Pedoman Diagnosis OPTK

Golongan Virus

DEPARTEMEN PERTANIAN
BADAN KARANTINA PERTANIAN
2009
KATA PENGANTAR

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

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

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

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

Kepala Pusat Karantina Tumbuhan,

Drs. Suwanda, ZA., M.Sc.
NIP. 19520506 197210 1 001
<table>
<thead>
<tr>
<th>DAFTAR ISI</th>
<th>Hal.</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>KATA PENGANTAR</td>
<td>i</td>
</tr>
<tr>
<td>DAFTAR ISI</td>
<td>ii</td>
</tr>
<tr>
<td>DAFTAR GAMBAR</td>
<td>iii</td>
</tr>
<tr>
<td>DAFTAR LAMPIRAN</td>
<td>iv</td>
</tr>
<tr>
<td>I. PENDAHULUAN</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>1.1 Latar Belakang</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>1.2 Tujuan</td>
<td>1</td>
</tr>
<tr>
<td>1.3 Ruang Lingkup</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>1.4 Pengertian Umum</td>
<td>2</td>
</tr>
<tr>
<td>1.5 Dasar Hukum</td>
<td>3</td>
</tr>
<tr>
<td>II. METODE DIAGNOSIS OPTK GOLONGAN VIRUS</td>
<td>4</td>
</tr>
<tr>
<td>2.1. Prosedur Preparasi Sampel Media Pembawa</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>2.1.1 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Biji</td>
<td>5</td>
</tr>
<tr>
<td>2.1.2 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Umbi</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td>2.2 Metode Diagnosis secara Biologi</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td>2.2.1 Pemeriksaan gejala penyakit pada tanaman atau bagian tanaman</td>
<td>6</td>
</tr>
<tr>
<td>2.2.2 Penggunaan tanaman indikator</td>
<td>11</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3 Metode Diagnosis secara Serologis</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.1 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</td>
<td>13</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.1.1 DAS ELISA (Alkaline phosphatase)</td>
<td>15</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.1.2 Indirect ELISA (Alkaline phosphatase)</td>
<td>17</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.1.3 TAS ELISA (Modifikasi Indirect ELISA)</td>
<td>19</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.1.4 Permasalahan dalam proses ELISA</td>
<td>21</td>
</tr>
<tr>
<td>2.3.2 Dot Immunobinding Assay (DIBA)</td>
<td>23</td>
</tr>
<tr>
<td>2.4 Metode Diagnosis Secara Molekuler</td>
<td>24</td>
</tr>
<tr>
<td>2.4.1 Polymerase chain reaction (PCR)</td>
<td>25</td>
</tr>
<tr>
<td>2.4.2 Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR)</td>
<td>34</td>
</tr>
<tr>
<td>III. Matrikulasi Metode Diagnosis</td>
<td>46</td>
</tr>
<tr>
<td>3.1 Matrik Diagnosis Virus Tanaman OPTK Kategori A1</td>
<td>46</td>
</tr>
<tr>
<td>3.2 Matrik Diagnosis Virus Tanaman OPTK Kategori A2</td>
<td>78</td>
</tr>
<tr>
<td>DAFTAR PUSTAKA</td>
<td>83</td>
</tr>
</tbody>
</table>
DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Alur Kerja Penanganan Pengujian Media Pembawa .................. 4
Gambar 2. Contoh-contoh gejala spesifik infeksi virus pada daun, batang, buah dan umbi ................................................................. 7
Gambar 3. Beberapa contoh gejala infeksi virus pada tanaman .............. 8
Gambar 4. Badan inklusi dari beberapa grup (Tobamovirus, Potyvirus, dan Cucumovirus) ................................................................. 10
Gambar 5. Tanaman indikator dan gejala lokal lesio yang ditunjukkaninya ...... 12
Gambar 6. Beberapa posisi pengikatan antibodi pada sumuran ELISA ........ 13
Gambar 7. Konfigurasi DAS ELISA .................................................. 14
Gambar 8. Konfigurasi Indirect ELISA .............................................. 14
Gambar 9. Alur Pengujian Metode ELISA ........................................... 15
Gambar 10. Reaksi positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna ...... 17
Gambar 11. Reaksi positif infeksi virus PMTV pada umbi kentang asal Canada ................................................................. 21
Gambar 12. Alur kerja identifikasi virus penyebab dengan metode molekuler... 25
Gambar 13. Tahapan pada proses penggandaan pita DNA ....................... 27
Gambar 14. Urutan pemuatan sampel ke dalam sumur sampel pada proses elektroforesis ................................................................. 40
Gambar 15. Hasil visualisasi pita DNA BSV sumber inokulum 1) Marker 100 bp ;2) BSV isolat Bogor ......................................................... 41
Gambar 16. Hasil visualisasi Turnip mosaic virus (TuMV) pada benih kubis ... 41
Gambar 17. Alur prosedur metode PCR .............................................. 45
<table>
<thead>
<tr>
<th>Lampiran 1. Lembar kerja per OPTK</th>
<th>.............................................................. 84</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Lampiran 2. Jenis dan kondisi tanaman indikator</td>
<td>.............................................................. 95</td>
</tr>
<tr>
<td>Lampiran 3. Bahan pengujian untuk metode ELISA dan PCR</td>
<td>.............................................................. 97</td>
</tr>
<tr>
<td>Lampiran 4. Alat-alat pengujian untuk ELISA dan PCR</td>
<td>.............................................................. 107</td>
</tr>
</tbody>
</table>
I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

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

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


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

1.2 Tujuan

Penyusunan Pedoman Diagnosis OPTK Golongan Virus bertujuan:

a. sebagai acuan bagi Petugas Karantina Tumbuhan dalam melaksanakan tindakan pemeriksaan kesehatan media pembawa OPTK golongan virus;

b. untuk keseragaman metode diagnosis OPTK golongan virus di UPT lingkup Barantan.

1.3 Ruang Lingkup

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

Yang dimaksud dengan istilah dalam pedoman ini adalah sebagai berikut:

a. Badan inklusi adalah substansi agregat dari sitoplasma atau inti sel, yang berupa protein, dan biasanya merupakan hasil multiplikasi virus pada sel inangnya.

b. Inhibitor adalah senyawa penghambat reaksi kimia atau sintesa senyawa lainnya, misal: senyawa fenol, tanin, dan asam lemak.

c. Karantina Tumbuhan adalah tindakan yang merupakan upaya untuk mencegah masuk dan tersebarnya OPT dari luar negeri dan suatu area ke area lain di dalam negeri atau keluaranya dari dalam wilayah negara RI.

d. Organisme Pengganggu Tumbuhan adalah semua organisme yang dapat merusak, mengganggu kehidupan, menyebabkan kehilangan hasil atau menyebabkan kematian tumbuhan.

e. Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina adalah semua Organisme Pengganggu Tumbuhan yang ditetapkan oleh menteri untuk dicegah masuknya ke dalam dan tersebumnya di dalam wilayah Republik Indonesia.

f. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan I adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang tidak dapat dibebaskan dari Media Pembawanya dengan cara perlakuan.

g. Organisme Pengganggu Tumbuhan Golongan II adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang dapat dibebaskan dari Media Pembawanya dengan cara perlakuan.

h. Organisme Pengganggu Tumbuhan Penting adalah Organisme Pengganggu Tumbuhan selain Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina yang keberadaannya pada benih tanaman yang dilalulintaskan dapat menimbulkan pengaruh yang merugikan secara ekonomi terhadap tujuan penggunaan benih tanaman tersebut dan ditetapkan oleh menteri untuk dikenai tindakan karantina tumbuhan.

i. Tanaman indikator adalah tanaman yang menunjukan suatu reaksi yang cepat dan khas terhadap infeksi suatu patogen.

j. Virus Penyakit Tumbuhan adalah wujud submikroskopis yang dapat menimbulkan gangguan fisiologis secara terus-menerus pada tanaman.

k. Virulensi adalah tingkat kemampuan virus dalam menimbulkan infeksi pada tanaman.

1.5 Dasar Hukum


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

d. ISPM No.27 Tahun 2006 tentang *Diagnostic Protocols for Regulated Pest*. 
II. METODE DIAGNOSIS OPTK GOLONGAN VIRUS

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

Gambar 1. Alur Kerja Penanganan Pengujian Media Pembawa
Metode diagnosis virus penyebab penyakit tanaman ada beberapa antara lain pengujian melalui pengamatan badan inklusi virus, pengujian menggunakan tanaman indikator, pengujian secara serologi/ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), dan secara molekuler. Sensitifitas masing-masing metode tergantung pada jenis virus dan jumlah titer virus pada tanaman terinfeksi. Untuk virus-virus golongan Tobamovirus dapat diamati badan inklusinya dengan mudah namun tidak demikian halnya dengan virus golongan lain.

2.1 Prosedur Preparasi Sampel Media Pembawa

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

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

2.1.1 Prosedur Preparasi Sampel Bentuk Biji

Instruksi Kerja:

- Siapkan sampel kerja (sesuai Petunjuk Teknis Pengambilan Sampel Bentuk Biji, Pusat Karantina Tumbuhan tahun 2007),
- Tanam biji di dalam nampan yang telah dialas 3-5 lembar kertas towel/ kertas sejenis yang lembab,
- Tutup nampan dengan plastik penutup bening (cling wrap),
- Simpan nampan yang telah berisi biji selama 3-5 hari pada tempat cukup cahaya dan bersuhu ruang (nampan juga dapat disimpan di Growth Chamber bersuhu 27ºC dengan pengaturan lampu selama 12 jam terang dan 12 jam gelap).
Catatan:
Perkecambahan dapat dipercepat dengan cara merendam biji sampel kerja pada air mengalir selama kurang lebih 3-12 jam. Cara ini dilakukan sebelum biji ditanam pada nampan.

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

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

Pemeriksaan dapat dilakukan terhadap keberadaan badan inklusi partikel virus, terjadinya nekrosis pada jaringan floem, atau deposisi enzim kalose (Hunter D. 2001).
Gambar 2. Contoh-contoh gejala spesifik infeksi virus pada daun, batang, buah dan umbi (Agrios, 2005)
Soybean Mosaic Virus (CABI 2007)

Broadbean Wilt Virus (CABI 2007)

Papaya Ring Spot Virus (PYRV) (CABI 2007)

Cucumber Mosaic Virus (CMV) (CABI 2007)

Banana Streak Virus (Rustiani 2005)

Gejala infeksi PMTV pada umbi ekstang (SASA 2007)

Gambar 3. Beberapa contoh gejala infeksi virus pada tanaman
Alat dan Bahan:
- Kaca pembesar/ loup/ Mikroskop cahaya
- Kamera untuk dokumentasi
- Alat pemotong (pisau/ gunting/ silet),
- Bahan pewarna : trypan blue, phlorogucinol,
- Gelas obyek dan gelas penutup.

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

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

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

Catatan :
Instruksi Kerja untuk Uji Igel Lange (pengamatan deposisi kalose) :
- Irislah bagian jaringan umbi atau floem pada batang, yang terinfeksi virus menggunakan pisau/ silet steril lalu letakkan pada gelas obyek,
- Warnai jaringan dengan resorcin blue,
- Amati dibawah mikroskop. Kalose yang terdeposit pada jaringan floem akan mengalami perubahan menjadi biru,

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

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

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

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

Instruksi Kerja:
1. Buat sap dari tanaman atau bagian tanaman yang terinfeksi virus dengan cara menggerus jaringan terinfeksi dengan 0.01 M buffer fosfat dingin pH 7 dengan perbandingan 1:10 b/v (berat/volume). Lakukan persiapan sap dalam kondisi dingin,
2. Saring sap tanaman dengan menggunakan kain kasa, bila diperlukan,
3. Karborundum ditaburkan pada bagian tanaman indikator yang akan diinokulasi,
4. Oleskan sap menggunakan jari tangan bersarung karet pada bagian tanaman indikator yang telah ditaburi dengan karborundum,
5. Setelah inokulasi, bagian tanaman yang diinokulasi dibilas dengan menggunakan aquadest,

Catatan :
Lakukan inokulasi ke tanaman indikator pada pagi atau sore hari.

