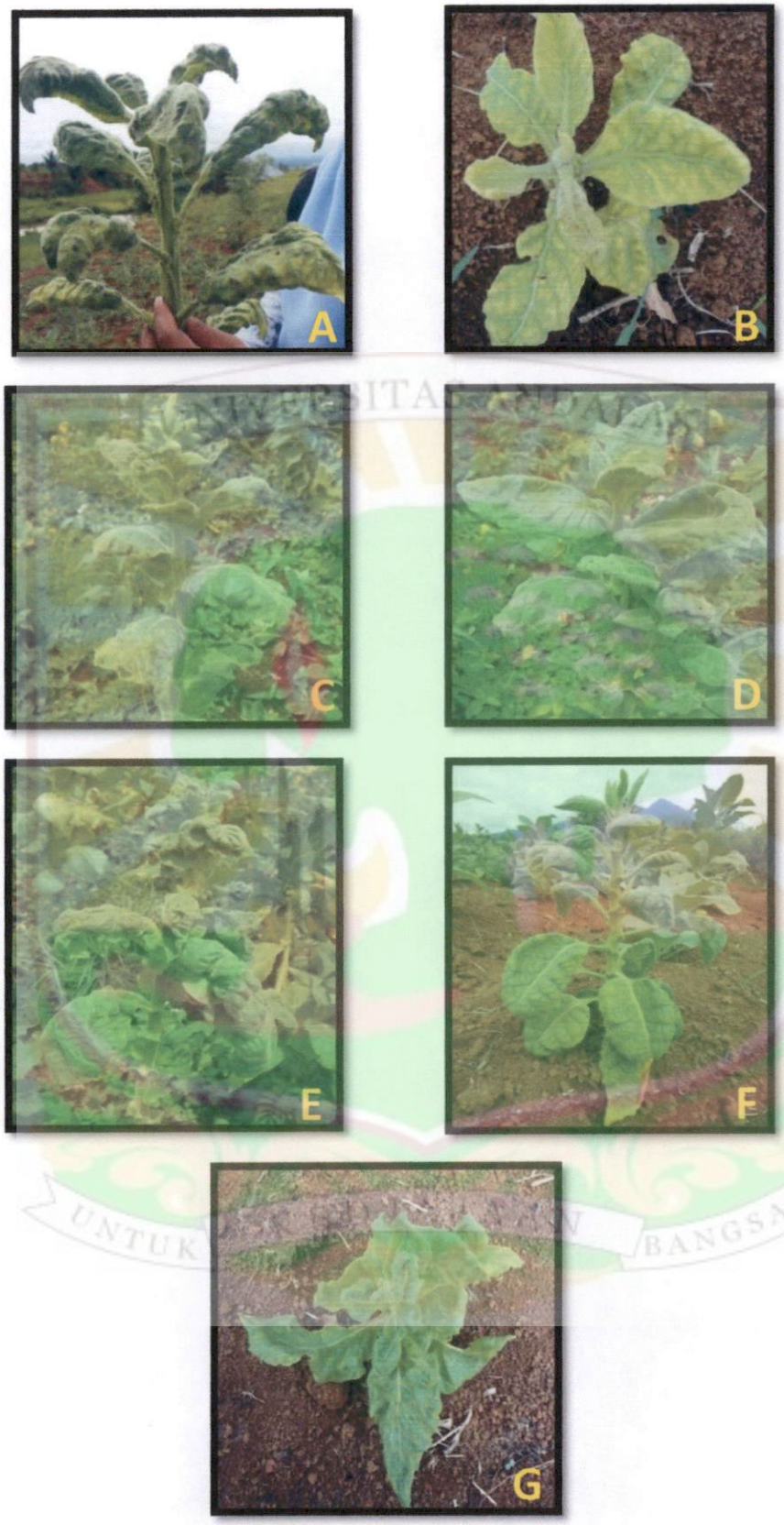
No.Asesi Genebank	Organisme	Kode isolat	Asal Geografi	Tanaman Inang	Asal Isolat
AB267838.1	*Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus (Ageratum conyzoides)*	PYLCIVAg	Indonesia	Babadotan	GeneBank
AB267834.1	*Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus (Bogor)*	PYLCIVBo	Indonesia, Bogor	Cabai	GeneBank
AB267836.1	*Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus (Tomato)*	PYLCIVTo	Indonesia	Tomat	GeneBank
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Pesisir Selatan Virus*	PepPS1-1	Indonesia, Sumatera Barat, Pesisir Selatan.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Tanah Datar Virus*	PepTD1-1	Indonesia, Sumatera Barat, Tanah Datar.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Payakumbuh Virus*	PepPYK1	Indonesia, Sumatera Barat, Payakumbuh.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Solok Virus*	PepSO2-1	Indonesia, Sumatera Barat, Solok.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Agam Virus*	PepAG1-4	Indonesia, Sumatera Barat, Agam.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Pepper Yellow Leaf Curl Kab.pasaman Barat Virus*	PepPBST2-2	Indonesia, Sumatera Barat, Kab.Pasaman barat.	Cabai	Trisno (2010)
-	*Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat Virus*	ToLCSBV	Indonesia, Sumatera Barat, Kab. 50 Kota.	Tembakau	Isolat yang diteliti

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakterisasi Gejala Penyakit Kerupuk di Lapangan

Berdasarkan pengamatan di lapangan dari 6 lahan di kecamatan yang berbeda ditemukan beragam karakterisasi gejala (Gambar 2). Gejala yang umum ditemukan adalah daun keriting, tepi daun melengkung ke bawah dan atau ke atas permukaan daun, terjadi enasi, daun menebal dan kecil-kecil. Variasi gejala yang ditemukan meliputi a) tepi daun melengkung ke bawah, tulang daun berwarna hijau pekat, daun mengecil dan daun berwarna kuning (Gambar 2.A); b) tepi daun melengkung ke bawah permukaan dan ke atas permukaan daun, tulang daun menghijau dan jaringan daun di sekitar menguning, daun menebal dan kecil-kecil, daun muda mengecil dan keriting (Gambar 2.B); c) tepi daun melengkung ke bawah permukaan daun, daun menebal, daun mosaik dan keriting pada daun muda (Gambar 2.C); d) tepi daun melengkung ke bawah, daun mengeriting, sebagian daun kecil-kecil dan terjadi pembentukan enasi (Gambar 2.D); e) tepi daun melengkung ke bawah, mengeriting, mengecil pada daun muda dan enasi (Gambar 2.E); f) tepi daun melengkung ke bawah dan ke atas permukaan, daun menebal, daun kecil-kecil, daun berwarna hijau tua (Gambar 2.F); g) tepi daun melengkung ke bawah permukaan daun, daun muda mengecil dan mengeriting (Gambar 2.G).

Dari berbagai karakterisasi gejala penyakit kerupuk yang ditemukan di lapangan dapat disimpulkan bahwa gejala penyakit kerupuk adalah tepi daun melengkung ke atas dan atau ke bawah permukaan daun, daun menebal, daun mengeriting/helaian daun tidak rata, tulang daun berwarna hijau pekat, terjadi pembentukan enasi, daun mengecil dan tanaman kerdil. Osaki dan Inouye (1978) *cit* Aidawati (2000) melaporkan bahwa *Tobacco Leaf Curl Virus* di Jepang identik dengan *Tomato Yellow Dwarf Virus*. Pada tembakau, *Tobacco Leaf Curl Virus* umumnya mengakibatkan pertumbuhan tanaman terhambat, batang terpilin, daun melengkung dan berkerut dengan ukuran yang lebih kecil daripada yang normal, tulang daun terpilin dan sepanjang tulang daun sering terbentuk penebalan berwarna hijau.



Gambar 2. Variasi gejala penyakit kerupuk pada daun tembakau di Kabupaten Lima Puluh Kota. (A,G) Sungai Kamuyang lahan 1, (B,F) Sungai kamuyang lahan 2, (C,D,E) Situjuah Limo Nagari lahan 1.

