

Karakterisasi Molekuler *Papaya ringspot virus* tipe P pada Tanaman Mentimun di Jawa

Molecular Characterization of *Papaya ringspot virus* type P on Cucumber in Java

Listihani, Tri Asmira Damayanti*, Sri Hendrastuti Hidayat, Suryo Wiyono
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

ABSTRAK

Infeksi *Papaya ringspot virus* (PRSV) pada tanaman mentimun yang menunjukkan gejala mosaik berhasil dideteksi menggunakan antibodi spesifik. Penelitian lebih lanjut dilakukan untuk mengetahui karakter molekuler dan status PRSV pada tanaman mentimun di Jawa. Infeksi PRSV dideteksi dari sampel daun yang dikumpulkan dari lapangan menggunakan metode *dot immunobinding assay* (DIBA). Frekuensi infeksi PRSV di Jawa Timur, Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Barat berturut-turut sebesar 81.11%, 95.86%, 91.66%, dan 92.3%. Karakterisasi isolat-isolat PRSV dilakukan menggunakan metode *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) dengan primer spesifik untuk PRSV-P dan PRSV-W, dilanjutkan kloning dan sekuensing DNA. Pita DNA berukuran 470 pb berhasil diamplifikasi dengan primer spesifik PRSV-P dari beberapa sampel mentimun, yaitu asal Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, dan Subang; tetapi tidak diperoleh pita DNA menggunakan primer spesifik PRSV-W dari semua sampel. Analisis homologi sikuen nukleotida dan asam amino PRSV-P antarisolat Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, dan Subang berturut-turut sebesar 98.6–99.7% dan 99.3–100%. Hal tersebut menunjukkan keragaman genetika antarisolat PRSV-P di Jawa tergolong rendah. Analisis filogenetika lebih lanjut menunjukkan bahwa PRSV-P isolat mentimun berada dalam satu kelompok dengan isolat PRSV asal tanaman pepaya dari Bali, Indonesia. Hasil penelitian ini merupakan laporan pertama infeksi PRSV-P pada tanaman mentimun di Indonesia.

Kata kunci: analisis filogenetika, antibodi spesifik, *dot immunobinding assay*, keragaman genetika, sikuen nukleotida

ABSTRACT

Infection of *Papaya ringspot virus* (PRSV) on cucumber plants showing mosaic symptom was detected using specific antibody. Further investigation was conducted to determine molecular characters and status of PRSV infecting cucumber in Java. Infection of PRSV was detected from leaf samples collected from the field using dot immunobinding assay (DIBA). Disease frequency caused by PRSV infection up to 81.11%, 95.86%, 91.66%, and 92.3% in East Java, Central Java, Yogyakarta, and West Java, respectively. Characterization of PRSV isolates was conducted by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) using specific primers for PRSV-P and PRSV-W, followed by cloning, and DNA sequencing. DNA fragment of 470 bp was successfully amplified using specific primers for PRSV-P from several samples from Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, and Subang; but no amplification was achieved using specific primers for PRSV-W. Nucleotide and amino acid analysis showed high homology among PRSV-P isolates from Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, and Subang, i.e. 98.6%-99.7% and 99.3%-100%, respectively. This is an indication of a low genetic variation among

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus IPB Darmaga. Bogor 16680.
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: triadys@apps.ipb.ac.id

PRSV-P from Java. Further phylogenetic analysis indicated that PRSV-P isolate cucumber is in the same cluster with PRSV-P isolate papaya from Bali, Indonesia. This is the first report of PRSV-P infecting cucumber in Indonesia.

Key words: *dot immunobinding assay*, genetic variation, nucleotide sequences, phylogenetic analysis, specific antibody

PENDAHULUAN

Papaya ringspot virus (PRSV) merupakan anggota dari genus *Potyvirus*, famili Potyviridae yang mempunyai sebaran geografi yang luas. PRSV dapat ditularkan melalui vektor kutu daun, seperti *Aphis gossypii*, *A. craccivora*, dan *Myzus persicae* secara nonpersisten, secara mekanis, dan tidak bersifat tular benih (Kalleshwaraswamy dan Kumar 2008). PRSV menyebabkan gejala mosaik pada daun, batang, dan tangkai, serta bercak hijau tua pada buah pepaya (Hidayat *et al.* 2012).

Pada awal tahun 2012 PRSV tipe P (PRSV-P) pertama kali dilaporkan menginfeksi tanaman pepaya di Aceh, Indonesia. Setelah itu dilaporkan juga di Medan, Bogor, dan Bali dengan insidensi penyakit mencapai 100% (Hidayat *et al.* 2012; Harmiyati *et al.* 2015; Nurhantoro 2017).