Gambar 5. Tanaman indikator dan gejala lokal lesio yang ditunjukkannya

2.3 Metode Diagnosis Secara Serologi

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

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

Keunggulan metode ini (Dijkstra et al. 1998):
1. Dapat mendeteksi virus padakonsentrasi rendah (1-10 ng/ml)
2. Penggunaan antibodi dalam jumlah sedikit
3. Hasil pengujian pada sap tanaman sama baiknya dengan pengujian pada suspensi virus yang dimurnikan
4. Pengujian dapat diaplikasi pada sampel pengujian dalam jumlah besar
5. Pengujian dapat distandarkan dengan menggunakan kit bahan pengujian
6. Memungkinkan untuk mendapatkan hasil secara kuantitatif (nilai absorbansi) disamping hasil kualitatif (perubahan warna)

Dalam perkembangannya, metode ini mengalami modifikasi dalam prosedur pelaksanaan pengujian, diantaranya adalah pengujian standar (direct) DAS ELISA dan indirect ELISA. Perbedaan kedua metode ini adalah pada tempat enzim terikat. Bila konjugasi enzim dilakukan pada imunoglobulin antivirus maka metode itu termasuk DAS ELISA, tetapi bila konjugasi enzim dilakukan pada imunoglobulin dari serum darah hewan maka metode tersebut diklasifikasikan sebagai Indirect ELISA.
Gambar 7. Konfigurasi DAS ELISA

Gambar 8. Konfigurasi Indirect ELISA

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

Alat dan Bahan:
- Sampel tanaman
- Kit anti-sera tersedia komersial (anti-sera, konjigate, kontrol positif, kontrol negatif),
- Bahan-bahan buffer ELISA (Washing Buffer, ektrak buffer, Coating buffer, Substrat Buffer)
- Plate ELISA
- ELISA reader

Instruksi Kerja:

1. Isi lubang mikroplate dengan 100 μl antibodi virus target yang telah dilarutkan dalam coating buffer dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Inkubasikan pada kotak lembab pada temperatur ruang selama 4 jam atau pada suhu 4º C selama 1 malam.

2. Kosongkan mikroplate kemudian cuci dengan PBST 4-8 kali. Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.

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


5. Siapkan konjugat/ECI buffer 10 menit sebelum waktu inkubasi berakhir. Isi mikroplate dengan 100 μl enzim konjugat virus target yang telah dilarutkan dengan konjugat buffer dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Tutup plate dengan kertas towel lembab dan diinkubasikan pada suhu ruang selama 2 jam.


7. Siapkan larutan pNPP dalam substrat buffer kira-kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 : 1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 μl larutan pNPP. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30-60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 μl NaOH 3M.

8. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif (Gambar 10).

9. Pembacaan hasil juga dilakukan dengan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm. Hasil dikatakan positif apabila nilai absorbansi
sampel lebih dari 2 kali rata-rata nilai kontrol negatif (kit antisera). **Catatan:** setiap sampel diulang paling sedikit dua kali.

![Gambar 10. Reaksi positif yang ditunjukkan dengan perubahan warna (BUSKT, 2005)](image)

**2.3.1.2. Indirect ELISA** (Alkaline phosphatase)

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

**Instruksi Kerja:**
I. Isi lubang mikroplate dengan sampel tanaman yang telah digerus menggunakan coating buffer dengan perbandingan 1 : 10 (berat/volume) sebanyak 100 µl. Siapkan pula kontrol positif dan kontrol negatif. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4º C selama 1 malam.
2. Kosongkan mikroplate kemudian cuci dengan PBST 4-8 kali. Kemudian keringkan mikroplate dengan cara dibalik dan ditepuk-tepukan pada permukaan yang telah dialasi kertas towel.

3. Isi mikroplate dengan larutan 5 % *nonfat dried milk* dalam PBST. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.


5. Larutkan antisera 1 dengan menggunakan *conjugate buffer* dengan perbandingan sesuai kit antisera.

6. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.5 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam.

7. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.

8. Larutkan antisera 2 (conjugate universal) dengan menggunakan conjugate buffer dengan perbandingan sesuai kit antisera.

9. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.8 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.


11. Siapkan larutan pNPP dalam substrat buffer kira-kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 :1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 µl larutan pNPP. Inkubasi mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30 -60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 µl NaOH 3M.

12. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif.


### 2.3.1.3 TAS ELISA (Modifikasi Indirect ELISA)

**Alat dan Bahan:**

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

Instruksi Kerja:
1. Isi lubang mikroplate dengan 100 µl antibodi virus target yang telah dilarutkan dalam coating buffer dengan perbandingan sesuai petunjuk kit antisera. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4º C selama 1 malam.
2. Isi lubang mikroplate dengan sampel tanaman yang telah digerus menggunakan coating buffer dengan perbandingan 1 : 10 (berat/volume) sebanyak 100 µl. Siapkan pula kontrol positif dan kontrol negatif. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam atau pada suhu 4º C selama 1 malam.
4. Isi mikroplate dengan larutan 5 % nonfat dried milk dalam PBST. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
5. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
6. Larutkan antisera 1 dengan menggunakan conjugate buffer dengan perbandingan sesuai kit antisera.
7. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.5 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 2 jam.
8. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
9. Larutkan antisera 2 (conjugate universal) dengan menggunakan conjugate buffer dengan perbandingan sesuai kit antisera.
10. Isi lubang mikroplate dengan larutan no.8 sebanyak 100 µl. Inkubasikan pada kotak lembab pada suhu 37 °C selama 1 jam.
11. Cuci mikroplate seperti pada tahap 2.
12. Siapkan larutan pNPP dalam substrat buffer kira-kira 15 menit sebelum waktu inkubasi berakhir dengan perbandingan 1 :1 (mg/ml). Jangan sentuh pNPP dengan tangan atau terpapar cahaya yang kuat. Isi mikroplate dengan 100 µl larutan pNPP. Inkubasi
mikroplate pada suhu ruang dalam kotak lembab selama 30 -60 menit. Untuk menghentikan reaksi tambahkan 50 µl NaOH 3M.

13. Pengamatan secara visual terhadap perubahan warna yang terjadi pada larutan. Bila terjadi perubahan warna, ada indikasi bahwa sampel yang diuji positif (Gambar 11).


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

2.3.1.4. Permasalahan dalam proses ELISA

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Masalah</th>
<th>Penyebab dan solusi</th>
</tr>
</thead>
</table>
| Tidak muncul warna pada plat | • Tahapan yang dilakukan tidak lengkap/salah  
• Buffer yang digunakan tidak tepat (kadaluarsa)  
• Enzim atau antiserum yang digunakan sudah tidak baik kualitasnya  
• Positif kontrol yang digunakan tidak sesuai untuk antiserum (IgG) yang digunakan |
| Warna yang muncul tidak spesifik | Apabila hanya muncul pada bagian pinggir penyebabnya adalah efek pinggir, untuk itu bagian pinggir dikosongkan atau hanya disi dengan buffer Apabila warna muncul pada |
Seluruh lubang plate, ada 4 kemungkinan:
1. Antiserum yang digunakan mengandung antibodi untuk antigen tanaman (kurang murni)

<table>
<thead>
<tr>
<th>Masalah</th>
<th>Penyebab dan solusi</th>
</tr>
</thead>
</table>
| seluruh lubang plate, ada 4 kemungkinan      | 2. Pencucian yang kurang sempurna  
3. Substrat yang sudah tidak baik kualitasnya  
4. Salah pada saat memasukkan  
Solusi:  
- Gunakan negatif kontrol yang tepat pada masing-masing plate.  
Gunakan substrat yang masih baik dan cek terlebih dahulu perubahan warnanya apabila sebelum cepat berubah warna berarti substrat sudah jelek kualitasnnya  
Plate memperlihatkan hasil yang tidak konsisten  
- Pencucian yang kurang sempurna  
- Salah memasukkan  
- Kontaminasi dari lubang lain dalam 1 plate  
Solusi:  
- Tambahkan tahapan pencucian.  
- Menangani plate dengan hati hati.  
- Buat peta untuk tiap lubang sehingga tidak salah memasukkan.  
Warna muncul terlalu cepat  
- Konsentrasi enzime konjugat terlalu besar  
- Konsentrasi substrat terlalu tinggi  
Solusi  
Gunakan enzim konjugat dan konsentrasi substrat dengan nilai DO 405 nm sebesar 1 dalam waktu 30 sampai 60 menit, dengan antigen yang tepat.  
Warna yang terbentuk tidak sempurna  
- Adsorpsi reagen pada plate rendah  
- Gelembung pada tip pipet  
- Teknik memipet yang salah  
- Plate rusak  
- Pencampuran reagen yang tidak |
<table>
<thead>
<tr>
<th>Masalah</th>
<th>Penyebab dan solusi</th>
</tr>
</thead>
</table>
| Perubahan warna terlalu lambat | • Konsentrasi enzim konjugat terlalu rendah  
• Kontaminasi yang menhambat aktivitas enzim contoh NaN₃ menghambat enzim peroksidase  
• Temperatur laboratorium yang terlalu rendah  
• Konsentrasi substrat terlalu rendah |

### 2.3.2. Dot Immunobinding Assay (DIBA)

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

**Instruksi Kerja:**
1. 0,1 g jaringan tanaman yang terinfeksi digerus bersama dengan 1 ml TBS 1X pH7,5 (2,42 g Tris base dan 8,76 g NaCl dalam 1000 ml dH₂O).
2. Sap dimasukkan ke dalam tabung sentrifuge dan disentrifugasi pada kecepatan 1000 rpm selama 10 menit.
3. 3 ul supernatant diteteskan pada membran nitroselulosa dan dikeritingginkan. Semua tahapan pekerjaan dilakukan pada suhu ruang.
4. Membran nitroselulosa direndam dalam 10 ml larutan bloking dan diinkubasi selama 60 menit sambil digoyang dengan kecepatan 50 rpm.
5. Membran dicuci dengan aquadest. Tiap pencucian berlangsung 5 menit pada shaker berkecepatan 50 rpm.
6. Membran dicuci kembali dengan tris-tween buffer saline (1X TTBS) (0,05 % Tween-20) sebanyak 3 kali, tiap pencucian berlangsung 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.

7. Membran direndam dalam 1X TBS yang mengandung 2% susu non fat yang telah mengandung antibodi, dan diinkubasi semalam pada suhu kamar pada shaker berkecepatan 50 rpm.

8. Membran dicuci 3 kali dengan 1XTTBS, setiap pencucian berlangsung 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.

9. Tambahkan konjugat yang diencerkan dalam 1XTBS yang mengandung 2% susu non fat

10. Inkubasi selama 60 menit pada shaker berkecepatan 50 rpm.

11. Membran dicuci 4 kali dengan 1XTTBS, tiap pencucian berlangsung selama 3 menit pada shaker berkecepatan 100 rpm.


(Palfree dan Elliott 1982)

2.4 Metode Diagnosis Secara Molekuler

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

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

1. Tahap peleburan (melting) atau denaturasi. Pada tahap ini (berlangsung pada suhu tinggi, 94–96°C) ikatan hidrogen DNA terputus (denaturasi) dan DNA menjadi berberkas tunggal. Biasanya pada tahap awal PCR tahap ini dilakukan agak lama (sampai 5 menit) untuk memastikan semua berkas DNA terpisah. Pemisahan ini menyebabkan
DNA tidak stabil dan siap menjadi templat ("patokan") bagi primer. Durasi tahap ini 1–2 menit.


3. Tahap pemanjangan atau elongasi. Suhu untuk proses ini tergantung dari jenis DNA-polimerase (P pada gambar) yang dipakai. Dengan Taq-polimerase, proses ini biasanya dilakukan pada suhu 76°C. Durasi tahap ini biasanya 1 menit.

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

Gambar 13. Tahapan pada proses penggandaan pita DNA
Ekstraksi DNA

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

1. Gerus 0,1 g jaringan tanaman menggunakan mortar dan pistil di dalam nitrogen cair Lalu tambahkan 500 µl buffer ekstrak Dellaporta (lampiran 3) ke dalam mortar atau tabung lalu homogenkan dengan pestle. Untuk sampel yang dihomogenkan di dalam mortar masukkan ekstraksi jaringan tanaman ke dalam tabung 1,5 ml.

2. Tambahkan 33 µl 20% sodium dodecyl sulfate (SDS) (w/v) dan vortex lalu inkubsai campuran pada suhu 65°C selama 10 menit.

3. Tambahkan 160 µl 5M potassium acetate (KoAc) dan vortex.

4. Sentrifugasi selama 10 menit pada kecepatan 10.000 rpm

5. Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru, tanpa terambil sisa endapan di dasar tabung.

6. Tambahkan 1 volume Phenol, chloroform, isoamylalcohol (PCI) dengan perbandingan 25:24:1 (sebagai contoh untuk 500 µl supernatan yang berhasil terambil dari tahap sebelumnya ditambahkan 500 µl PCI), vortex dengan kecepatan tinggi, dan sentrifugue pada 10.000 rpm selama 5 menit.

7. Pindahkan supernatan ke dalam tabung baru lalu tambahkan 1 volume isopropanol, bolak balik tabung hingga beberapa kali, lalu sentrifuge 14.000 rpm 10 menit (atau 12.000 rpm 15 menit)

8. Total DNA akan menempel pada dasar tabung (umumnya berwarna putih namun tergantung jenis jaringan tanaman yang diekstrak), lalu buang isopropanol hingga hanya tersisa pelet di dasar tabung.