Thung (1932) *cit* Trisusilowati (1989) membedakan tiga gejala kerupuk pada tanaman tembakau yang terinfeksi virus kerupuk tembakau yaitu gejala kerupuk biasa (*common* kerupuk), keriting (*curl* kerupuk) dan kerupuk jernih (*transparent* kerupuk). Tanaman dengan gejala kerupuk biasa menunjukkan tepi daun yang melengkung ke bawah permukaan daun, helain daun tidak merata, tulang daun pada permukaan bawah daun tampak berkelok-kelok dengan penebalan pada tempat-tempat tertentu yang sering berkembang menjadi enasi. Tanaman yang menunjukkan gejala keriting, tampak seluruh bagian tepi daunnya melengkung ke arah permukaan bawah daun, bagian helain daun diantara tulang-tulang daun lateral tereduksi sehingga tampak bergelombang dan pada permukaan bawah daun tulang daun berkelok-kelok serta terjadi pembentukan enasi. Pada gejala kerupuk jernih tanaman menunjukkan tepi daun yang melengkung ke arah permukaan atas daun, tidak terjadi penebalan tulang daun dan pembentukkan enasi tetapi tulang daun terutama tulang-tulang daun lateral menjadi jernih.

Trisusilowati (1989) melaporkan bahwa gejala virus kerupuk tembakau pada tanaman tembakau di Jember (Jawa Timur) sangat bervariasi. Dari hasil inokulasi dengan penyambungan dibedakan dua tipe virus kerupuk tembakau yaitu isolat 1 dan isolat 2 . Isolat 1 menyebabkan perubahan bentuk daun dengan tepi helain daun yang sebagian besar menggulung ke arah permukaan atas dan ada juga yang melengkung ke bawah, tulang daun tengah dan tulang daun lateral berkelok-kelok, sehingga permukaan helaian daun berkerut tidak beraturan dan terjadi penebalan tulang daun yang kadang-kadang disertai enasi. Isolat 2 menyebabkan gejala yang hampir menyerupai isolat 1, tetapi disertai dengan terbentuknya penebalan anak tulang daun yang tampak dari permukaan bawah daun seperti kerutan dengan warna lebih hijau daripada yang tidak mengalami penebalan. Bentuk penebalan ini merupakan salah satu bentuk dari enasi dan merupakan ciri gejala yang membedakan dengan gejala kerupuk yang lain.

4.2 Persentase dan Intensitas Serangan Penyakit Kerupuk pada Tanaman Tembakau di Lapangan

Hasil pengamatan persentase dan intensitas serangan penyakit kerupuk di masing-masing lokasi dapat dilihat pada Tabel 4 dan intensits serangan pada Tabel 5.

Tabel 4. Persentase Serangan Penyakit Kerupuk di Kabupaten 50 Kota

Lokasi Pengambilan Sampel	Lahan			Rata-Rata (%)
	1	2	3	
Situjuah Limo Nagari	40%	5%	27,5%	24,1%
Sei. Kamuyang	37,5%	25%	15%	25,8%

Tabel 5. Intensitas Penyakit Kerupuk Di Kabupaten 50 Kota

Lokasi Pengambilan Sampel	Lahan			Rata-Rata (%)
	1	2	3	
Situjuah Limo Nagari	26,3%	2,5%	15,6%	14,8%
Sei. Kamuyang	24,4%	20%	14,4%	19,6%

Pada Tabel 4 dan 5 dapat di lihat bahwa rata-rata persentase serangan tertinggi adalah 25,8% dan intensitas serangan 19,6% pada Sei. Kamuyang. Berdasarkan pada kriteria tingkatan keparahan serangan tanaman tembakau terhadap infeksi geminivirus tergolong pada kriteria berat (Tabel 2) (Green dan Kaloo, 1994). Pada Tabel 4 terlihat bahwa penyakit virus kerupuk telah tersebar di areal pertanaman tembakau di Kabupaten Lima Puluh Kota dengan persentase serangan tertinggi pada Nagari Situjuah Limo Nagari lahan 1 40% dengan intensitas 26,3% (Tabel 5). Hal ini diduga karena penyakit kerupuk menyebar melalui serangga vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci*) ordo : *Hemiptera*; famili : *Aleyrodidae* dan adanya gulma babadotan (*Ageratum conyzoides*) yang ditemukan di lapangan. Gulma babadotan merupakan inang alternatif serta sumber inokulum dari geminivirus. Persentase serangan terendah pada lahan 2 Situjuah Limo Nagari (5%) dengan intensitas 2,5%. Hal ini disebabkan karena kondisi lingkungan atau lahan tanaman tembakau dirawat oleh petani sehingga tidak ditemukan gulma atau tanaman inang lain yang bisa menjadi sumber inokulum dari geminivirus. Semangun (2008) menyatakan pada waktu di kebun tidak

terdapat tanaman tembakau, virus dapat bertahan pada babadotan (*Ageratum conyzoides*), srunen (*Synedrella nodiflora*), nyawun (*Vernonia cinerea*), kembang kertas (*Zinnia elegans*) dan tomat (*Lycopersicon esculentum*). Tiga tumbuhan yang pertama adalah gulma yang umum terdapat di kampung, makam, pematang, tepi jalan dan sebagainya. Dari tumbuhan ini kutu kebul (*Bemisia tabaci*) menularkan virus ke tanaman lain. Apabila petani tembakau melakukan sanitasi terhadap gulma pada lahan tanaman tembakau maka, virus ini tidak akan menyebar luas ke tanaman lain.

Beberapa jenis tumbuhan liar, gulma dan tanaman indikator seperti *Physalis floridana*, *Datura stramonium*, *Hyptis brevipes*, *Ageratum conyzoides* (babadotan), *Crotalaria juncea* (orok-orok) yang biasa tumbuh liar di sekitar pertanaman cabai ternyata rentan terhadap serangan geminivirus isolat Segunung. *Physalis* sp., *Datura* sp., dan beberapa jenis gulma dari famili Solanaceae telah dilaporkan menjadi inang alternatif geminivirus (Torres-Patcheco *et al.* 1996; Sanchez-Campos *et al*. 1999; Sulandari *et al.*, 2006).

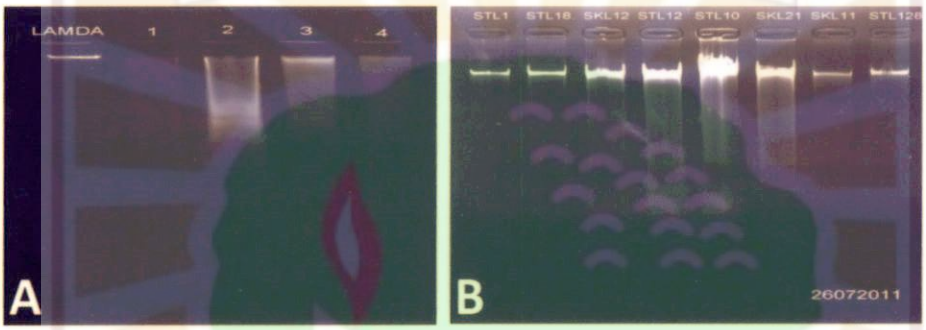
Penularan dan penyebaran penyakit kerupuk pada tanaman tembakau banyak ditularkan melalui serangga vektor yaitu *Bemisia tabaci* (kutu kebul). Hasil penelitian Trisusilowati (1989) menunjukkan virus penyakit kerupuk dapat ditularkan melalui penyambungan dan imago *Bemisia sp.* sebagai serangga vektor. Satu ekor *Bemisia sp.* yang berasal dari tomat dan *Ageratum conyzoides* sakit dapat menularkan virus kerupuk ke tembakau sehat, sedangkan penularan dari tembakau yang terinfeksi ke tembakau sehat memerlukan tiga ekor serangga per tanaman. Kisaran inang virus kerupuk tembakau meliputi tomat, *Solanum khasianum, Nicotiana glutinosa* dan *A.conyzoides.*

Penyebaran virus kerupuk tembakau tidak dapat ditularkan dengan cairan perasan tanaman sakit dan tidak terbawa benih. Virus kerupuk tembakau dapat ditularkan dengan penyambungan dan serangga vektor dari famili *Aleyrodidae* yaitu *B.tabaci* secara persisten dan tidak ditularkan ke keturunannya (Brunt *et al.*, 1990). Sampai saat ini belum dilaporkan serangga selain spesies dari Aleyrodidae yang dapat berperan sebagai vektor virus kerupuk (Aidawati, 2000). Thung (1932) *cit* Trisusilowati (1989) tidak berhasil menularkan virus kerupuk tembakau melalui *Thrips* dan *Myzus persicae* Sulzer. Menurut Wolf *et al.*, (1949) *cit*

Aidawati (2000) *Dycyphus minimis* juga tidak berperan sebagai vektor virus kerupuk tembakau.