Berdasarkan kisaran tanaman inangnya, PRSV dibedakan atas PRSV-P dan PRSV tipe W (PRSV-W) (Gonsalves *et al.* 2010). PRSV-P menginfeksi Caricaceae dan Cucurbitaceae, sedangkan PRSV-W hanya menginfeksi Cucurbitaceae. Infeksi PRSV-P dilaporkan pertama kali di Hawaii pada tahun 1949. Galur PRSV yang sama juga dilaporkan menginfeksi tanaman pepaya di Polinesia dan Afrika Utara pada tahun 2005 (Tennant *et al.* 2007). Adanya infeksi PRSV-W dilaporkan pertama kali di Australia pada tahun 1991 kemudian di Sudan dan Kuba pada tahun 2015 (Gonsalves *et al.* 2010; Mohammed *et al.* 2012; Mansilla *et al.* 2013; Martinez *et al.* 2015). Infeksi PRSV-P juga dilaporkan di Cina pada tanaman peria (*Momordica charantia*) (Zhu *et al.* 2016).

Di Indonesia, pengujian kisaran inang PRSV-P dilakukan oleh Harmiyati *et al.* (2015). Mereka melaporkan bahwa PRSV-P isolat Medan dan Aceh menyebabkan gejala mosaik ringan pada Cucurbitaceae dengan

tingkat keparahan penyakit 40% dibandingkan pada Caricaceae yang mencapai 100%.

Hasil survei penyakit tanaman Cucurbitaceae di Jawa yang dilakukan pada awal tahun 2016 menemukan adanya gejala mosaik seperti yang dilaporkan oleh Harmiyati *et al.* (2015) dan berdasarkan hasil deteksi serologi bereaksi positif dengan antibodi PRSV-P. Oleh karena itu dilakukan survei lanjutan untuk menentukan frekuensi penyakitnya dan identifikasi virus lebih lanjut secara molekuler.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Tanaman dan Deteksi Virus

Sampel tanaman mentimun diambil dari Jawa Barat (Bogor, Subang, Indramayu), Jawa Tengah (Brebes, Klaten), Yogyakarta (Kulon Progo), dan Jawa Timur (Nganjuk, Kediri, Tulungagung). Metode pengambilan sampel yang digunakan ialah *purposive sampling*. Masing-masing kabupaten ditentukan tiga kecamatan yang berbeda dan setiap kecamatan dipilih 50 tanaman yang bergejala. Jumlah total sampel yang diambil sebanyak 1350 sampel, selanjutnya digunakan untuk bahan deteksi virus.

Penentuan Frekuensi Penyakit

Deteksi virus dilakukan menggunakan metode *dot immunobinding assay* (DIBA) dengan antiserum spesifik PRSV (DSMZ) (Asniwita *et al.* 2014). Sebanyak 0.1 g jaringan daun digerus dalam 1 mL *tris buffer saline* (TBS) sehingga dihasilkan ekstrak tanaman atau sap. Sebanyak 2 µL setiap sampel sap ditetaskan pada membran nitroselulosa. Setelah sap mengering membran direndam dalam larutan *blocking non fat milk* dalam TBS yang mengandung Triton X-100

pada konsentrasi final 2% selama 30 jam. Selanjutnya membran dicuci dengan dH₂O, lalu direndam dalam TBS yang mengandung 1 µL (1:5000 v/v) antibodi PRSV selama 3 jam. Membran dicuci dengan TBST (TBS + tween 0.5%). Membran nitroselulosa selanjutnya direndam dalam TBS yang mengandung *goat anti rabbit* (GAR) sebanyak 1 µL (1:5000 v/v) selama 2 jam, kemudian dicuci kembali dengan TBST. Membran direndam dalam bufer alkalin fosfatase (pH 9.5) selama 30 menit sampai berubah warna menjadi ungu. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna putih menjadi ungu pada bagian membran nitroselulosa yang ditetesi sap dan reaksi dapat dihentikan dengan merendam membran dalam dH₂O. Kontrol positif berupa sampel positif PRSV pada penelitian sebelumnya dan kontrol negatif berupa daun jambu (*Syzygium malaccense*) disertakan dalam deteksi DIBA.

Hasil deteksi digunakan untuk menentukan frekuensi penyakit (FP) mengikuti rumus sebagai berikut:

$$FP = \frac{\text{Jumlah sampel yang positif terinfeksi}}{\text{Jumlah sampel yang dideteksi}} \times 100\%$$

Identifikasi PRSV secara Molekuler

Sampel yang diekstrak adalah sampel yang menunjukkan hasil DIBA dengan titer tinggi dari masing-masing lokasi. Ekstraksi RNA total dilakukan mengikuti metode CTAB (Doyle dan Doyle 1987) dengan sedikit modifikasi pada suhu. Produk ekstrak RNA total digunakan sebagai templat untuk sintesis cDNA. Komposisi bahan reaksi transkripsi balik (RT) terdiri atas 2.75 µL dH₂O, 0.50 µL dNTP 10 mM, 1.0 µL 10 pmol oligo d(T), dan 2 µL RNA total. Semua bahan pereaksi dicampur dan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit, kemudian segera didinginkan dalam es. Selanjutnya 2 µL bufer RT, 0.50 µL dNTP 10 mM, 0.5 µL DTT 50 mM, 0.25 µL RNase inhibitor (Thermo scientific), 0.5 µL *MmuLV reverse transcriptase* (Thermo Scientific) ditambahkan ke dalam reaktan sampai volume total menjadi 10 µL. Reaksi transkripsi balik dilakukan pada suhu 42 °C selama 60 menit dilanjutkan 70 °C selama 10 menit untuk menonaktifkan enzim.