9. Cuci pelet dengan alkohol 70%, sentrifuge pada 10.000 rpm selama 5 menit, setelah itu buang cairan yang tersisa dan dikeringanginkan selama 15 menit hingga sisa-sisa ethanol di dalam tabung menguap. Lalu larutkan pelet dalam 50µl air bebas nuklease. Simpan DNA dalam suhu -20°C. **Catatan:** Sentrifugasi dilakukan pada suhu 4°C.

Instruksi kerja metode CTAB

1. Siapkan buffer ekstrak (lampiran 3) yang akan digunakan sesuai kebutuhan lalu tambahkan 0,1% 2-ME ke dalam bufer, setelah itu panaskan dalam waterbath suhu 65°C selama lebih kurang 5 menit.

2. Gerus 0,1 g jaringan tanaman dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan pistil hingga menjadi serbuk. Tambahkan buffer ekstrak CTAB sebanyak 700 µl lalu aduk hingga merata.

3. Pindahkan ekstrak jaringan tanaman ke dalam tabung 1,5 ml.

4. Inkubasi selama 30 menit pada suhu 65°C dalam waterbath
5. Tambahkan 700 µl Chloroform, isoamylalcohol (CI) perbandingan 24:1 dan campur dengan vortex hingga merata, lalu sentrifuge pada kecepatan 13.000 rpm selama 5 menit.


7. Sentrifugasi 13.000 rpm selama 5 menit. Lalu buang cairan dalam tabung sehingga hanya tersisa pelet DNA pada dasar tabung (umumnya berwarna putih atau warna lain tergantung pada jenis jaringan tnanam yang diekstrak). Tambahkan 300 µl ethanol 70% dingin, goyangkan tabung dengan jari hingga pelet terlarut dalam ethanol lalu sentrifuge 13.000 rpm selama 5 menit.

8. Buang cairan di dalam tabung sehingga hanya tersisa pelet di dasar tabung, lalu keringkan tabung dalam incubator suhu 37°C selama lebih kurang 15 menit atau pada suhu ruang selama kurang lebih satu jam hingga ethanol di dalam tabung menguap secara keseluruhan.

9. Larutkan DNA dalam air bebas nuklease. Simpan DNA dalam freezer suhu -20°C.

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

1. Timbang jaringan sebanyak 0,1 gram dan lakukan dua kali ulangan,
2. Letakkan sampel uji ke dalam mortar yang telah steril, tuang Nitrogen cair, lalu gerus menggunakan martil steril hingga seperti serbuk,
3. Tambahkan 400 ul buffer AP1 dan 4 ul RNase A stock solution, kemudian masukkan ke dalam tube 1,5 ml, dan vorteks untuk menghomogenkan larutan,
4. Inkubasi selama 10 menit pada penangas air bersuhu 65C, dan bolak-balik tube setiap 5 menit sekali,
5. Tambahkan 130 ul buffer AP2 kemudian vorteks. Inkubasi di dalam refrigerator selama 5 menit,
6. Sentrifugasi pada 14.000 rpm selama 5 menit,
7. Pipet supernatant (fase atas) lalu masukkan ke dalam Mini spin column (warna lila), dan sentrigugasi pada 14.000 rpm selama 2 menit,
8. Pindahkan fraksi yang ada di tabung bawah ke dalam tabung baru (2 ml) tanpa menyertakan pellet yang terbentuk,
9. Tambahkan 1,5 volume buffer AP3/E dan campur dengan menggunakan pipet (dengan cara menghisap dan mengeluarkan campuran menggunakan mikropipet),
10. Ambil 650 ul campuran tersebut, termasuk apabila terdapat endapan yang terbentuk, masukkan ke dalam DNeasy mini spin column (warna putih). Sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm. Buang cairan yang ada di tabung 2 ml,
11. Ulangi cara ke 11 terhadap sisa campuran, buang tabung berikut cairan yang ada di dalamnya,
12. Letakkan DNeasy mini spin column ke tabung baru (tersedia), tambahkan 500 ul buffer AW, dan sentrifugasi pada 8000 rpm selama 1 menit. Buang larutan yang ada di tabung.
13. Tambahkan 500 ul buffer AW ke dalam DNeasy Mini Spin Column, lalu sentrifugasi selama 2 menit pada 14.000 rpm,
14. Pindahlkan DNeasy Mini Spin Column ke tabung baru 1,5 ml, tambahkan 50 ul sd 100 ul buffer AE (sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan) dan masukkan langsung ke DNeasy membrane, inkubasi pada suhu ruang selama 5 menit, lalu sentrifugasi selama 1 menit pada 8000 rpm,
15. Simpan pada rak tube pada refrigerator bersuhu - 20ºC.

Protokol ekstraksi RNA
Berbeda dengan DNA, RNA memiliki sifat yang tidak stabil (mudah terdegradasi). Oeh karena itu, beberapa hal harus diperhatikan sebelum memulai ekstraksi RNA, diantaranya:
- Gunakan selalu sarung tangan pada saat melakukan ekstraksi RNA untuk menghindari terjadinya kontaminasi RNase dari permukaan kulit kita.
- Usahakan bekerja pada tempat yang terpisah dengan dengan tempat kita melakukan ekstraksi DNA, dan bila memungkinkan gunakan pula alat yang berbeda.
- Gunakan selalu air bebas RNase untuk setiap bufer yang digunakan, atau beri perlakuan dengan Diethylpyrocarbonate (DEPC)
- Proses ekstraksi dilakukan dalam keadaan dingin

Instruksi kerja ekstraksi Metode Willey (Albrechtsen, 2006)
1. Sampel jaringan tanaman sebanyak 0,1 g digerus menggunakan nitrogen cair dalam mortar dan pestle, lalu ditambahkan 500 µl bufer ekstrak masukkan ke dalam tabung, kemudian ke dalam tabung tambahkan 500 µl fenol/kloroform/isooamilalkohol (PCI). Setelah itu larutan dicampur hingga homogen menggunakan vortex. Untuk sampel benih terlebih dahulu gerus sampel benih minimal 1.000 benih (sesuai kebutuhan) dengan nitrogen cair atau alat penggerus biji lalu ambil benih yang telah menjadi serbuk sebanyak 0,1 g, masukkan ke dalam tabung 1,5 ml tambahkan 500 µl bufer ekstrak dan 500 µl PCI (50:50:1) dan divortex pada kecepatan tinggi selama 1 menit.
2. Ekstrak jaringan tanaman kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.000xg. Setelah sentrifugasi akan terbentuk dua fase cairan. Pisahkan cairan fase atas (supernatan), kemudian tambahkan chloroform/isoamylalkohol (50:1) sebanyak 1 volume supernatan, dan dilanjutkan dengan sentrifugasi 13.000 xg selama 1 menit.

3. Tambahkan 1 volume isoproponal ke dalam supernatan, lalu diinkubasi pada suhu 20\(^\circ\)C selama 3 jam sampai satu malam atau pada suhu -80\(^\circ\)C selama 30 menit.


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

1. Timbang 0.01 gr bagian sampel uji.
3. Tambahkan 450 µl Buffer RLT atau RLC kedalam tabung dan divortex.
4. Ambil larutan dengan menggunakan pipet dan masukkan kedalam QIAshredder spin column (warna ungu) yang telah dimasukkan dalam tabung, sentrifugasi pada 15000 rpm selama 2 menit. Tuang supernatan ke dalam tabung steril ukuran 2 ml.
5. Tambahkan 0.5 volume etanol 96-100% (kurang lebih 225 µl) ke dalam larutan, kemudian resuspensi larutan dengan pipet agar homogen. Catatan : Untuk resuspensi disarankan untuk tidak disentrifugasi.
6. Tuang larutan (± 650 µl) kedalam RNeasy mini column (pink) yang telah dimasukkan dalam tabung berukuran 2 ml. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 8000 x g atau 10000 rpm. Buang larutan. Catatan : gunakan kembali tabung pada tahap berikutnya (langkah g).
10. **Pilihan**: Letakkan *RNeasy column* kedalam tabung baru ukuran 2 ml dan buang tabung dan larutan yang telah digunakan pada tahap sebelumnya. Sentrifuge pada kecepatan maksimum selama 1 menit. **Catatan**: kecepatan sentrifuge maksimum 1 menit.

11. Untuk elusi, transfer *RNeasy column* ke dalam tabung ukuran 1.5 ml. Pipet 30-50 µl *RNeasy free water* secara langsung kedalam *RNeasy silica-gel membran*. Tutup tabung dan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 8000 xg atau 10000 rpm untuk elusi.


**Protokol PCR**

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

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

**Komposisi komponen PCR**:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Kons. dalam Reaksi PCR</th>
<th>Volume utk 1 sampel</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>10x PCR buffer</td>
<td>1x</td>
<td>2.5µl</td>
</tr>
<tr>
<td>dNTPs (10 mM)</td>
<td>200 µM</td>
<td>0.5 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer Target F</td>
<td>0.4 µM</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer Target R</td>
<td>0.4 µM</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Taq Polymerase</td>
<td>1.25 Unit</td>
<td>0.25 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>10-100 pg</td>
<td>1-2.5 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>

(maks. 10% dari vol total)

Air bebas nuklease Disesuaikan hingga 25 µl

**Volume total** 25 µl
Keterangan: PCR dilakukan dalam tabung 0,2 atau 0,5 ml tergantung jenis block pada mesin Thermal cycler yang digunakan.

PCR menggunakan mastermix:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>mastermix</td>
<td>12,5 ml</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>1-2,5 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td>Sesuaikan volume hingga 25 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Volume total</td>
<td>25 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

PCR menggunakan PCR bead:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>1 – 2,5 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td>Sesuaikan volume hingga 25 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Volume total</td>
<td>25 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

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

Siklus PCR yang umum dipakai untuk amplifikasi DNA adalah:

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

Catatan: Siklus PCR lihat lampiran

2.4.2 Reverse Transcription Polymerase chain reaction (RT-PCR)

Sebagian besar komponen genetik virus tanaman adalah RNA, terutama jenis-jenis viroid yang hanya terdiri dari RNA. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya bahwa untuk melipatgandakan DNA dari cetakan yang berupa RNA
maka sebelumnya perlu dilakukan sebuah tahapan sebelum proses pelipatgandaan DNA yaitu transkripsi balik (sintesis cDNA dari RNA). Pada tahap ini cetakan RNA terlebih dahulu dirubah menjadi cDNA (complementary DNA) menggunakan enzim reverse transcriptase (RT).

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

Protokol Dua langkah RT-PCR
Komposisi komponen untuk reaksi Sintesis cDNA

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Vol. untuk 1 reaksi</th>
<th>Konsentrasi</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>10x Buffer RT</td>
<td>2.5µl</td>
<td>1x</td>
</tr>
<tr>
<td>dNTPs (10 mM)</td>
<td>1 µl</td>
<td>200 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligo d(T)/Primer R 10 µM</td>
<td>2 µl</td>
<td>0.8 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Rnase inhibitor 40 unit/µl</td>
<td>1 µl</td>
<td>40 unit</td>
</tr>
<tr>
<td>MMuLV RT 200 unit/µl</td>
<td>1 µl</td>
<td>200 unit</td>
</tr>
<tr>
<td>Template RNA</td>
<td>3 - 5 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas Rnase</td>
<td>Sesuaikan hingga volume 20 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td><strong>Volume total</strong></td>
<td>20 µl</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Inkubasi tabung PCR dalam mesin Thermal cycler dengan kondisi sebagai berikut:
- 25° C selama 5 menit,
- 37° C selama 90 menit,
- 70° C selama 15 menit.

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

Protokol Satu langkah RT-PCR
Komposisi komponen untuk proses RT-PCR menggunakan RT-PCR bead:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Primer target R 1 µl
Cetakan RNA 3-5 µl
Air bebas nuklease Sesuaikan volume hingga 50 µl
Volume total 50 µl

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

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

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

Instruksi kerja:
1. Larutkan antibodi dalam coating buffer hingga mencapai konsentrasi 2µg IgG/ml. Kemudian masukkan 50 µl coating buffer yang sudah berisi antibodi ke dalam tabung PCR 0,2 atau 0,5 ml (sesuaikan dengan blok PCR).
2. Tutup tabung dan inkubasi selama 2 sampai 3 jam pada suhu 37°C atau satu malam pada suhu 4°C.
3. Selama inkubasi siapkan ekstrak jaringan tanaman dengan menggerus jaringan tanaman dalam extract buffer dengan perbandingan 1:5 atau 1:10 pada suhu ruang.
4. Setelah inkubasi selesai, keluarkan coating buffer dengan pipet lalu cuci dengan 200 µl washing buffer kemudian sentrifugasi tabung selama 15 detik pada kecepatan 5000 rpm dan keluarkan washing buffer dengan pipet.
5. Tambahkan 50 µl ekstrak sampel tanaman ke dalam tabung, Hal sama dilakukan pula untuk kontrol negatif dan positif pada tabung yang berbeda. Untuk menghindari kontaminasi lakukan tahap tersebut secara berurutan mulai dari kontrol negatif, sampel uji dan terakhir kontrol positif.
6. Tutup tabung dan inkubasi selama 2 sampai 3 jam pada suhu 37°C atau satu malam pada suhu 4°C.
8. Balikkan tabung di atas tissue untuk mengerikan tabung. Lakukan hal yang sama untuk kontrol positif dan kontrol negatif.
9. Inkubasi tabung dalam *thermal cycler* pada suhu 95°C selama 5 menit
11. Tabung PCR tersebut selanjutnya digunakan untuk proses RT-PCR.