4.3 Optimasi Isolasi DNA Tembakau

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan metode Dellaporta *et al.*(1983). Langkah awal yang dilakukan adalah isolasi DNA total tanaman dari sampel-sampel yang menunjukkan gejala penyakit kerupuk di lapangan. Hasil isolasi DNA didapatkan 20 isolat DNA dari 6 lokasi. DNA hasil isolasi dapat dilihat pada Gambar 3.

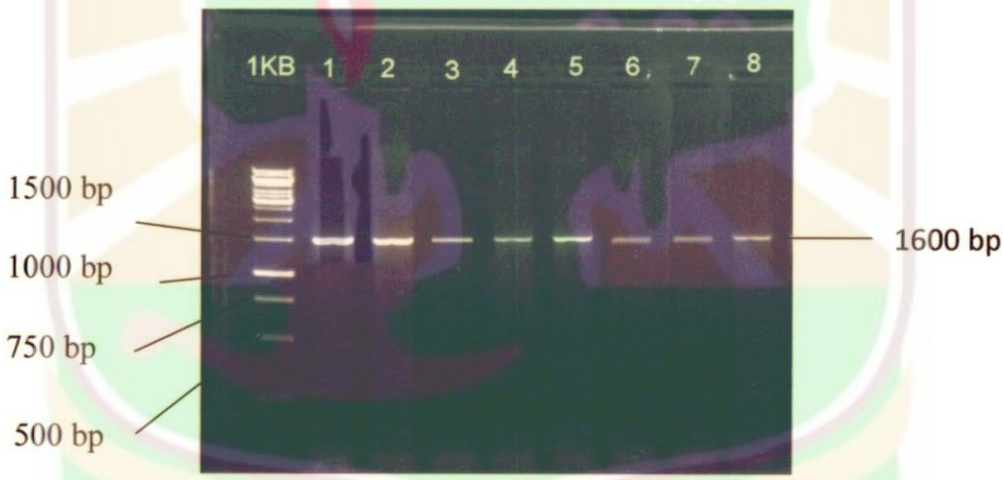


Gambar 3. A. DNA dengan kualitas dan kuantitas kurang baik. B. DNA dengan kualitas dan kuantitas baik.

Hasil isolasi DNA menggunakan metode Delaporta *et al.* (1983) terhadap 20 sampel menghasilkan DNA dengan konsentrasi rata-rata yang cukup tinggi yaitu ± 100 ng/µl. Nilai konsentrasi ini didapatkan dengan cara membandingkan ukuran ketebalan pita DNA dari isolat sampel dengan lamda DNA yang konsentrasinya diketahui. Konsentrasi tersebut merupakan jumlah yang cukup banyak dan mencukupi untuk dilakukan analisis PCR. Disamping itu, kualitas DNA yang didapatkan sangat baik. Kualitas DNA dapat dinilai berdasarkan bentuk pita hasil elektroforesis isolasi DNA, ditandai adanya fragmen-fragmen yang *smear*. DNA dengan kualitas kurang baik akan terlihat banyaknya fragmen-fragmen *smear* (Gambar 3A). Fragmen *smear* merupakan indikasi keberadaan fragmen-fragmen kecil terputus yang terbentuk pada saat penggerusan/perusakan sel-sel secara mekanis. Hasil isolasi DNA sampel terlihat sedikit fragmen-fragmen *smear* bahkan tidak ada sama sekali (Gambar 3B) sehingga kualitas dan kuantitas DNA hasil isolasi sudah memenuhi syarat dan dapat digunakan dalam tahap analisis selanjutnya.

4.4 Optimasi Amplifikasi DNA dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

DNA hasil isolasi diamplifikasi untuk mendeteksi keberadaan virus dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi menggunakan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 yang dirancang dari gen pengkode intergenik sekuen (*Top Region*). Dari 20 isolat DNA yang didapatkan setelah diamplifikasi dengan teknik PCR ditemukan 10 isolat DNA virus yang terdeteksi tergolong pada gemivirus, tetapi untuk dianalisis lebih lanjut hanya 7 isolat karena, 3 isolat yang teramplifikasi hasil fragmen DNA kurang bagus atau tipis sekali sehingga tidak bisa dianalisis lebih lanjut dibandingkan 7 isolat yang lain. Karakterisasi gejala dari 3 isolat ini mirip dengan karakterisasi gejala pada Gambar 2B, 2D dan 2E. Hasil amplifikasi PCR 7 isolat DNA virus yang terdeteksi dapat dilihat dari hasil elektroforesis dengan fragmen DNA berukuran 1600 bp (Gambar 4).



Gambar 4. Produk PCR hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715. Marker (1 kb Ladder), 1: kontrol positif (isolat cabai), 2-8 : Sampel Geminivirus Tembakau Kab. 50 Kota.

Hasil deteksi dan identifikasi dengan teknik PCR menggunakan primer universal geminivirus PAL1v 1978 dan PAR1c 715 membuktikan penyebab penyakit tersebut adalah geminivirus. Hal tersebut ditunjukkan dengan teramplifikasinya fragmen DNA yang berukuran 1600 bp. Menurut Rojas *et al.* (1993) hal tersebut sesuai dengan ukuran yang diharapkan apabila menggunakan primer universal geminivirus tersebut. Deteksi dan identifikasi geminivirus dengan teknik PCR terbukti cepat, akurat dan dapat digunakan untuk mendeteksi sampel daun yang kering maupun sampel daun yang segar (Rojas *et al.,* 1993; Sulandari, 2004).

Dari 20 sampel yang diamplifikasi dengan teknik PCR, 10 sampel atau isolat yang tidak terdeteksi menunjukkan gejala yang berbeda dengan isolat yang terdeteksi geminivirus. Diduga isolat yang tidak terdeteksi menggunakan pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 merupakan jenis virus lain. Pasangan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 akan mengamplifikasi bagian genom geminivirus yang mencakup daerah *common region*, sebagian gen replikasi dan sebagian gen selubung protein (Rojas *et al.,* 1993).

Hasil Hidayat *et al.* (2008) dan Aidawati *et al.* (2002) mengatakan bahwa amplifikasi fragmen DNA tembakau yang terifeksi geminivirus berukuran 1600 bp dengan menggunakan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715. Amplifikasi fragmen DNA dilakukan pada bagian *top region*. Hidayat *et al.* (1999); Sulandari (2004) dan Trisno (2010) menemukan hal yang sama bahwa amplifikasi DNA cabai yang terinfeksi geminivirus dengan menggunakan primer PAL1v 1978 dan PAR1c 715 menghasilkan fragmen DNA berukuran 1600 bp.

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA

4.5 Karakterisasi Sekuen Fragmen Hasil Amplifikasi PCR

Untuk karakterisasi sekuen hanya 1 isolat yang disekuensing dan dianalisis lebih lanjut. Isolat yang disekuensing berasal dari Sungai Kamuyang yang diberi kode ToLCSBV (*Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat Virus*) dengan karakterisasi gejala dapat dilihat pada Gambar 2G dan urutan DNA pada Gambar 5.