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

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

**Tabel 1. Sekuens primer kontrol internal**

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
<th>Konsentrasi</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
<td>0,4 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R</td>
<td>1 µl</td>
<td>0,4 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer RBCCF</td>
<td>0,5 µl</td>
<td>0,2 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer RBCCR</td>
<td>0,5 µl</td>
<td>0,2 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>2-3 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td>Sesuaikan volume hingga 25 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Volume total</td>
<td>25 µl</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
Dupleks satu langkah RT-PCR menggunakan Ready to go RT-PCR bead (GE healthcare):

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
<th>Konsentrasi</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F 10 µM</td>
<td>1 µl</td>
<td>0,2 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R 10 µM</td>
<td>1 µl</td>
<td>0,2 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer nad5f 10 µM</td>
<td>0,5 µl</td>
<td>0,1 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer nad5r 10 µM</td>
<td>0,5 µl</td>
<td>0,1 µM</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>3-5 µl</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td></td>
<td>Sesuaikan volume hingga 50 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Volume total</td>
<td>50 µl</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

**Visualisasi hasil amplifikasi DNA dengan gel agarosa**

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

**Pembuatan Agarose Gel**

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

Penghitungan :

\[
1.5 \times \text{kapasitas cetakan Agarose Gel (ml)} = \text{......... gr Agarose } \\
100 \\
1.5 \times 60 \text{ ml} = 0.9 \text{ gr serbuk Agarose } \\
100
\]

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

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

3. Panaskan larutan Agarose tersebut pada alat pemanas atau Microwave hingga larutan terlihat jernih. Tunggu hingga larutan tersebut hangat-hangat kuku, kemudian tuang larutan dalam cetakan Agarose Gel yang telah dipasang Comb (sisir) untuk membuat lubang Gel.

4. Setelah larutan Agarose mengeras, cabut comb dari Gel dan masukkan cetakan dalam alat elektroforesis. Tuang Buffer TAE 1X atau TBE 1X kedalam alat elektroforesis hingga Agarose Gel terendam.


6. Siapkan potongan kertas parafilm. Teteskan Loading dye (± 2 µl) diatas kertas parafilm dan teteskan RNA (± 5 – 10 µl) diatas Loading dye kemudian diresuspensi kemudian masukkan kedalam well agarose gel.


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

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

**Pembacaan Hasil PCR/RT-PCR**

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

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

Pembacaan Hasil RT-PCR:

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

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

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

Beberapa hal dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut diantaranya adalah:

1. Tidak terdapat pita DNA hasil pelipatgandaan menggunakan kontrol positif dan kontrol internal
   - Periksa kondisi komponen PCR dan primer yang digunakan. Jika perlu gunakan Taq polimerase dari tabung yang baru untuk memastikan bahwa enzim polimerase yang kita gunakan tidak rusak.
   - Suhu anealing yang tidak tepat menyebabkan kontrol positif tidak akan bisa dilipatgandakan. Bila hal tersebut terjadi optimalkan suhu anealing hingga didapatkan suhu yang tepat.
   - Pastikan kondisi mesin PCR yang digunakan masih dalam keadaan baik.

2. Smear dan pita-pita DNA nonspesifik
   - Konsentrasi DNA yang terlalu besar akan menyebabkan terjadinya smear, kurangi volume larutan DNA/RNA yang digunakan.
   - Banyaknya kontaminan baik pada saat pencampuran komponen PCR maupun proses ekstraksi DNA/RNA yang berasal dari proses pelipatgandaan.
DNA sebelumnya dapat menyebabkan terjadinya pelipatgandaan DNA non spesifik. Gunakan selalu kontrol negatif untuk melihat adanya kontaminan pada reaksi dan pisahkan ruang PCR dengan ruang ekstraksi DNA/RNA.
- Kualitas DNA/RNA yang buruk akan menyebabkan terjadinya proses pelipatgandaan di tempat-tempat lain selain pada target. Ulangi ekstraksi, jika perlu gunakan metode yang lain, untuk mendapatkan kualitas RNA yang lebih baik.
- Periksa apakah primer yang digunakan spesifik untuk target tersebut atau tidak. Hal tersebut dapat dilakukan dengan melakukan PCR ulang menggunakan primer yang sama melihat adanya DNA-DNA non spesifik pada proses sebelumnya atau melakukan PCR menggunakan kontrol tanaman sehat. Selain itu untuk memastikan apakah primer yang kita gunakan hanya dapat melipatgandakan DNA target apabila berpasangan dapat dilakukan PCR menggunakan masing-masing primer (F dan R) secara terpisah.

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

Selalu gunakan jas laboratorium pada saat bekerja melakukan pengujian.

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

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

Beberapa bahan seperti Phenol, chloroform, dan 2-Mercaptoethanol memiliki bau yang sangat menyengat, beracun dan dapat mempengaruhi kesehatan manusia. Gunakan sarung tangan, dan masker. Penanganan bahan-bahan tersebut sebaiknya dilakukan di dalam lemari asam.
Gambar 17. Alur prosedur metode PCR (BUSKT 2005)
### III. Matrikulasi Metode Diagnosis

#### 3.1 MATRIKS DIAGNOSIS VIRUS TANAMAN OPTK KATEGORI A1

<table>
<thead>
<tr>
<th>NO</th>
<th>NAMA ILMIAH/ NAMA UMUM/SINONIM/ SCIENTIFIC NAME/COMMON NAME/SYNONIM</th>
<th>INANG/ HOST</th>
<th>MEDIA PEMBAWA/ CARRIER</th>
<th>PG</th>
<th>TI</th>
<th>DIBA</th>
<th>ELISA</th>
<th>PCR</th>
<th>RT PCR</th>
</tr>
</thead>
</table>
| 1  | Cassava mosaic bigeminivirus  
Sin: African cassava mosaic disease, cassava African mosaic bigeminivirus, Indian cassava mosaic disease  
(P): Manihot esculenta (ubi kayu, cassava), jarak  
(S): Jatropha sp. | (P): batang (stem), umbi akar (tuber root) | √ | | | | √ | |  |
| 2  | Alfalfa mosaic alfamovirus (AMV)  
Sin: alfalfa virus 1 & 2, lucerne mosaic virus, Marmor medicaginis, potato calico virus  
(P): Medicago sativa, Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Nicotiana tabacum (tembakau, tobacco), Solanum tuberosum (kentang, potato), Cucurbitaceae, Apium graveolens var. rapaceum, Apium graveolens (seladeri, celeri), Cicer arietinum, Capsicum annuum (cabai, hot pepper, chili, red pepper), Glycine max (kedelai, soybean), Lactuca sativa, Vigna sp. (kacang panjang, cowpea), Vigna radiata, Trifolium incarnatum, Trifolium pratense, Trifolium repens, Viburnum opulus  
(S): Pisum sativum, Cajanus cajan (kacang gude), Cercis siliquastrum, Coriandrum sativum (tumbir, coriander), Semua bagian tanaman (all parts of plant), benih (seed) | Vector: Acrystosiphon pisum, Myzus persicae | √ | √ | | | | √ | |  |
<p>|   | 3. Potato black ringspot nepovirus (PBRSV) | SIN: potato calico strain of tobacco ringspot virus, Andean potato calico strain of tobacco ringspot virus, Andean potato calico strains nepovirus | (P): <em>Solanum tuberosum</em> (kentang, potato) | √ | √ | √ | √ | √ |
|   | 5. Andean potato mottle comovirus (APMoV) | SIN: potato Andean mottle comovirus, potato Andean mottle virus | (P): <em>Capsicum annuum</em> (cabai, hot pepper, chili, red pepper), <em>Solanum tuberosum</em> (kentang, potato) | √ | √ | √ | √ | √ |
|   | 6. Apple chat fruit | SIN: Apple chat fruit MLO | (P): <em>Malus domestica</em> (apel, apple), <em>Malus</em> spp. | mata tunas (eye bud), batang (stem), tanaman (plant), akar (root) |</p>
<table>
<thead>
<tr>
<th>No.</th>
<th>Virus Species</th>
<th>Symptoms</th>
<th>Plants</th>
<th>Fruit</th>
<th>Flower</th>
<th>Root</th>
<th>Stem</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>7.</td>
<td>Apple mosaic ilarvirus</td>
<td>(P): Betula, Corylus avellana, Fragaria, Humulus lupulus, Malus domesticum, Prunus americana</td>
<td>(P): Betula, Corylus avellana, Fragaria, Humulus lupulus, Malus domesticum, Prunus americana, Prunus dulcis, Ribes rubrum, Rubus spp. (raspberry), Rubus spp. (blackberry)</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>(S): Betula, Corylus avellana, Fragaria, Humulus lupulus, Malus domesticum, Prunus domestica, Prunus persica</td>
<td>(S): Betula, Corylus avellana, Fragaria, Humulus lupulus, Malus domestica, Prunus domestica</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>(S): Aronia melanocarpa, Cotoneaster bullatus, Cydonia oblonga, Prunus avium, Pyronia veitchii, Sorbus aucuparia, Malus sp, Malus microMalus</td>
<td>(S): Aronia melanocarpa, Cotoneaster bullatus, Cydonia oblonga, Prunus avium, Pyronia veitchii, Sorbus aucuparia, Malus sp, Malus microMalus</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>(S): Crataegus monogyna, Cydonia oblonga, Malus sylvestris, Malus tocco, Pyronia veitchii, Sorbus discolor.</td>
<td>(S): Crataegus monogyna, Cydonia oblonga, Malus sylvestris, Malus tocco, Pyronia veitchii, Sorbus discolor.</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>10.</td>
<td>Cherry rasp leaf nepovirus (CRLV)</td>
<td>(P): Prunus avium, Prunus cerasus, Prunus persica, Prunus mahaleb, Malus domesticum</td>
<td>(P): Prunus avium, Prunus cerasus, Prunus persica, Prunus mahaleb, Malus domesticum</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>(S): Rubus spp. (raspberry)</td>
<td>(S): Rubus spp. (raspberry)</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>11.</td>
<td>Apple fruit crinkle viroid (AFCVd)</td>
<td>(P): Malus domestica</td>
<td>(P): Malus domestica</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td></td>
<td>(S): Malus domestica</td>
<td>(S): Malus domestica</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Species/Genus</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>-----------------------------------------------</td>
<td>-------------------------------------------------------------------------------</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>12.</td>
<td><em>Arabis mosaic nepo-virus (ArMV)</em></td>
<td>Sin: ash ring and line pattern virus, raspberry yellow dwarf virus, rhubarb mosaic virus, forsythia yellow net virus, jasmine yellow blotch virus, Rhabarber-Mosaik-Virus (rhubarb mosaic virus)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>


**(S):** Alstroemeria, Fragaria, Fraxinus, Hordeum vulgare, Narsisus, Ribes nigrum, Rubus

**tanaman (plant), benih (seed) Vector:** Xiphinema diversicaudatum, X. madiderense, X. coxi,
<table>
<thead>
<tr>
<th>No.</th>
<th>Virus Name</th>
<th>Common Names</th>
<th>Hosts</th>
<th>Symptoms</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>13</td>
<td><strong>Arracacha virus B (AVB)</strong></td>
<td>Sin: Arracacha B nepovirus, Arracacha B nepovirus (oca strain)</td>
<td>(P): Arracacia xanthorrhiza, Oxalis tuberosa (oca), Solanum tuberosum (kentang, potato) (S): Brassica campestris ssp.rapa, Vigna spp. (kacang panjang, cowpea), Capsicum annuum, Hyoscyamus niger</td>
<td>umbi (tuber), daun (leaf), suluran (stolon), benih (seed)</td>
</tr>
<tr>
<td>14</td>
<td><strong>Artichoke Italian latent nepovirus (AILV)</strong></td>
<td></td>
<td>(P): Cynara scolymus (P): Cichorium intybus, Gladiolus hybrids, Pelargonium zonale hybrids, Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>Daun (leaf), suluran (stolon), batang (stem) Vektor: <em>Longidorus apulus</em></td>
</tr>
<tr>
<td>15</td>
<td><strong>Asparagus virus 2 Ilarvirus (AV2)</strong></td>
<td>Sin: Asparagus virus II, Asparagus 2 ilarvirus, Asparagus virus C, Asparagus latent virus</td>
<td>(P): Asparagus officinalis (asparagus, asparagus)</td>
<td>pollen, benih (seed), suluran (stolon)</td>
</tr>
<tr>
<td>16</td>
<td><strong>Tobacco streak ilarvirus (TSV)</strong></td>
<td>Sin: Asparagus stunt virus, Asparagus stunt virus, Datura quercina virus, New Logan virus, Nicotiana virus 8, Nicotiana virus vulnerans, strawberry necrotic shock virus, tractus orae, Black raspberry latent ilarvirus, Black raspberry latent virus, Bean red node strain, Black raspberry latent strain</td>
<td>(P): Vigna spp. (kacang panjang, cowpea), Nicotiana tabacum (tembakau, tobacco), Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Capsicum annuum (cabai, hot pepper, chilies, red pepper), Glycine max(kedelai, soybean), Fragaria, Asparagus officinalis (asparagus, asparagus), Cynara scolymus, Gossypium herbaceum, Helianthus annuus (bunga matahari, sunflower), Lactuca sativa (letus, lettuce), Medicago sativa, Vigna sp. (kacang panjang, cowpea), Vigna angularis, Pisum sativum, Rubus sp. (black raspberry), Solanum tuberosum (kentang, potato), Trifolium pratense (S): Carica papaya (pepaya, pawpaw), Cichorium endivia, Coer arietinum, Cucumis sativus</td>
<td>buah (fruit), bunga (flower/inflorescence), daun (leaf), tunas (bud), akar (root), batang (stem), benih (seed)</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name and Hosts</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>---------------------</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>17.</td>
<td><strong>Avocado sun-blotch avsunviroid (ASBVd)</strong>&lt;br&gt;<strong>Sin:</strong> avocado sunblotch virus, sunblotch viroid (avocado)&lt;br&gt;(P): <em>Persea americana</em> (alpokat, avocado)&lt;br&gt;(S): <em>Cinnamomum camphora</em>, <em>Cinnamomum zeylanicum</em>, <em>Ocotea bullata</em>, kulit (bark), buah (fruit), bunga (flower/inflorescence), daun (leaf), suluran (stolon), batang (stem), benih (seed)</td>
<td>√</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>18.</td>
<td><strong>Barley stripe mosaic hordeivirus (BSMV)</strong>&lt;br&gt;<strong>Sin:</strong> barley false stripe virus, barley mosaic virus, oat stripe mosaic virus, barley mild stripe virus, barley yellow stripe (possibly)&lt;br&gt;(P): <em>Hordeum vulgare</em> (barli, barley), <em>Triticum aestivum</em> (gandum, wheat)&lt;br&gt;(S): <em>Poaceae</em>, <em>Secale cereale</em> (rye), <em>Zea mays</em> (jagung, corn, maize), <em>Oryza sativa</em> (padi, paddly), <em>Sorghum bicolor</em> (sorgum, sorghum), <em>Panicum spp.</em> (millet) polen, benih/biji (seed/grain), tanaman (plant)</td>
<td>√</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Sci Name</td>
<td>Hosts</td>
<td>Vector(s)</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>----------------------------------------</td>
<td>-------------------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>20.</td>
<td>Bean pod mottle comovirus (BPMV)</td>
<td><em>Pennisetum clandestinum</em></td>
<td>Kikuyu grass, Phleum pratense (timothy), Phragmites (reed), Saccharum officinarum (sugarcane), Setaria italica (foxtail millet), Sorghum bicolor (sorghum), Trifolium repens (white clover), Zea</td>
<td>Cerotoma trifurcata, Epicauta vittata, Diabrotica balteata, D. undecimpunctata, Colaspis flavida, C. lata</td>
</tr>
<tr>
<td>21.</td>
<td>Beet curly top curtovirus (BCTV)</td>
<td><em>Phleum pratense</em></td>
<td>Timothy, Phragmites (reed), Saccharum officinarum (sugarcane), Setaria italica (foxtail millet), Sorghum bicolor (sorghum), Trifolium repens (white clover), Zea</td>
<td>Neoaliturus tenellus, N. opacipennis</td>
</tr>
<tr>
<td>22.</td>
<td>Beet leaf curl rhabdovirus (BLCV)</td>
<td><em>Carnation mottle carmo Virus</em></td>
<td>Dianthus caryophyllus, D.barbatus, Begonia spp., Sapo</td>
<td>Piesma quadratum</td>
</tr>
<tr>
<td>23.</td>
<td>Carnation mottle carmo Virus (CarMV)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Species &amp; Disease Names</td>
<td>Hosts</td>
<td>Symptoms</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------------------------------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------------</td>
<td>-------------------------------------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>24.</td>
<td>Carnation ringspot virus (CRSV)</td>
<td>Sin: carnation ringspot dianthovirus</td>
<td>(P): Dianthus (carnation), Dianthus barbatus (sweet williams), Dianthus caryophyllus (carnation), Malus sylvestris (crab-apple tree), Prunus avium (sweet cherry), Prunus cerasus (sour cherry), Prunus domestica (plum), Pyrus communis (European pear), Prunus salicina (Japanese plum), Vitis vinifera (grapevine)</td>
<td>daun (leaf), benih (seed), bibit tanaman (seedling)</td>
</tr>
<tr>
<td>26.</td>
<td>Cassava brown streak carlavirus (CBSaV)</td>
<td>Sin: Cassava brown streak potyvirus, Cassava brown streak-associated (?) carlavirus</td>
<td>(P): Manihot esculenta (ubi kayu, cassava)</td>
<td>tunas (bud), tanaman (plant)</td>
</tr>
<tr>
<td>27.</td>
<td>African cassava mosaic bigeminivirus (ACMV)</td>
<td>Sin: African cassava mosaic virus, Indian cassava mosaic disease, cassava latent virus, cassava mosaic virus,</td>
<td>(P): Manihot esculenta (ubi kayu, cassava), Ricinus spp. (S): Hewittia sublobata, Lapor tea (=Fluerya) aestuans, Manihot glaziovii, Jatropha sp.</td>
<td>Tanaman (plant), tunas (bud), suluran (stolon)</td>
</tr>
<tr>
<td>28.</td>
<td>Citrus cachexia viroid</td>
<td>Sin: Citrus xyloporosis viroid, Citrus xyloporosis ‘virus’</td>
<td>(P): Citrus spp.(jeruk, orange)</td>
<td>tanaman (plant), batang (stem)</td>
</tr>
<tr>
<td>29.</td>
<td>Citrus impietratura virus</td>
<td>Sin: Citrus impietratura disease</td>
<td>(P): Citrus spp.(jeruk, orange)</td>
<td>bagian tanaman (part of-part of plant) except benih (seed)</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Synonyms</td>
<td>Host Plants</td>
<td>Symptoms</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------</td>
<td>------------------------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>30.</td>
<td>Citrus leaf rugose ilarvirus (CiLRV)</td>
<td>(P): Citrus aurantifolia, C. limon, C. paradise</td>
<td>(S): Vigna spp. (kacang panjang, cowpea), Vigna unguiculata (kacang tunggak)</td>
<td>tunas (bud), benih (seed)</td>
</tr>
<tr>
<td>31.</td>
<td>Cocoa necrosis nepo virus (CoNV)</td>
<td>(P): Theobroma cacao (kakao, cocoa)</td>
<td>akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/infloresence), buah (fruit)</td>
<td>Vector: Planococcoides njalensis, Ferrisia virgata, Planococcus citri, Longidorus spp.</td>
</tr>
<tr>
<td>32.</td>
<td>Cocoa swollen shoot badnavirus (CSSV)</td>
<td>(P): Theobroma cacao (kakao, cocoa)</td>
<td>akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/infloresence), buah (fruit)</td>
<td>Vector: Planococcoides njalensis, P.citri, Phenacoccus hargreavesi, Pseudococcus concavocerrari, Ferrisia virgata, Pseudococcus longisPinus merkusii (tusam, pine tree), Delococcus tafensis, Paraputo anomitus</td>
</tr>
<tr>
<td>33.</td>
<td>Cocoa yellow mosaic tymovirus (CYMV)</td>
<td>(P): Theobroma cacao (kakao, cocoa)</td>
<td>akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/infloresence), buah (fruit)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Common Name</td>
<td>Hosts</td>
<td>Symptoms</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>----------------------------------</td>
<td>-------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------</td>
</tr>
</tbody>
</table>
| 34. | Coconut cadang-cadang cocadviroid (CCCVd) | (P): Cocos nucifera (kelapa, coconut), Elaeis guineensis (kela sawit, oil palm), Arenga pinnata, Borassus flabelifer (longar, palmyra palm), Chloris, Phoenix dactylifera  
(S): Corypha elata, Livistona rotundifolia, Arecaaceae, Pandanaceae, Zingiberaceae, Marantaceae (Maranta sp.), Commelinaceae | benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant) | Brevipalpus phoenicis |
| 35. | Coconut Tinangaja viroid (CtIVd)   | (P): Cocos nucifera (kelapa, coconut) | benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant) | | |
| 36. | Coffee ringspot nucleorhabdovirus (CoRSV) | (P): Coffea spp. (kopi, coffee) | benih (seed), tanaman (plant) | | |
| 37. | Coffee Blister Spot Virus         | (P): Coffea spp. (kopi, coffee) | benih (seed), buah (fruit), tanaman (plant) | | |
| 38. | Cotton anthocyanosis virus (CAV)  | (P): Gossypium barbadens (kapas, Gallini cotton), Gossypium hirsutum (kapas, Bourbon cotton),  
(S): Abelmoschus esculentus, Hibiscus cannabinus, Sida rhombifolia, S. micrantha | tunas (bud), tanaman (plant), Vector: : Aphis gossypii; Aphididae | | |
(S): Abutilon, Althaea, Castanospermum australe, Glycine max (kedelai, soybean), Gossypium, Hibiscus cannabinus, Malva parviflora, Phaseolus acutifolius Vigna angularis | tanaman (plant), Vector: : Bemisia tabaci | | |
<table>
<thead>
<tr>
<th>No.</th>
<th>Virus Name</th>
<th>Plant Family</th>
<th>Host Plants</th>
<th>Vector(s)</th>
<th>Plants Parts</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>41</td>
<td>Cotton leaf curl geminivirus</td>
<td>(S):</td>
<td>Abelmoschus esculentus, Althea roae, Corchorus fasicularis, Hibiscus cannabis, H. esculentus, H. sabdarifa, Malvaviscus arboreus, Sida alba</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>42</td>
<td>Cotton leaf mottle bigeminivirus</td>
<td>(P):</td>
<td>Gossypium barbadens (kapas, cotton)</td>
<td>akar (root), batang (stem), daun (leaf), bunga (flower/inflorescence), buah (fruit), Vector: Bemisia tabaci</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>43</td>
<td>Cowpea chlorotic mottle bromovirus</td>
<td>(CCMV)</td>
<td>Vigna spp. (kacang panjang, cowpea), Glycine max(kedelai, soybean)</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(Sin: bean yellow stipple virus, virus del moteado Amarillo, mammor flavcpunctum)</td>
<td></td>
<td></td>
<td>Vector: Ceratoma ruficornis, C.trifurcata, Diabrotica balteata, D. undecimpunctata, Coleoptera</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>44</td>
<td>Cucumber green mottle tomatovirus</td>
<td>(CGMMV)</td>
<td>Cucumis sativus (mentimun, cucumber), Citrullus vulgaris (semangka, watermelon), Cucumis melo (melon, melon), Lagenaria sicera, Momordica charantia</td>
<td>benih (seed), akar (root), tanaman (plant), tanah (soil), air (water), pupuk (manure), medika tanaman (planting medium), Vector: Raphidopalpa fevicollis, Cuscuta spp.</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>(P):</td>
<td>(S):</td>
<td>Prunus americana (apricot)</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>45</td>
<td>Dendrobium vein necrosis closterovirus</td>
<td>Orchidaceae</td>
<td>Vitis spp. (anggur, Vitis spp.)</td>
<td>tanaman (plant), umbi (corn)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>46</td>
<td>Grapevine Bulgarian latent nepovirus</td>
<td>Orchidaceae</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Grapevine chrome mosaic nepovirus (GCMV)</td>
<td>(P): Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>(S): Apium graveolens</td>
<td>kulit (bark of), batang (stem), daun (leaf), tunas (bud), akar (root), benih (seed)</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>---</td>
<td>--------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------</td>
<td>----------------------</td>
<td>-----------------------------------------------------------------</td>
<td>---</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Grapevine stem pitting associated closterovirus</td>
<td>(P): Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>tunas (bud), suluran (stolon), kulit (bark of), batang (stem), daun (leaf), tunas (bud), akar (root), benih (seed)</td>
<td>Vector: Pseudococcidae.</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Grapevine fan leaf nepovirus (GFLV)</td>
<td>(P): Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>tunas (bud), suluran (stolon), tanaman (plant), benih (seed)</td>
<td>Vector: Xiphinema index, X. Italye</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Grapevine fleck virus (GFkV)</td>
<td>(P): Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>Batang (stem), tanaman (plant)</td>
<td></td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>Grapevine leafroll-associated viruses (GLRaV)</td>
<td>(P): Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>kulit (bark), akar (root), batang (stem), daun (leaf), Vector: Pseudococcus longispinus, Pinus merkusii (tusam, pinetree), P. calceolariae, P. maritimus, P. affinis, P. viburni, Planococcus ficus, P. citri, Heliococcus bohemicus, Phenacoccus, Prunus cerasus</td>
<td></td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Host Plant</td>
<td>Vectors</td>
<td>Remarks</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>-------------------------------------</td>
<td>------------</td>
<td>---------</td>
<td>---------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>52.</td>
<td>Grapevine vein necrosis virus</td>
<td>Vitis vinifera (anggur, grapevine)</td>
<td>tanaman (plant), batang (stem)</td>
<td>√ √ √ √ √</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>53.</td>
<td>Johnsongrass Mosaic Virus</td>
<td>Pennisetum glaucum (pearl millet), Saccharum officinarum (tebu, sugarcane), Sorghum bicolor (sorghum), Sorghum halepense (Johnson grass), Urochloa brizantha (palisadegrass), Zea mays (jagung, maize)</td>
<td>benih (seed), bagian tanaman (all part of plant)</td>
<td>√ √ √ √ √</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>54.</td>
<td>Maize chlorotic dwarf waikavirus</td>
<td>Zea mays (jagung, corn, maize)</td>
<td>tanaman (plant), Vector: Amblysellus grex, Dalbulus maidis, Endria inimica, Exthananus exitiosus, Graminella nigfrons, Graminella sonora, Macrosteles severini, Planicephalus flavo costatus, Stirellus bicolor</td>
<td>√ √ √ √ √</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>55.</td>
<td>Maize chlorotic mottle machlovirus</td>
<td>Triticum aestivum (gandum, wheat), Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorghum, sorghum)</td>
<td>biji (grain), tanaman (plant) Vector: Chaetocnema pulecari, Diabrotica spp., Frankliniella williamsii, Oulema melanopus, Systena frontalis</td>
<td>√ √ √ √ √</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Hosts</td>
<td>Symptoms</td>
<td>Vector</td>
<td>Reference</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------------------------------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------</td>
<td>---------------------------------------------------------------------------------------------</td>
<td>---------------------------------------</td>
<td>-----------</td>
</tr>
<tr>
<td>56.</td>
<td>Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV)</td>
<td>Sorghum halepense (Johnson grass), Zea mays (jagung, maize), Zea mays subsp. mays (sweetcorn), Avena sativa (oats), Panicum miliaeum (millet), Saccharum officinarum (tebu, sugarcane)</td>
<td>Benih (seed), semua bagian tanaman (all part of plant)</td>
<td>Peregrinus maidis</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>57.</td>
<td>Maize mosaic nucleorhabdovirus (MMV)</td>
<td>Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorgum, sorghum)</td>
<td>Tanaman (plant), Vector: Peregrinus maidis</td>
<td>Z. mays, S. bicolor</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>58.</td>
<td>Maize rayado fino marafivirus (MRFV)</td>
<td>Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorgum, sorghum), Hordeum vulgare (barli, barley)</td>
<td>Tanaman (plant), Vector: Dalbulus maidis, D. elimatus, Baldulus tripsaci, Graminella nigrifrons</td>
<td>Z. mays, S. bicolor</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>59.</td>
<td>Maize Rough Dwarf fijivirus (MRDV)</td>
<td>Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorgum, sorghum), Hordeum vulgare (barli, barley), Triticum aestivum (gandum, wheat), Avena sativa (oat, oats)</td>
<td>Tanaman (plant), Vector: Delphacodes propinqua, Dicranotropis hamata, Laodelphax striatellus, Javasella pellucida, Ribauto delphax notabilis, Sogatella vibix</td>
<td>Z. mays, S. bicolor, T. aestivum, A. sativa</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Scientific Name</td>
<td>Plant Family</td>
<td>Hosts (plant names)</td>
<td>Vector(s)</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------------------------------------------</td>
<td>-----------------</td>
<td>--------------</td>
<td>-------------------------------------------------------------------------------------</td>
<td>--------------------------------------------------------------------------</td>
</tr>
<tr>
<td>61</td>
<td>Maize stripe tenuivirus (MSpV)</td>
<td><em>Nesoclutha</em></td>
<td></td>
<td>Neosolthia declivata</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>Sin:</strong> maize chlorotic stripe virus, sorghum</td>
<td></td>
<td></td>
<td>chlorosis virus</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(P):</strong> Zea mays (jagung, corn, maize)</td>
<td></td>
<td></td>
<td>Sorghum bicolor (sorghum, sorghum)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(S):</strong> Avena sativa (oat, oats)</td>
<td></td>
<td></td>
<td>Hordeum vulgare (barli, barley), Orza sativa (padi, paddy), Triticum aestivum</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(wheat), Saccharum officinarum (tebu, sugarcane), Secale cereale</strong></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>62</td>
<td>Maize White Line Mosaic Virus (MWLMV)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>Sin:</strong> Maize dwarf ringspot virus, Maize</td>
<td></td>
<td></td>
<td>white line virus</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(P):</strong> Zea mays (jagung, corn, maize)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>63</td>
<td>Orchid fleck rhabdovirus (OFV)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>Sin:</strong> dendrobium leaf streak virus, dendrobium</td>
<td></td>
<td></td>
<td>virus, probably laelia red leaf spot, short orchid rhabdovirus, orchid rhabdovirus,</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(P):</strong> Orchidaceae</td>
<td></td>
<td></td>
<td>phalaenopsis chlorotic spot virus, phalaenopsis hybrid virus, phalaenopsis</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(S):</strong> <em>Orchidaceae</em></td>
<td></td>
<td></td>
<td>nopsis</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>64</td>
<td>Papaya ring spot potyvirus strain W (PRSV)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>Sin:</strong> papaya distortion mosaic virus, papaya</td>
<td></td>
<td></td>
<td>leaf distortion virus, papaw distortion ringspot virus, papaw mosaic virus, watermelon</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(P):</strong> Carica papaya</td>
<td></td>
<td></td>
<td>mosaic virus 1 (type P), Guadeloupe papaya ringspot, papaya ringspot - type W has</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(S):</strong> Cucurbitaceae</td>
<td></td>
<td></td>
<td>shown to be watermelon mosaic virus 1 potyvirus)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>65</td>
<td>Papaya mosaic virus (PapMV)</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>Sin:</strong> Argentine plan tago potexvirus;</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(P):</strong> Carica papaya (papaya, papaw)</td>
<td></td>
<td></td>
<td>daun (leaf), bibit (seedling), buah (fruit), bunga (flower/inflorescence)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td><strong>(S):</strong> Cucurbitaceae</td>
<td></td>
<td></td>
<td>Vektor: <em>Myzus persicae</em>, <em>Aphis craccivora</em>, A. gossypii, <em>Toxoptera citricida</em></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