ToLCSBV (*Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat Virus*)

AAGGGACCTGAGGAGCAATGTGAGGCTTGCAGATGCACAGAATATTGTAC
TACTCTGTGCTTAATACCATTACCTCTTGTGAAACGAGAAACGAAACGGC
CTTCCCAATATTTGTGATGACATGCCGCTGTTCAAAAGATTGGACCTTAC
ATTGTCCTTCACAACCCCGCGGAACATCACTGCTCCTTCGACCCTGGAAA
TCTGGGTTTCCGAGTCGGGGGGAGATTTACCCCTGCTCTTCCTTTGCACC
ACGTGCCTGGGGCATGGGGGCAGCAGCAGGGAGACTGTACTGACTCGCAT
ATTTTAATCTCCGGCGTGTTATATACATTGGCATCGACGACACTGTATCG
ATGGAACGCTTCTGGGTAATTTTTACACCGCAACAGACAAATTATATCCC
TCACGAATTCAACTCCAACCGTATCAGGAGAATACGTAGCCTCTAATCTT
TGCAAATACTTGATAGCCAACATGCATCGAAACCCGTGTAGGGTTTCCGG
AAAAGGATGAATAATCGGATCCCACATCCTTGGATAGTGGAGGGTGGTCC
CTATCTTTATGGTGGGCGACCCACTAATTAAGCTTTGCACATGCAACGTG
ATTGGTCAGTCAAAAGTTTGGCTTCTGGGACCACATCTCAAAAATTTTCG
CGGCACTCGGTAATATTATACGAGTGCCGCTTTAATCATTCAAGGGTGTA
CAAAATTACCTAGAAGCCCCTTATAGAACTTATGTAATATTGTCTCCCGT
CTCCAATATATGGGGAT

Gambar 5. Urutan DNA 1 isolat (ToLCSBV)

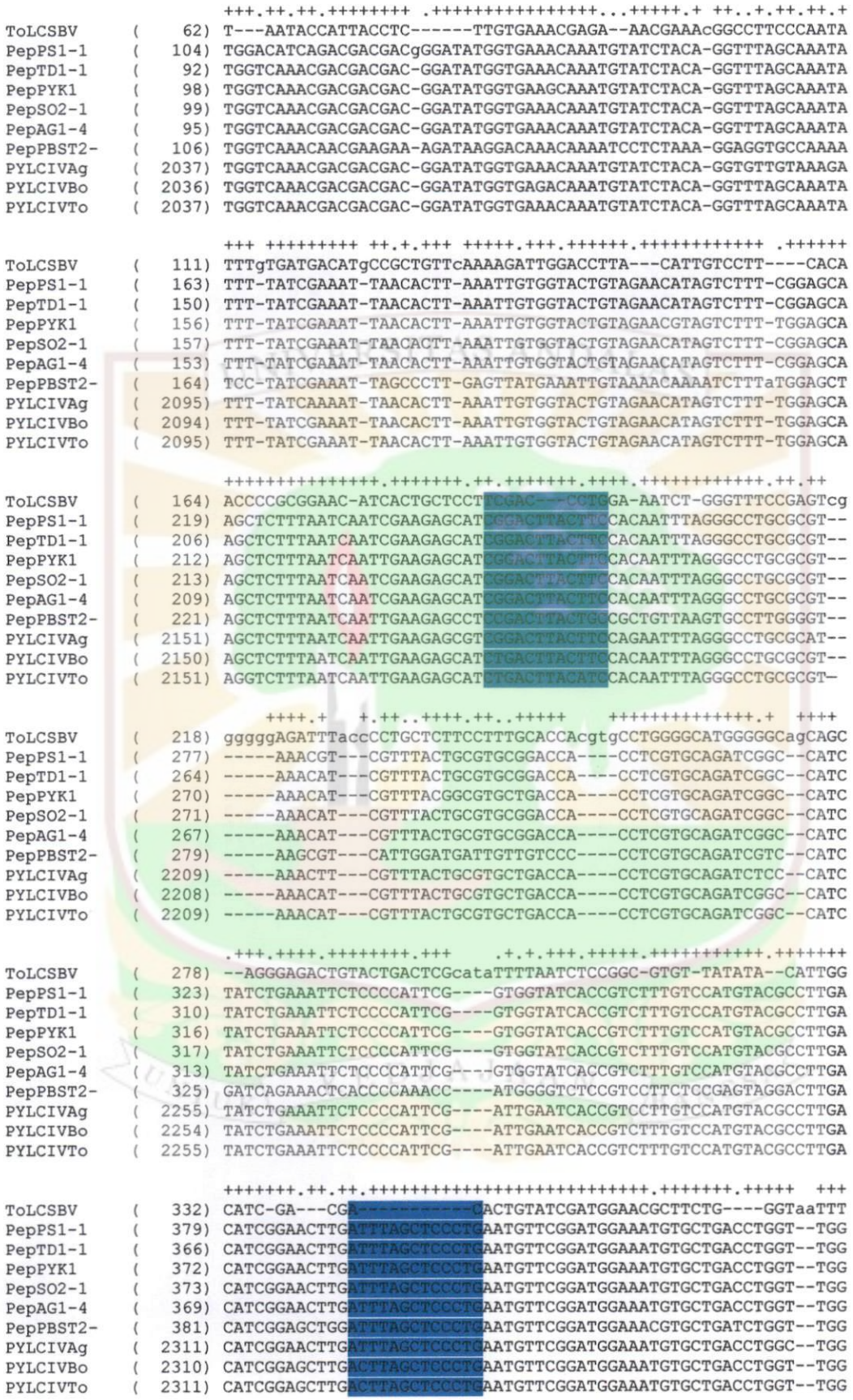
Data sekuen DNA 1 isolat selanjutnya di analisis tingkat kesamaan genetik menggunakan program NCBI BLAST yang dapat dilihat pada Tabel 6. Hasil perbandingan urutan DNA isolat ToLCSBV dibandingkan dengan data sekuen dari isolat geminivirus asal cabai Sumatera Barat (Trisno, 2010) dan data GeneBank dapat dilihat pada Tabel 3. Analisis kekerabatan menggunakan program Online Analysis Tools Phylogene dapat dilihat pada Gambar 6.

Sequences producing significant aligmants

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AB189845.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[Tomato2] C1, C4, V2, V1 genes f	894	894	94%	0.0	89%
AB189849.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[Tomato3] C1, C4, V1, V2 genes f	859	859	94%	0.0	88%
AB246170.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus C1, C4, V2, V1 genes for replicatio	856	856	94%	0.0	88%
AB267838.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[Ageratum] DNA, segment DNA-A,	761	868	89%	0.0	94%
DQ083764.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor, complete genome	756	756	80%	0.0	89%
DQ083765.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus isolate Bogor tomato, complete ge	750	750	80%	0.0	88%
AB267836.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus-[Tomato1] DNA, segment DNA-A,	745	745	80%	0.0	88%
AB189850.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus C4, V2 genes for putative C4 prote	734	734	94%	0.0	85%
AB267834.1	Pepper yellow leaf curl Indonesia virus DNA, segment DNA-A, complete ge	706	870	94%	0.0	94%

Tabel 6. Hasil analisis tingkat kesamaan genetik isolat ToLCSBV dengan geminivirus (data GeneBank) menggunakan program NCBI BLAST.