Legend: tanaman (plant), bibit (seedling), buah (fruit), bunga (flower/inflorescence).
<table>
<thead>
<tr>
<th>No.</th>
<th>Virus Name</th>
<th>Plant(s)</th>
<th>Symptoms</th>
<th>Vector(s)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>66</td>
<td>Papaya necrosis virus (PDNV, PANV)</td>
<td>Carica papaya (papaya, papaw)</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>Acyrthosiphon pismus, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>67</td>
<td>Pea enation mosaic enamovirus (PEMV)</td>
<td>Vicia faba (pea), Cicer arietinum, Lathyrus odoratus, Lens culinaris, Medicago arabica, Pisum sativum, Trifolium incarnatum, Vicia sativa</td>
<td>benih (seed), tanaman (plant)</td>
<td>Acyrthosiphon pismus, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>68</td>
<td>Pea streak carlavirus</td>
<td>Pisum sativum (kapi, sweet pea), Leguminosae, Medicago sativa, Cicer arietinum</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>Xiphinema americanum, Longidorus diadecturus</td>
</tr>
<tr>
<td>69</td>
<td>Peach rosette mosaic nepovirus (PRMV)</td>
<td>Vitis vinifera (anggur, grapevine), Prunus persica, Vaccinium corymbosum, Rumex crispus, Solarum carolinense, Taraxacum officinale</td>
<td>benih (seed), batang (stem), daun (leaf), buah (fruit), suluran (stolon), tanah (soil), media tanam (planting medium), Vector: Xiphinema americanum, Longidorus diadecturus</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>70</td>
<td>Peanut chlorotic streak caulimovirus (PCSV)</td>
<td>Arachis hypogaea (kacang tanah, groundnut, peanut), Canavalia ensiformis, Cyanopsis tetragonoloba, Glycine max</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>Xiphinema americanum, Longidorus diadecturus</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Host Plants</td>
<td>Species</td>
<td>Vector</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------</td>
<td>-------------</td>
<td>---------</td>
<td>--------</td>
</tr>
<tr>
<td>71.</td>
<td>Peanut clump pecluvirus (IPCV)</td>
<td>Arachis hypogaea (kacang tanah, groundnut, peanut), Saccharum officinarum (tebu, sugarcane), Triticum aestivum (gandum, wheat), Setaria italica (foxtail millet)</td>
<td>Benih/biji (seed/grain), tanaman (plant)</td>
<td>Polymyxa graminis</td>
</tr>
<tr>
<td>72.</td>
<td>Peanut green mosaic potyvirus (PCMV)</td>
<td>Arachys hypogaea (kacang tanah, groundnut, peanut), Vigna sp. (kacang panjang, cowpea), Tetragonia tetragonioides</td>
<td>tanaman (plant)</td>
<td>Aphis gossypii, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>73.</td>
<td>Peanut stunt cucumovirus (PSV)</td>
<td>Arachys hypogaea (kacang tanah, groundnut, peanut), Glycine max (kedelai, soybean), Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Nicotiana tabacum (tembakau, tobacco), Vigna spp. (buncis, cowpea)</td>
<td>benih (seed), tanaman (plant)</td>
<td>Aphis craccivora, A. spiraeola, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>74.</td>
<td>Potato mop-top pomovirus (PMTV)</td>
<td>Solanum tuberosum (kentang, potato)</td>
<td>ubi (tuber), tanaman (plant)</td>
<td>Macrosiphum euphorbiae, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>75.</td>
<td>Potato spindle tuber pospivroid (PSTV)</td>
<td>Solanum tuberosum (kentang, potato), Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Persea americana (alpokat, avocado)</td>
<td>benih (seed), ubi (tuber), polen, tanaman (plant)</td>
<td>Macrosiphum euphorbiae, Myzus persicae</td>
</tr>
<tr>
<td>76.</td>
<td>Potato Vein Yellowing crinivirus (PYVV)</td>
<td>Solanum tuberosum (kentang, potato)</td>
<td>ubi (tuber), tanaman (plant)</td>
<td>Trialeurodes vaporariorum</td>
</tr>
<tr>
<td>77.</td>
<td>Potato T trichovirus (PV-T)</td>
<td>Solanum tuberosum (kentang, potato)</td>
<td>benih (seed)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Sin:</td>
<td>Hosts</td>
<td>Vector</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------</td>
<td>------</td>
<td>-------</td>
<td>--------</td>
</tr>
<tr>
<td>78.</td>
<td>Potato U Nepovirus (PV-U)</td>
<td>Potato T capillovirus, Oxalis tuberosa, Ullucus tuberosus (seed), tanaman (plant)</td>
<td>Solanum tuberosum (kentang, potato), Nicotiana tabacum (tembakau, tabaco), Beta vulgaris (bit, beetroot), Cucumis sativus (mentimun, cucumber), Lycopersicum esculentum (tomat, tomato)</td>
<td>Longidorus sp.</td>
</tr>
<tr>
<td>79.</td>
<td>Raspberry ring spot nepovirus (RpRSV)</td>
<td>Raspberry Scottish leaf curl virus, Red currant ringspot virus, Red currant ringspot virus</td>
<td>Rubus spp. (raspberry), Fragaria vesca (arbei, strawberry), Prunus cerasus (ceri, cherry), Vitis vinifera (anggur, grapevine), Prunus cerasus (ceri, cherry), Prunus domestica (plam, plum), Prunus americana (aprikot, apricot), Prunus persica (persik, peach), Fragaria vesca (arbei, strawberry), Ligustrum vulgare, Narsius pseudonar cissus, Ribes, Weigela</td>
<td>Longidorus elongatus, L. macrosoma</td>
</tr>
<tr>
<td>80.</td>
<td>Rice Black Streaked Virus (RBSDV)</td>
<td>Rice black-streaked dwarf fijivirus; Rice black streak virus; Rice streak (dwarf) virus; Black streaked dwarf disease</td>
<td>Avena sativa (oat, oats), Hordeum vulgare (barley), Oryza sativa (padi, paddy), Triticum aestivum (gandum, wheat), Zea mays (jagung, maize)</td>
<td>Beckmannia syzigachne (american sloughgrass), Elesine coracana (finger millet), Festuca arundinacea (reed fescue), Lolium multiflorum (Italian ryegrass), Lolium perenne (perennial ryegrass), Panicum miliaceum (millet), Phleum pratense (timothy), Poa annua (annual meadowgrass), Secale cereale (rye), Setaria italica (foxtail millet),</td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Host Plant</td>
<td>Vectors</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------</td>
<td>------------</td>
<td>---------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>81.</td>
<td>Rice Dwarf phytoreovirus (RDV)</td>
<td><em>Sorghum bicolor</em> (<em>sorghum</em>), <em>Triticum</em> (<em>wheat</em>)</td>
<td>tanaman (plant) Vector: <em>Nephotettix cincticeps</em>, <em>N. nigropictus</em>, <em>Nephotettix spp.</em>, <em>Recilia dorsalis</em></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>82.</td>
<td>Rice hoja blanca tenuivirus (RHBV)</td>
<td><em>Oryza sativa</em> (<em>padi, paddy</em>), <em>Triticum aestivum</em> (<em>gandum, wheat</em>), <em>Avena sativa</em> (<em>oat, oats</em>), <em>Hordeum vulgare</em> (<em>barley</em>), <em>Secale cereale</em> (<em>rye</em>), <em>Echinochloa hoja blanca virus</em></td>
<td>tanaman (plant) Vector: <em>Tagosodes orizicolus</em></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>86.</td>
<td>Prunus necrotic ringspot ilarvirus (PNRSV)</td>
<td><em>Prunus persica</em>, <em>Prunus cerasus</em>, <em>Prunus persica</em>, <em>Rosa spp.</em> (<em>mawar, rose</em>), <em>Prunus domesticum</em> (<em>plum, plum</em>), <em>Prunus benih</em> (<em>seed</em>), <em>polen</em> (<em>pollen</em>), <em>batang</em> (<em>stem</em>), <em>tanaman</em> (plant)</td>
<td>tanaman (plant) Vector: <em>Nephotettix cincticeps</em>, <em>N. nigropictus</em>, <em>N. virescens</em></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Hosts</td>
<td>Symptoms</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------</td>
<td>-------</td>
<td>----------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>87.</td>
<td>Rose streak virus (RSV)</td>
<td><strong>(P): Rosa spp. (mawar, rose)</strong></td>
<td>batang (stem), tanaman (plant)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>88.</td>
<td>Satsuma dwarf orange nepovirus (SDV)</td>
<td><strong>(P): Citrus spp. (jeruk, orange)</strong></td>
<td>mata tunas (eyebud), benih (seed), tanaman (plant)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>89.</td>
<td>Squash mosaic comovirus (SqMV)</td>
<td><strong>(P): Cucurbitaceae, Citrullus vulgaris (semangka, watermelon), Cucumis melo (melon), Cucumis sativus (mentimun, cucumber), Cucurbita maxima (waluh, labu parang, pumpkin), C. pepo</strong></td>
<td>benih (seed), tanaman (plant), Vector: Acalymma trivittata, A. thiemei thiemei, Diabrotica undecimpunctata undecimpunctata, D. bivittula, Epilachna chrysomelina, E. paenulata</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>90.</td>
<td>Strawberry crinkle virus (SCV)</td>
<td><strong>(P): Fragaria (strawberry), Fragaria ananassa</strong></td>
<td>bunga (flower), buah (fruit), bibit tanaman (seedling)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>91.</td>
<td>Strawberry latent C rhabdovirus (SLCV)</td>
<td><strong>(P): Fragaria vesca (arbei, strawberry)</strong></td>
<td>suluran (stolon), Vector: Chaetosiphon</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Hosts</td>
<td>Symptom</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>-----------------------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------</td>
<td>------------------------------</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>92.</td>
<td>Strawberry mild yellow edge virus (SMYEV)</td>
<td><em>Fragaria</em> (strawberry), <em>Fragaria ananassa</em> (strawberry), <em>Fragaria chiloensis</em> (Chilean strawberry), <em>Fragaria ovalis</em>, <em>Fragaria vesca</em> (wild strawberry), <em>Fragaria virginiana</em> (scarlet strawberry (UK))</td>
<td>Bunga (flower), buah (fruit), bibit tanaman (seedling)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>94.</td>
<td>Strawberry vein banding virus (SVBV)</td>
<td><em>Fragaria vesca</em> (wild strawberry), <em>Fragaria ananassa</em> (strawberry)</td>
<td>daun (leaf), bibit tanaman (seedling)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>95.</td>
<td>Sugarcane bacilliform badnavirus (SCBV)</td>
<td><em>Saccharum officinarum</em> (tebu, sugarcane)</td>
<td>tunas (bud), batang (stem), mata tunas (eye-bud)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>96.</td>
<td>Sugarcane mild mosaic virus (SCMMV)</td>
<td><em>Saccharum officinarum</em> (tebu, sugarcane)</td>
<td>bagian tanaman (part of plant)</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>97.</td>
<td>Sugarcane yellow leaf luteovirus (ScYLV)</td>
<td><em>Saccharum officinarum</em> (tebu, sugarcane) <em>S.robustum</em>, <em>S. sinensis</em>, <em>S.sppontaneum</em></td>
<td>batang (stem), suluran (stolon), tanaman (plant), Vector: <em>Melanaphis sacchari</em>, <em>Rhopalosiphum</em></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>No.</td>
<td>Virus Name</td>
<td>Sin:</td>
<td>(P):</td>
<td>Benih (Seed)</td>
</tr>
<tr>
<td>-----</td>
<td>------------</td>
<td>-----</td>
<td>------</td>
<td>-------------</td>
</tr>
<tr>
<td>98.</td>
<td>Tomato Aspermy cucumovirus (TAV)</td>
<td>Chrysanthemum aspermy virus, Chrysanthemum mild mottle virus, tomato aspermy cucumovirus, Chrysanthemum mosaic virus, cucumis virus 1, lycopersicon virus 7</td>
<td>Chrysanthemum spp. (krisan, chrysant ), aster, Capsicum annuum (cabai, hot pepper, chilies, red pepper), Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Canna sp., Lilium sp., Mentha spicata, Petunia hybrida, Zinnia elegans</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>99.</td>
<td>Tomato ringspot virus (ToRSV)</td>
<td>Tomato ringspot nepovirus, Prunus stem pitting virus, blackberry (Himalaya) mosaic virus, Nicotiana 13 virus, Tobacco ringspot virus 2, peach stem pitting virus, prune brown line virus, gravelins yellow vein virus, Red currant mosaic vurus, winter peach mosaic virus, apple union necrotic nepovirus</td>
<td>Fragaria chiloensis (Chilean strawberry), Malus domestica (apple), Nicotiana tabacum (tobacco), Pelargonium (pelargoniums), Prunus (stone fruit), Prunus armeniaca (apricot), Prunus avium (sweet cherry), Prunus cerasus (sour cherry), Prunus domestica (plum), Prunus persica (peach), Prunus salicina (Japanese plum), Ribes (currants), Rubus (blackberry, Raspberry), Rubus idaeus (raspberry), Vitis vinifera (grapevine)</td>
<td>✓</td>
</tr>
<tr>
<td>100.</td>
<td>Agropyron mosaic virus</td>
<td>Agropyron mosaic rymovirus, Agropyron green mosaic virus, Agropyron yellow mosaic virus, Agropyron streak mosaic virus, couch grass streak mosaic virus, wheat virus 2, Marmor agropyri, Agropyron mosaic PV75 severe isolate, Agropyron mosaic PV101 isolate, Agropyron mosaic mild isolate</td>
<td>Elymus repens (quackgrass), Triticum aestivum (wheat), Triticum turgidum (durum wheat)</td>
<td>✓</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Keterangan
PG: Pengenalan gejala
TI: Tanaman indikator, kolom yang berwarna abu-abu menandakan belum ditemukan referensi yang akurat untuk jenis tersebut.
### Matriks Diagnostik Virus Tanaman Optk Kategori A2

<table>
<thead>
<tr>
<th>NO.</th>
<th>NAMA LMIAH/ ORDO / FAMILI / NAMA UMUM</th>
<th>INANG</th>
<th>MEDIA PEMBAWA</th>
<th>PG</th>
<th>TI</th>
<th>DIBA</th>
<th>ELISA</th>
<th>PCR</th>
<th>RT PCR</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>Banana streak badnavirus</td>
<td>Musa spp. (pisang, banana)</td>
<td>Tanaman and bagian tanaman (plant and part thereof) Musa spp. (pisang, banana)</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>Bean Golden mosaic bigeminivirus</td>
<td>Ipomoea batatas (ubi jalar, sweet potato)</td>
<td>Benih (seedling of) Ipomoea batatas (ubi jalar, sweet potato)</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>Sweet potato feathery mottle virus</td>
<td>Saccharum officinarum (tebu, sugarcane)</td>
<td>Benih tanaman (seedling of) Saccharum officinarum (tebu, sugarcane)</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>Fiji disease phytoereovirus</td>
<td>Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorgum, sorghum), Saccharum officinarum (tebu, sugarcane)</td>
<td>Benih (seedling of) Saccharum officinarum (tebu, sugarcane), Zea mays (jagung, corn, maize), Sorghum bicolor (sorgum, sorghum)</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>Maize dwarf mosaic potyvirus</td>
<td>Allium ascalonicum (bawang merah, shallot)</td>
<td>Benih/umbi (seeds/bulb of): Allium cepa, A. ascalonicum, A. porrum, A. sativum</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>Onion yellow dwarf potyvirus</td>
<td>Lycopersicum esculentum (tomat, tomato), Capsicum annuum (paprika, bell-pepper)</td>
<td>Stek (stoke), tanaman (plant of) Vektor: Frankliniella bispinosa, F. intonsa,</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td>√</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Diseases</td>
<td>Hosts</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>----------------------------------</td>
<td>----------------------------------------------------------------------</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Dahlia oakleaf virus, dahlia</td>
<td>Lactuca sativa (selada, lettuce), Pisum sativum (kapi, sweet pea), Nicotiana tabacum (tembakau, tobacco), Solanum tuberosum (kentang, potato), Solanaceae, Alstroemeria, Ananas comosus (nenas, pineapple), Anemone coronaria, Apium graveolens (selderi, celery), Arachys hypogaea (kacang tanah (soil), groundnut, peanut), Aster, Begonia, Bidens pilosa, Benincasa hispida, Calceolaria, Chrysanthemum x monofolium, Canica papaya (papaya, pawpaw), Cichorium endivia, Cicerarietinum, Citrullus lanatus (semangka, watermelon), Columnea hirta, Canavalia gladiata, Capsicum annuum (cabai, hot pepper), Callistephus chinensis, Catharanthus roseus, Cucumis sativus (meritun, cucumber), Cucurbita pepo, Crotalaria juncea, Cyphomandra betacea, Cyana scolymus, Cyclamen, Dahlia, Dieffenbachia, Eustoma grandiflorum, Ficus elastica, Ficus pumila, Gerbera spp., Gerbera jamesonii, Galinsoga parviflora, Glycine max (kedele, soybean), Gossypium hirsutum (kapas, cotton), helianthus annuus</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ringspot virus, dahlia yellow</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ringspot virus, groundnut</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ringspot virus, mung bean leaf</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>curl virus</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td></td>
<td>F.fusca, F.occidentalis, F. schultzzei, F. tenuicornis, Thrips palmi, T. setosus, T. tabaci, T.flavus, Scirtothrips dorsalis</td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
(bunga matahari, sunflower), Impatiens walleriana, Jacquemontia tamnifolia, Kalanchoe, Lens culinaris ssp. culinaris (lentil), Lathyrus sativus, Lupinus spp. (Lupine), Mentha piperita, Nicandra physalodes, Nicotiana rustica, Ocimum, Ocinum basilicum, Pelargonium, Petunia hybrida, Phassolus, Vigna radiata (kacang hijau, mungbean), Vigna mungo, Vigna cylindrica (buncis, common bean), Physalis peruviana, Phalaenopsis, Sechium edule, Senecio cruentus, Stephanotis floribunda, Sinningia, Sinningia speciosa, Solarum melongena (terung, eggplant, aubergine), Tagetes, Tephrosia purpurea, Vicia faba, Vigna unguiculata, Vitis vinifera (anggur, grapevine), Valerianella locusta, Zinnia elegans, Zantedeschia aethiopica, Ageratum conyzoides, Calendula officinalis, Canna indica, Coleus, Mirabilis jalapa, Saintpaulia ionantha, Salvia officinalis, Valeriana officinalis
Lampiran 1

Lembar Kerja Per OPTK
Barley stripe mosaic virus
Akronim:
BSMV

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

Taksonomi
Virus Group: Virus
Family: Unassigned virus family
Genus: Hordeivirus

Nama Umum:
Inggris: stripe mosaic of barley
Perancis: mosaïque striée de l'orge
Jerman: Streifenmosaikvirus der Gerste

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

Deteksi di Lapang:

Diagnosis dan Identifikasi
1. Tanaman Indikator
BSMV dapat ditransmisikan secara mekanis pada tanaman indikator. Gejala umumnya muncul pada 10 sampai 14 hari setelah inokulasi dengan sap tanaman yang telah terinfeksi BSMV.
Berikut adalah beberapa jenis tanaman yang dapat digunakan untuk diagnosis (Atabekov & Novikov 1989).