Berdasarkan analisis kekerabatan Geminivirus dengan isolat ToLCSBV menggunakan program NCBI BLAST diketahui bahwa isolat ToLCSBV dapat dikatakan tingkat kesamaan genetik sama dengan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* yang isolat berasal dari gulma babadotan (*Ageratum conyzoides*); No. Asesi AB267838.1 dan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus,* penyebab penyakit virus kuning keriting tanaman cabai No. Asesi AB267834.1 dengan tingkat kesamaan 94%, sedangkan tingkat kesamaan genetik dengan virus lain berbeda. Dari analisis ini dapat dipastikan bahwa ToLCSBV adalah Geminivirus. Rybicki (1998) menyatakan bahwa nilai identitas sekuen nukleotida dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu virus sebagai spesies. Nilai identitas >90% menunjukkan satu spesies atau galur yang sama sedangkan bila <90% merupakan spesies atau galur yang baru (tidak satu spesies atau satu galur). Hidayat *et al.* (2008) juga menambahkan penyakit kerupuk (*Tobacco Leaf Curl Virus*) pada tembakau di Jawa disebabkan oleh Geminivirus.



ToLCSBV (373) TTACACCGCAACAGACAA-ATTATATCCCT---CACGAATTCAAC-TCCAACCGTATCAG
PepPS1-1 (437) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTCGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGTATGAG
PepTD1-1 (424) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTCGTGCACACGTATTTTCCTTCGAATTGTATGAG
PepPYK1 (430) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTCGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGTATGAG
PepSO2-1 (431) GGATACCAGGTCGAAGCATCTGTTGTTCGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGTATGAG
PepAG1-4 (427) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTCGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGTATGAG
PepPBST2- (439) GGATACCAAATCGAAGAATCTGTTAGTCGTGCAGTTGTATTTCCCTTCGAACTGGACAAG
PYLCIVAg (2369) GGATACCAGGTCGAAGAATCGGTTGTTGGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGTACGAG
PYLCIVBo (2368) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTGGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGGAGGAG
PYLCIVTo (2369) GGATACCAGGTCGAAGAATCTGTTGTTGGTGCAGACGTATTTCCCTTCGAATTGGAGGAG
ToLCSBV (428) GA---GAATACGTAGCCTCTAATCTTTG-CAAATACTTGATAGccAACATGcaTCGAAAC
PepPS1-1 (497) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PepTD1-1 (484) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PepPYK1 (490) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PepSO2-1 (491) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PepAG1-4 (487) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PepPBST2- (499) CACGTGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGCTCTCTGCAG--ATCTTG--ATATATT
PYLCIVAg (2429) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PYLCIVBo (2428) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
PYLCIVTo (2429) CACATGGAGATGAGGGCTCCCATCTTCGTGAAGTTCTCTACAG--ATCTTG--ACAAACA
ToLCSBV (484) CCGTGTagggTTTCCGGA-----AAAGGATGAATAATCG---GA-TCCCACATCCTTGGA
PepPS1-1 (553) GCTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
PepTD1-1 (540) GCTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
PepPYK1 (546) GCTTGT----TGACAGGAGTGATGAGGGAT-TTTAATTGTTCGAGGGCCTCTTCTTTGGT
PepSO2-1 (547) GCTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
PepAG1-4 (543) GCTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
PepPBST2- (555) TCTTAT----TTGCCGGAGCGTT-AAGGATGTGTAATTGGGAAAGTGCTTCTTCATTAGT
PYLCIVAg (2485) ACTTGT----TGACAGGAGTGCTGAGGGAT-TTTAATTGTTCCAGTGCTTCTTCTTTGGT
PYLCIVBo (2484) GTTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
PYLCIVTo (2485) GTTTGT----TGACAGGAGTGTTGATGGAT-TTTAATTGTTCGAGTGCTTCTTCTTTGGT
ToLCSBV (535) -TAGTGGAGGGTGGTCCCTAtctttaTGGTGGGCGACCCACTAATTAAGCTTTGCACATG
PepPS1-1 (608) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTCTACTCTGTA-ACTTA
PepTD1-1 (595) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTACTCTGTA-ACTTA
PepPYK1 (601) -TAGAGAACAATGTGGGGTA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTGCTCTGTA-ACTTA
PepSO2-1 (602) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTACTCTGTA-ACTTA
PepAG1-4 (598) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTACTCTGTA-ACTTA
PepPBST2- (610) aAAAAGAGCACTGGGGGATA-------GGTGAGGAAAATAATTTTGGGGCTTTGCA-TGA
PYLCIVAg (2540) -TAGAGAACACTTTGG-ATA------TGTAAGG--AAATAGTTTTTACTCTGTA-ACTTA
PYLCIVBo (2539) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTGTTCTGTA-ACTTA
PYLCIVTo (2540) -TAGAGAACAGTGTGG-ATA------TGTTAAG--AAATAGTTTTTGTTCTGTA-TCTTA
ToLCSBV (594) CAACGTGATTGGTC-AGTCA---AAAGTTTGGCTTC------TGG-GAC---CAC----A
PepPS1-1 (657) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACA-TC-CTTCTA
PepTD1-1 (644) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTTTGTAT-TGGANACAATC-CTTCTA
PepPYK1 (651) AAACGACGTGGGGGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATCACTTCTA
PepSO2-1 (651) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATC-CTTCTA
PepAG1-4 (647) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATC-CTTCTA
PepPBST2- (662) AAACGACCT-GCTCGAGGCATTT----TTTATTTGGTGAATcGGGGGGCACTC----AAA
PYLCIVAg (2589) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGCGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATC-CTTCTA
PYLCIVBo (2588) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATCACTTCTA
PYLCIVTo (2589) AAACGACGT-GGTGGAGGCATTTGGAGTGTCGTTTT-GTAT-TGGAGACAATCACTTCTA
ToLCSBV (636) TCTCAAAAATTTTCGCGGCACTCGGTAATATTATAC-GAGTGCCGCTTT----AATC-AT
PepPS1-1 (712) TCCC-ATATATTGGGAGACA---GGAGACAATATAT--A-----CATAA----GTTCTAT
PepTD1-1 (701) TCCCCATATATT-GGAGACG---GGAGACAATATTT--A-----CATAA----GTTCTAT
PepPYK1 (709) TCCCTATGTATT-GGAGACA---GGAGACAATATAT---------ATAA----CTCCTAT
PepSO2-1 (707) TCCCCATATATT-GGAGACA--GGGAGACAATATAT--A-----CATAG----GTTCTAT
PepAG1-4 (703) TCCCCATATATT-GGAGACA---GGAGACAATATAT--A-----CCTAA---GGTTCTAT
PepPBST2- (713) GTCTTATGGACTCGGGGGTATGAGGGGGCAATATAT--AGTGCCCCTAA-----TGGGAT
PYLCIVAg (2645) TCCCTATGTATT-GGAGACA---GGAGACAATATATaCAAGTTCTATCTacaAGTTCTAT
PYLCIVBo (2645) TCCCTATGTATT-GGAGACA---GGAGACAATATAT---------ATAA----GTGCTAT
PYLCIVTo (2646) TCCCTATGTATT-GGAGACA---GGAGACAATATAT---------ATAA----CTCCTAT

```
                    .+.+++..+. ....+.+.+... .  ....+..+.......+++ +.++.+++ +++
ToLCSBV      (   690) TCAAGGGTGTACAAAATTACCTAGAA---GCCCCTT-------ATA----GAACT-TAT-
PepPS1-1     (   757) --AAGGGCTTC-TAGGTAATTTTGTA-CCCCCCTTGAATGATAAAA-GGGGCACT-CGT-
PepTD1-1     (   746) --AAGGGCTTC-TAGGTAATTTTGTA--CACCCTTGAATGATTAAG-GCGGCACT-CGT-
PepPYK1      (   752) --ATGGGCCTTACTACTTATTGGGCC--TATCCCCG---GGGTAAA-GCGGCACT-CGT-
PepSO2-1     (   753) -AAAGGGCTTC-TAGGTAATTTTGTA--CACCCTTGAATGATTAAA-GCGGCACT-CGTt
PepAG1-4     (   749) --AAGGGCTTC-TAGGTTATTTTTGT-ACCCCCTTGAATGATTAAAGGCGGCACT-CGT-
PepPBST2-    (   766) AATTGTAATTCGCAAATAAATTCAAAtTCAAATTTGAA--GTCAAAAGCGGGCCTcCGT-
PYLCIVAg     (  2701) --AAGGGTGTT-TAGGTAATTGTGTA--CACCCTTGAATGATTAAA-GCGGCACT-CGT-
PYLCIVBo     (  2688) --ATGGGCCTA-ACTATAAATTGGGC--CTAACCCG----GGTAAA-GCGGCACT-CGT-
PYLCIVTo     (  2689) --ATGGGCCTA-ACTATAAATTGGGC--CTAACCCG----GGTAAA-GCGGCACT-CGT-
```

Gambar 6. Perbandingan hasil sekuensing 1 isolat (ToLCSBV) geminivirus dengan sekuen isolat geminivirus asal cabai Sumatera Barat dan GeneBank.

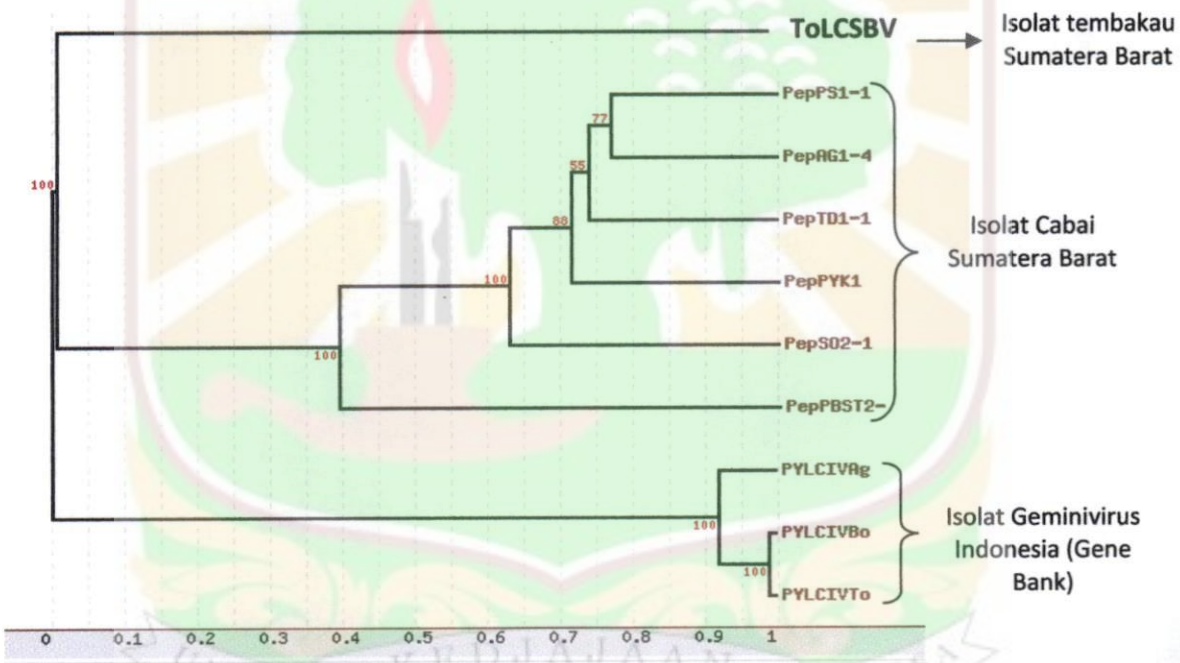
Berdasarkan Analisis Aligment (Perbandingan Urutan) Nukleotida isolat ToLCSBV dengan isolat geminivirus asal cabai dan GeneBank dapat kita ketahui bahwa urutan nukleotida ada yang mengalami mutasi. Dari aligment urutan nukleotida isolat ToLCSBV mengalami perubahan struktural berupa delesi (penghilangan satu atau beberapa nukleotida) dan insersi (penambahan nukleotida pada struktur DNA). Dari Gambar 6 mutasi delesi dapat dilihat pada urutan nukleotida ke 164, 332 dan 372 (ditandai dengan warna biru). Dari aligment ini terjadi delesi pada isolat ToLCSBV karena beberapa nukleotida pada isolat ToLCSBV hilang sedangkan isolat yang lain urutan nukleotida lengkap (tidak terjadi delesi). Mutasi insersi dapat dilihat pada urutan nukleotida ke 535, 610, 636, 713 dan 2645 (ditandai dengan warna merah). Pada aligment ini yang mengalami mutasi insersi yaitu isolat ToLCSBV, PepPBST2 dan PYLCIVAg karena, jika dibandingkan urutan nukleotiada isolat ToLCSBV, PepPBST2 dan PYLCIVAg dengan isolat lain terjadi penambahan/penyisipan pasangan basa sedangkan isolat yang lain mengalami perubahan atau pengurangan nukleotida (tidak ada pasangan basa).

Terjadinya mutasi yang berupa penambahan (insersi) dan pengurangan (delesi) suatu nukleotida pada umumnya merupakan mutasi yang mempunyai pengaruh sangat merusak. Oleh karena itu mutasi semacam ini dapat mengubah pola pembacaan (*reading frame*) suatu gen mulai dari tempat terjadinya mutasi tersebut sampai seterusnya. Mutasi yang mengubah pola pembacaan (*frameshift mutation*) mempunyai dua implikasi, pertama semua kodon mulai dari tempat terjadinya mutasi dan seterusnya akan menghasilkan urutan asam-asam amino yang berbeda dan kemungkinan merupakan polipeptida yang tidak fungsional.

Kedua, ada kemungkinan kodon terminasi tidak terbaca oleh karena pola pembacaannya berbeda sehingga translasinya akan berlangsung sampai di luar gen yang bersangkutan (Yuwono, 2006).

4.6 Analisis Filogenetik Geminivirus Berdasarkan Sekuen-Daerah *Common Region* (*Top Region*)

Analisis filogenetik isolat ToLCSBV digunakan untuk menentukan hubungan kekerabatan diantara geminivirus asal Asia (GeneBank) yang menginfeksi tembakau dan inangnya. Analisis ini didasarkan pada urutan DNA "*top region*" isolat ToLCSBV dibandingkan dengan isolat-isolat geminivirus dari GeneBank dan isolat geminivirus asal cabai Sumatera Barat (Trisno, 2010) (Tabel 3). Hasil analisis filogenetik dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Filogenetik kekerabatan isolat ToLCSBV geminivirus Sumatera Barat berdasarkan runutan DNA *Top Region* terhadap isolat-isolat geminivirus Indonesia dari data GeneBank dan data Trisno, 2010.

Berdasarkan analisis filogenetik menunjukkan bahwa terdapat 3 group yang berbeda. Group 1 terdiri dari 1 isolat yaitu : isolat ToLCSBV yang berasal dari isolate tembakau. Group 2 terdiri dari 8 isolat yaitu : isolat PepAg1-4, PepPS1-1, PepPYK1, Pep TD1-1, PepSO2-1 dan PepPBST2-2 berasal dari isolat cabai Sumatera Barat. Group 3 terdiri dari 3 isolat yaitu : PYLCIVAg, PYLCIVBo, PYLCIVTo berasal dari data GeneBank.

Dari analisis ini terlihat bahwa pengelompokkan terjadi menurut lokasi tanaman inang. Hal ini ditunjukkan oleh pengelompokkan group 1, 2 dan 3, dimana isolat yang berasal dari lokasi berbeda dan jenis tanaman inang yang berbeda maka pengelompokannya berbeda. Penelitian Trisno (2010) menemukan bahwa dari analisis filogeni 15 isolat geminivirus Sumatera Barat menunjukkan bahwa isolat-isolat Sumatera Barat berbeda dengan isolat-isolat dari Jawa, seperti *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* (PYLCIV) asal cabai, PYLCIV asal tomat, PYLCIV asal gulma *Ageratum conyzoides* (babadotan) dan *Tomato Leaf Curl Indonesia Virus.* Isolat-isolat dari Sumatera Barat membentuk 2 group dengan nilai bootstrap yang tinggi dengan nilai 98-100%.