1. *Hordeum vulgare* (barley), *Triticum aestivum* (wheat) and *Avena sativa* (oat): gejala belang mosaik sistemik yang bervariasi.

Gambar (Atabekov dan Novikov 1989):

2. DAS ELISA

Penyiapan sampel pengujian:

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

Cara kerja:
DAS ELISA dilakukan seperti protokol yang tertera pada pedoman diagnosis virus tanaman.
3. RT-PCR

Penyiapan sampel
Dikerjakan seperti pada metode DAS ELISA

Ekstraksi RNA

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

Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Satu langkah RT-PCR menggunakan Bead RT-PCR

Komposisi komponen RT-PCR menggunakan bead

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakkan RNA</td>
<td>3-5 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td>Sesuaikan volume hingga 50 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Volume total 50 µl

Primer yang digunakan berdasarkan Fenwick et al. 2009:

BSMV Gamma F: 5'- GAA GAT GCA GGA GCT GAA ACT TTC-3’
BSMV Gamma R: 5’-TGG TCT TCC CTT GGG GGA CCG AGG-3’

Panjang produk: 400 bp

Program RT-PCR :
1. 42°C 45 menit
2. 95°C 5 menit
3. 95°C 30 detik
4. 55°C 45 detik
5. 72°C 1 menit

Ulangi langkah 3-5 sebanyak 26 kali
6. 72°C 10 menit
7. 10°C tak terhingga

Elektroforesis
Elektroforesis dilakukan sesuai dengan cara kerja yang tetera pada pedoman diagnosis virus tanaman.
Daftar Pustaka
**Beet curly top virus**

Akronim: BCTV

**Kisaran Inang:**

**Inang utama:**

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

**Inang lainnya:**

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

**Inang liar:**

Jenis-jenis *Capsicum*

**Taksonomi**

Family: Geminiviridae  
Genus: Curtovirus  
Species: Beet curly top virus

**Nama Ilmiah lain:**

Beet curly top geminivirus  
beet curly top hybrigeminivirus  
sugarbeet curly top virus  
tomato yellow virus  
tomato yellows virus  
sugarbeet curly-leaf virus  
sugarbeet virus 1  
western yellow blight virus  
potato green dwarf virus

**Status**

OPTK Kategori A1 Golongan I Berdasarkan Kepmenpan no. 38/tahun 2006
**Deteksi di Lapang:**


**Diagnosis dan Identifikasi**

1. **Tanaman Indikator**

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


2. **RT-PCR**

Penyiapan sampel penguji:

4. Untuk sampel benih, dilakukan penanaman di dalam wadah plastik sebanyak 400 benih tanaman untuk setiap subsampel. Penanaman dilakukan selama 3-7 hari hingga kecambah yang tumbuh telah cukup cukup untuk dilakukan pengujian.

5. Untuk sampel tanaman selain benih, seperti daun dapat langsung dilakukan pengujian. Agar pengujian lebih akurat pilih daun dengan perkembangan gejala yang paling baik.
Untuk sampel umbi Kentang ambil bagian stolon dan tunasnya.

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

**Polymerase Chain Reaction**
PCR dilakukan menggunakan ready to go PCR bead dengan komposisi sebagai berikut:

<table>
<thead>
<tr>
<th>Komponen</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Primer target F</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Primer target R</td>
<td>1 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Cetakan DNA</td>
<td>2-3 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Air bebas nuklease</td>
<td>Sesuaikan volume hingga 25 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>Volume total</td>
<td>25 µl</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Program PCR:
1. 95°C 5 menit
2. 95°C 30 detik
3. 54°C 45 detik
4. 72°C 1 menit
Ulangi langkah 3-5 sebanyak 29 kali
5. 72°C 10 menit
6. 10°C tak terhingga

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

**Daftar Pustaka**


Lampiran 2

Jenis dan Kondisi Tanaman Indikator
Kondisi tanaman yang digunakan sebagai tanaman uji (tanaman indikator)

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

Bahan Pengujuan untuk Metode ELISA dan PCR
Komposisi dan cara pembuatan buffer Direct DAS ELISA (protokol Agdia)

**PBST-Tween (PBST)**
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades.
8.0 g NaCl
1.15 g Na$_2$HPO$_4$$\cdot$2H$_2$O
0.2 g KH$_2$PO$_4$
0.2 g KCl
0.5 g Tween-20
Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4

**Coating Buffer**
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades
1.59 g Na$_2$CO$_3$
2.93 g NaHCO$_3$
0.2 g NaN$_3$
Atur derajat keasamannya hingga pH 9.6, simpan pada suhu 4ºC

**Ekstrak Buffer**
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml PBST
1.3 g Na$_2$SO$_3$
20.0 g PVP MW 24-40.000
0.2 g NaN$_3$
2.0 g Chicken Albumin, Grade II
20.0 g Tween-20
Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4, simpan pada suhu 4ºC

**Konjugat/ECI Buffer**
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml PBST
2.0 g Bovine Serum Albumin (BSA)
20.0 g PVP MW 24-40.000
0.2 g NaN$_3$
Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4, simpan pada suhu 4ºC

**Substrat Buffer**
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 800 ml Akuades
0.1 g MgCl$_2$
0.2 g NaN₃
97.0 ml Diethanolamine
Atur derajat keasamannya sampai dengan pH 7.4 menggunakan larutan HCl, kemudian tambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml, simpan pada suhu 4°C.
Komposisi dan cara pembuatan buffer Indirect ELISA (protokol Adgen)

Coating Buffer (Carbonate Buffer)
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades
- 1.59 g Na$_2$CO$_3$
- 2.93 g NaHCO$_3$
Atur derajat keasamannya hingga pH 9.6, simpan pada suhu 4ºC

PBS
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 1000 ml akuades.
- 8.0 g NaCl
- 1.15 g Na$_2$HPO$_4$.2H$_2$O
- 0.2 g KH$_2$PO$_4$
- 0.2 g KCl
Atur derajat keasamannya hingga pH 7.2

PBST-Tween (PBST)
- 1.0 l PBS
- 0.5 g Tween-20
Atur derajat keasamannya hingga pH 7.4

Blocking Buffer
- 5 g non fat dried milk powder
- 100 ml PBST

Ab Dilution Buffer/ Conjugate Buffer
- 0.2 g Bovine Serum Albumin (BSA)
- 100 ml PBST

Substrat Buffer
Larutkan garam-garam berikut ini dalam 800 ml Akuades
- 0.1 g MgCl$_2$
- 97.0 ml Diethanolamine
Atur derajat keasamannya sampai dengan pH 9.8 menggunakan larutan HCl, kemudian tambahkan akuades sampai volumenya 1000 ml, simpan pada suhu 4ºC.
Komposisi dan cara pembuatan buffer DIBA

**TBS (5X)**
Untuk 1000 ml:
12,1 g Tris base
43,8 g NaCl
Tambahkan 800 ml dH2O, ukur pH 7,5, kemudian tambahkan dH2O hingga 1000 ml.

**Blocking solution**
Untuk 100 ml
2 g non fat milk
2 g Triton X-100
100 ml TBS 1X

**Substrat solution**
75 mg NBT (Nitro blue tetrazolium) dialrutkan adalam N, N-dimethylformamide (DMF), sehingga konsentrasinya 75 mg/ ml.
50 mg BCIP (Bromo chloro indolyl phosphate) dialrutkan dalam N, N-dymethylformamide (DMF), sehingga konsentrasinya 50 mg/ml.

**AP Buffer**
0,1 m Tris-HCl
0,1 M NaCl
5 mM MgCl2
Ukur pH hingga 9,5

**Stop Solution**
10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
Ukur pH hingga 7,5
Bahan- bahan yang dibutuhkan PCR

1. Metode Dellaporta

Buffer ekstrak Dellaporta

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 100 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris base</td>
<td>100 mM pH.8</td>
<td>1,21 g</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>50 mM</td>
<td>1,861 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>500 mM</td>
<td>2,92 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

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

Buffer TE

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 100 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris base</td>
<td>10 mM pH.8</td>
<td>0,1211 g</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>1 mM</td>
<td>0,0372 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

2. Metode CTAB

Buffer ekstrak CTAB

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 100 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>CTAB</td>
<td>2%</td>
<td>2 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>1,4 M</td>
<td>8,1816 g</td>
</tr>
<tr>
<td>Tris</td>
<td>100 mM</td>
<td>1,211 g</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>20 mM</td>
<td>0,7444 g</td>
</tr>
<tr>
<td>Polyvinylpyrrolidone (PVP-40)</td>
<td>1%</td>
<td>1.0 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Larutkan dalam 80 ml akuades steril. Atur pH larutan hingga 8.0 lalu tambahkan akuades steril hingga mencapai volume 100 ml.
3. Metode Willey
Akuades dengan perlakuan DEPC

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

Larutan stok EDTA 0,5 M pH 8,0
Larutkan 18,61 g EDTA ke dalam 80 ml akuades (atau aquabidestilata) steril atur pH menggunakan NaOH hingga mencapai angka 8,0. Lalu sesuaikan volume hingga 100 ml, aduk hingga rata. Setelah itu tambahkan DEPC sebanyak 100 µl (0,1%) dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam, untuk kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Larutan stok EDTA ini selanjutnya digunakan untuk membuat bufer-bufer berikutnya.

Buffer ekstraksi Willey

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 100 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris HCl</td>
<td>50 mM pH 8,5</td>
<td>0,787 g</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA 0,5M</td>
<td>10 mM</td>
<td>10 ml</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>200 mM</td>
<td>1,168 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Coating buffer

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 200 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Na$_2$CO$_3$</td>
<td>15 mM</td>
<td>0,318 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaHCO$_3$</td>
<td>35 mM</td>
<td>0,588 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaN$_3$</td>
<td>3 mM</td>
<td>0,039 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

Setelah dilarutkan dalam akuades steril atur pHnya menjadi 9.6.

Extract buffer

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Konsentrasi</th>
<th>Jumlah untuk 200 ml</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Tris HCl</td>
<td>20 mM</td>
<td>0,6302 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaCl</td>
<td>138 mM</td>
<td>1,613 g</td>
</tr>
<tr>
<td>PVP-40</td>
<td>1 mM</td>
<td>0,008 g</td>
</tr>
<tr>
<td>Tween-20</td>
<td>0,05%</td>
<td>100 µl</td>
</tr>
<tr>
<td>KCl</td>
<td>3 mM</td>
<td>0,044 g</td>
</tr>
<tr>
<td>NaN$_3$</td>
<td>3 mM</td>
<td>0,039 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Washing buffer (PBS-Tween)

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

5. Buffer untuk elektroforesis

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Akuades steril</td>
<td>500 ml</td>
</tr>
<tr>
<td>Tris base</td>
<td>242.0 g</td>
</tr>
<tr>
<td>Glacial acetic acid</td>
<td>57.1 ml</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>18.61 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>
Sesuaikan akuades steril hingga volume larutan mencapai 1 liter lalu sterilisasi larutan dengan autoclave, dan disimpan pada suhu ruang.

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

<table>
<thead>
<tr>
<th>Bahan</th>
<th>Volume</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Akuades steril</td>
<td>500 ml</td>
</tr>
<tr>
<td>Tris base</td>
<td>54 g</td>
</tr>
<tr>
<td>Boric acid</td>
<td>27,5 g</td>
</tr>
<tr>
<td>EDTA</td>
<td>3,72 g</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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

Setelah didapatkan larutan stock encerkan hingga konsentrasi 1x sebagai larutan yang akan digunakan untuk bekerja.
Lampiran 4
Alat-alat Pengujian untuk Metode ELISA dan PCR
Gambar Alat-alat untuk pengujian Virus Tanaman:

1. Vortex                                      2. PH Meter                        3. Vortex
7. ELISA Washer                8. Mikroplate                      9.ELISA Reader
14. Elektroforesis tank
15. Microwave
16. Mesin Fast PCR
17. Refrigerator -20C
18. Biosafety Cabinet
19. Gel Documentation
20. Refrigerator -80C
21. Timbangan analitik
22. Autoclave
23. Laminar Air Flow
24. Bath Tub