Isolat ToLCSBV pengelompokkannya berbeda dengan isolat dari GeneBank dan isolat geminivirus Sumatera Barat. Isolat geminivirus Sumatera Barat asal cabai membentuk 1 kelompok dan isolat dari GeneBank juga membentuk 1 kelompok. Dari analisis filogenik ini dapat dipastikan bahwa isolat ToLCSBV merupakan isolat baru dengan dukungan nilai bootstrap 100% dan nilai kesamaan/ kemiripan 0% dengan isolat lain. Rybicki (1998) menyatakan bahwa nilai identitas sekuen nukleotida dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu virus sebagai spesies. Nilai identitas >90% menunjukkan satu spesies yang sama sedangkan bila <90% merupakan galur baru. Berdasarkan hal tersebut, secara tentatif ToLCSBV diusulkan merupakan galur baru dan diberi nama *Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat Virus.*

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan dapat disimpulkan bahwa :

1. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyakit kerupuk telah tersebar di Kabupaten Lima Puluh Kota dengan rata-rata persentase serangan 25,8% tergolong pada kriteria serangan berat dan intensitas serangan 19,6% dengan karakterisasi gejala yang beragam.
2. Hasil identifikasi didapat 10 isolat yang terdeteksi geminivirus dan 1 isolat yang disekuensing untuk dianalisis lebih lanjut.
3. Isolat geminivirus pada tanaman tembakau Kabupaten Lima Puluh Kota memiliki tingkat kesamaan genetik dengan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* isolat asal dari gulma babadotan (*Ageratum conyzoides*) dan *Pepper Yellow Leaf Curl Indonesia Virus* isolat asal cabai penyebab penyakit virus kuning keriting pada tanaman cabai dengan tingkat kesamaan genetik 94%.
4. Analisis filogenetik isolat geminivirus pada tanaman tembakau Kabupaten Lima Puluh Kota membentuk kelompok tersendiri dengan isolat geminivirus GeneBank dan cabai Sumatera Barat berdasarkan asal/lokasi isolat. Isolat geminivirus pada tanaman tembakau Kabupaten Lima Puluh Kota merupakan geminivirus galur baru, sehingga dapat disebut dengan *Tobacco Leaf Curl Sumatera Barat virus* (ToLCSBV).

5.2 Saran

Disarankan untuk pengujian lebih lanjut tentang virus kerupuk pada tembakau.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah, R dan Soedarmanto. 1986. Budidaya Tembakau. Penerbit C.V Yasaguna. Jakarta

Aidawati, N. 2000. Penularan Virus Kerupuk Tembakau dengan *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera : Aleyrodidae). Tesis Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Aidawati, N., S.H. Hidayat., R. Suseno., S. Sosrosumarsono. 2002. Tranmission of an Indonesian Isolat of *Tobacco leaf curl virus* (geminivirus) by *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aloyrodidae). Plant Pathol J. 18 (5): 231-236.

Aidawati, N., S.H. Hidayat, R. Suseno, P. Hidayat dan S. Sujiprihati. 2005. Identifikasi Geminivirus yang menginfeksi Tomat Berdasarkan Pada Teknik Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Lenth Polymorphism. J. Mikrobiol. Indo. 10:29-32

Aidawati, N. 2006. Keanekaragaman Begomovirus pada Tomat dan Serangga Vektornya, Bemisia tabaci Genn (Hemiptera: Aloyrodidae), serta Pengujian Ketahanan Genotip tomat Terhadap Strain Begomovirus. Disertasi Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Badan Pusat Statistik. 2010. Kabupaten Limapuluh Kota dalam Angka. Padang

Brown J.F and H.J. Ogle. 1997. Plant Pathogens and Plant Disease. Australia : Rockvale Publ.

Brunt, A., L. Cabtee and A. Gibbs. 1990. Viruses of Tropical Plants. C. A. B. International Wallingford Oxon.

Chiemsombat, P., W. Kositratana, S. Attathom, T. Sutabutra and N. Sae-aung. 1990. DNA Probe and Nucleic Acid Hybridization for Plant Virus Detection. Kasetsart J. (Nat. Sci. Suppl.) Vol. 24:12-16

Chiemsombat, P., and K. Kittipakorn. 1997. Confirmation of Potentially Important Pepper Viruses. Proceeding of AVNET-II Final Workshop, Bangkok. Thailand 1-6 September 1998. AVRDC.

Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version II. Plant Mol. Bio Rep. I(14): 165-189.

Erwin. 2000. Hama dan Penyakit Tembakau Deli. Balai Penelitian Tembakau. Medan

Fauquet, C.M., D.P. Maxwell, B. Gronenborn and J. Stanley,. 2000. Revised Proposal for Naming Geminiviruses. Arch Virol 145/8 : 1743-1761.

Fauquet, C.M. and Stanley, J. 2003. Gemivirus Classification and Nomenclature: Progress and Problems. *Ann.appl.Biol* 142: 219-230.

Green S.K. and G. Kalloo. 1994. Leaf curling and yellowing viruses of pepper and tomato: an overview. *Technical Bulletin, Asian Vegetable Research and Development Centre.*

Gutierrez, C. 2000. Strategies for Geminivirus DNA Replication and Recycle Interference. *J Physiol. Mol. Plant Pathol* 60:219-230.

Harrison, B.D.. 1985. Advances in Geminivirus Research. Annual Review of *Phytopathol* 23:55-82.

Hartati, L. 2007. Mengenal Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina Golongan Virus. www.bbkpbelawan.deptan.go.id [l 07 Januari 2011]

Hartono, S. 2006. Tanggapan Beberapa Varietas Cabai terhadap Geminivirus. Makalah dalam Pertemuan POKJA Penaggulangan Virus Kuning pada Cabai. Bukittinggi 23-24 Agustus 2006.

Hidayat, S.H., E.S. Rusli and N.Aidawati. 1999. Penggunaan Primer Universal dalam Polymerase Chain Reaction untuk Mendeteksi Virus Gemini pada Cabai. Prosiding Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI, Purwokerto, 16-18 September 1999.

Hidayat, S.H., O. Chatchawankanpanicip dan N. Aidawati. 2008. Moleculer Identification and Squence Analysis of *Tobacco Leaf Curl Begomovirus* From Jember, East Java, Indonesia. Hayati Journal of Biosciences 15:13-17

Honda, Y., M. Iwaki and Y. Saito. 1983. Mechanical Transmission, Purification, and Some Properties of Whitefly-borne *Mungbean Yellow Mosaic Virus* in Thailand. Plant dis 67 : 801-804.

Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. Fourth Ed. San Diego: Academic Press.

Idris A. M and J.K. Brown. 1998. Sinaloa *Tomato Leaf Curl* Geminivirus: Biological and Moleculer Evidence for a New Subgroup III Virus. *Phytopathol* 88:648-657.

Kato K, M. Onuki, S. Fuji and K. Hanaka. 1998. The First Occurrence of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Tomato (*Lycoversicum esculentum* Mill) in Japan. Ann *Phytopathol* Soc 64:552-559.

Lapidot, M., M. Friedmen, M. Pilowsky, R. Ben-Joseph and S. Cohen. 2001. Effect of Host Plant Resistence to *Tomato Yellow Curl Virus* (TYLCV) on Virus Acquisition and Transmission by its Whitefly Vector. *Phytopathol.* 91:1209-1213.

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1989. Molecular Cloning: a Laboratorium Manual. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Maruthi, M.N., S.N Alam, K.A Kader, A.R. Rekha, and J. Colvin. 2005. Nucleotide Sequencing, Whitefly Transmission, and Screening Tomato for Resistence againts Two Newly Described Begomovirus in Banglades. *J Phytopathol* 95; 1472-1481.

Matthews, R.E.F. 1992. Foundamentals of Plant Virology. Academic Press, Inc. California. 403 p.

Metha, P, J.A. Wyman, M.K. Nakhla, and D.P. Maxwell. 1994. Polymerase Chain Reaction Detection of Viruliforuousn *Bemisia tabaci* (Hemiptera : Aleyrodidae) with Two Tomato Infection Geminivirus. J.Econ Entomol 87 (5): 1285-1290.

Morales, F., A. Niessen, B. Ramirez and M. Castano. 1990. Isolation and Partial Characterization of a Geminivirus Causing Bean Dwarf Mosaic. Phytopathol. 80 : 96-101.

Morilla, G., D. Janssen, S. Gracia-Andreas, E. Moriones, I.M. Cuadrado, and E.R. Bejarano. 2005. Pepper (*Capsicum annum*) is a Dead-and Host for *Tomato Yellow Leaf Curl Virus.* J. Phytopathol 95: 1089-1097.

Nakhla, M.K. and D.P. Maxwell. 1998. Epidemiology and Management of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* Disease. In Plant Virus Disease Control. Hadidi *et al.* (Eds). APS Press. St. Paul, Minisota. 565-583.

Navot, N., R. Ber and H. Czosnel. 1989. Rapid Detection of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in Squashes of Plants and Insect Vectors. *Phytopathol.* 79 (5) : 562-568

Navot, N., M. Zeidean, E. Picherski, D. Zamir and H. Czosnek. 1992. Use of the Polymerase Chain Reaction to Amplify *Tomato Yellow Leaf Curl* Virus DNA Infected Plants and Viruliferousn Whiteflies. J. *Phytopathol* 81:1199-1202.

Noris E, A.M. Vaira, P. Caciagli, V. Mangsena, B. Gronenborn and G.P. Accotto. 1998. Amino Acid in Capsid Protein of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* that are Erucial for Systemic Infection, Particle Formation and Insect Transmission. J of Virology 71 (12): 10050-10057

Padidam, M. R.N. Beachy and C.M. Fauquet. 1995. Clasification and Identification of Geminivirus using Sequence Comparation. J.Gen. Virol 76:249-263.

Polston, J. E., A. Al-Musa, T. M. Perring and J. A. Dodds. 1990. Association of Nucleic Acid of Squash Leaf Curl Geminivirus with The Whitefly *Bemisia tabaci.* Phytopathol. 80 : 850-856.

Polston J.E. and P.K. Anderson. 1997. The Emergence of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in Western Hemisphere. Plant Dis 81: 1356-1369

Rivai, F. 2006. Kehilangan Hasil Akibat Penyakit Tanaman. Andalas University Press. Padang. 152-152 hal.

Roberts, I.M., D.J. Robinson and B.D. Harrison. 1984. Serological Relationship and Genome among Geminiviruses. Ann. Appl. Biol. 105-:483-493

Rojas MR, R.L. Gilbertson, D.R. Russell, and D.P. Maxwell. 1993. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-ttansmitted Geminivirus. Plant Dis. 77 : 477-485

Rojas MR, R.L. Gilbertson, D.R. Russell, and D.P. Maxwell. 1997. Use of Degenerate Primers in the Polymerase Chain Reaction to Detect Whitefly-ttansmitted Geminivirus. Plant Dis. 77 (4) : 340-347

Roye, M. E., W. A. Mclaughlin, M.K. Nakhla and D.P. Maxwell. 1997. Genetic Diversity among Geminivirus Associated with the Weed Species Sida spp., Macroptilium lathyroides and wissadula amplissima from Jamaica. Plant Dis. 81 : 1251-1258.

Salati R, M.K. Nakhla, M.R. Rojas, P. Guzman, J. Jaques, D.P. Douglas, and R.L. Gilbertson. 2002. *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* in the Dominician Republic: Characterization of Insectious Clone, Virus Monitoring in Whiteflies, and Identification of Reservoir Hosts. *Phytopathol* 92: 487-496.

Saleh N., S.E. Susuilowati, Soerjono dan B.H. Adi, 1992. Pengendalian Penyakit Virus Tanaman Tembakau Prosiding Diskusi II Tembakau Besuki Na Oosgt. Tgl. 6 Oktober 1990 di Malang. Hal.9-14.

Sanchez-Campos S, J. Navas-Castillo, R. Camero, C. Soria, J.A. Diaz, E. Meriones. 1999. Displacement of *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in Tomato Epidemics in Spain. *Phytopathology* 89:1038-1043.

Santoso, T.J. Hidayat, S.H. Duriat, A.S. Herman and M. Sudarsono. 2008. Identy and Sequence Diversity of Begomovirus Assciated with *Tomato Yellow Leaf Curl Virus disease* of Tomato in Indonesia. *J Microbiol Indones* 2:1-7

Samretwanich K., P. Chiemsombat, K. Kittipakorn, M.Ikegami. 2000. A New Geminivirus Associated with a *Yellow Leaf Curl Virus* of Pepper in Thailand. *Plant Dis* 84:1047

Semangun, H. 2008 . Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 709p.

Shew, H.D. and Lucas, G.B. 1971. Compendium of Tobacco Diseases. APS. Press. St. Paul. Minnesota. 68p.

Sudiono, S.H. Hidayat, R. Suseno, S. Sosromarsono. 2001. Deteksi Molekuler dan Uji Kisaran Inang Virus Gemini Asal Tomat. Makalah dalam Prosiding kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitipatologi Indonesia. IPB, Bogor, 22-24 Agustus 2001:209-217.

Sulandari, S. 2004. Karakterisasi Biologi, Serologi dan Analisis Sidik Jari DNA Virus Penyebab Penyakit daun Keriting Kuning Cabai. [Disertasi]. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Sulandari, S., R. Suseno., S. H. Hidayat, J. Harjosudarmo and S. Sosromarsono. 2006. Detection and Host Range Study of Virus Associated with *Pepper Yellow Leaf Curl* Disease. *J. Hayati* 13:1-6.

Sukamto, T. Kon, S.H. Hidayat, K. Ito, S. Hase, H. Takahashi and M. Ikegami. 2005a. Begomoviruses Associated With Leaf Curl Diseases of Tomato in Java, Indonesia. *J. Phytopathol* 153:662-566.

Torres-Pacheco IT, J.G.A Tiznado, J.K Brown, Becerra-Flora A, Bustamante RFR. 1996. Detection and Distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.

Trisusilowati, E.B. 1989. Studi Sifat Virus Penyebab Penyakit Kerupuk Pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). Tesis S-3 Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Trisusilowati, E.B. 1992. Reaksi Varietas Tembakau Terhadap Infeksi virus Kerupuk Tembakau. Agri. Journal 1(l) :5-10.

Trisno, J. 2010. Keanekaragaman Virus dan Peranan Rhizobakteria Indigenus dari Geografis Berbeda dalam Mempengaruhi Perkembangan Penyakit Daun Kuning Keriting Cabai (*Capsicum annum* L.). [Disertasi]. Andalas University Press. Padang.

Uzcategui, R., C. de and R. Lastra. 1978. Transmission and Properties of the Causal Agent of Mosaic Amarillo del Tomate (*Tomato Yellow Mosaic*). *Phytopathol*. 68 : 985-988.

Van Regenmortel M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B.Cersthis, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc. Geoach, C.R. Pringle dan R.B. wickner. 2000.Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Virus. Seven Report of the International Committe on Tazonomy of Viruses. Academic Press. 1162 p.

Wyatt SD dan J.K. Borwn. 1996. Detection of Subgroup III Geminivirus Isolates in Leaf Extrac be Degenarated Primer and Polymerase Chain Reaction. *Phytopathol* 86:1288-1293.

Yuwono, T. 2006. Bioteknologi Pertanian. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

UNIVERSITAS ANDALAS
UNTUK KEDJAJAAN BANGSA