Kemudian, produk cDNA digunakan sebagai templat pada tahap amplifikasi.

Pasangan primer yang digunakan untuk mengamplifikasi PRSV-P dan PRSV-W berturut-turut ialah PRSV326 (5'-TCGTGCCACTCAATCACAAT-3')/PRSV800 (5'-GTTACTGACACTGCCGTCCA-3') dengan target ampikon berukuran 475 pb dan PRSV-W 9016F (5'-CTTGARCARGCTCCATTC-3')/PRSV-W 10253R (5'-CTAAAAGCACGGAGG-3') dengan target ampikon berukuran 1238 pb (Mohammed *et al.* 2012; Martinez *et al.* 2014). Komposisi reaksi amplifikasi untuk volume total 25 µL, yaitu 12.5 µL *Go Taq green 2x* (Thermo scientific), 1 µL primer *reverse* 10 µM, 1 µL primer *forward* 10 µM, 9.5 µL air bebas nuklease, dan 1 µL cDNA.

Visualisasi DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%, pada tegangan 50 volt selama 50 menit. Pewarna gel agarosa menggunakan *dye FluoroVue TM* (Smobio, Taiwan). Hasil elektroforesis divisualisasi dengan *translumiluminator ultraviolet* dan didokumentasi.

Kloning DNA dilakukan dengan teknik TA-Kloning menggunakan plasmid vektor pTZ57R/T (Thermo Scientific). Tahapan kloning ialah ligasi, transformasi, dan konfirmasi transforman.

Ligasi dilakukan mengikuti protokol *InsTAclone PCR Cloning Kit* (Thermo Scientific). Plasmid DNA hasil ligasi pada pTZ57R/T ditransformasi ke bakteri *Escherichia coli* DH5α. Penyiapan sel kompeten DH5α dilakukan mengikuti metode Sambrook dan Russel (2001).

Transformasi dilakukan dengan metode kimia (Thermo InsTAclone kit). Pelet bakteri *E. coli* DH5α diresuspensikan dalam 300 µL larutan T (larutan A-sol dicampur dengan larutan B-sol, perbandingan 150/150 µL v/v) dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Biakan bakteri disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit dan pelet yang terbentuk diresuspensikan dalam 120 µL larutan T, serta diinkubasi dalam es selama 5 menit. Plasmid hasil ligasi diambil 2.5 µL dan ditambahkan 50 µL sel kompeten yang telah

diresuspensikan dalam larutan T, dicampur hingga homogen dan diinkubasi dalam es selama 5 menit. Hasil transformasi dibiakkan pada medium *luria bertani* yang mengandung ampisillin 100 mgL⁻¹, 10 µL IPTG 100 mM dan 50 µL X-gal 2%. Biakan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 16 jam.

Konfirmasi transformasi dilakukan untuk menentukan koloni bakteri pembawa plasmid rekombinan menggunakan seleksi putih biru, PCR koloni menggunakan primer M13F (-20)/M13R (-26) pUC, purifikasi plasmid, dan perunutan DNA. Isolasi DNA plasmid rekombinan dilakukan mengikuti prosedur *Fermentas GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit*.

Plasmid DNA rekombinan hasil kloning dikirim ke FirstBase (Malaysia) untuk dirunutkan basa nukleotidanya. Homologi nukleotida dan asam amino dianalisis dengan perangkat lunak BioEdit. Hubungan kekerabatan dianalisis dengan perangkat lunak MEGA V6.0 menggunakan 1000 kali bootstrap sebagai ulangan. Hasil analisis dibandingkan dengan data pada GenBank.

HASIL

Gejala dan Frekuensi Penyakit di Lapangan

Gejala penyakit pada tanaman mentimun yang ditemukan di lapangan berupa mosaik, daun melepuh, dan bentuk daun menyempit (Gambar 1). Gejala tersebut umum ditemukan pada infeksi virus sehingga cukup untuk diagnosis awal adanya infeksi virus. Hasil deteksi dengan metode DIBA menggunakan antiserum PRSV menunjukkan tanaman mentimun terinfeksi PRSV sebanyak 81.11%, 95.86%, 91.66%, dan 92.30% berturut-turut pada sampel daun asal Jawa Timur, Jawa Tengah, Yogyakarta, dan Jawa Barat. Hasil deteksi tersebut mengindikasikan frekuensi PRSV yang tinggi pada tanaman mentimun di Jawa.

Deteksi PRSV dengan RT-PCR

Pita DNA spesifik PRSV berukuran ±470 pb berhasil diamplifikasi menggunakan primer PRSV-P dari beberapa sampel lapangan yang bereaksi positif dengan antiserum PRSV

pada deteksi DIBA (Gambar 2). Sebaliknya, tidak diperoleh pita DNA pada seluruh sampel dengan amplifikasi menggunakan primer spesifik PRSV-W (data tidak ditampilkan).

Identifikasi dan Karakterisasi Molekuler PRSV

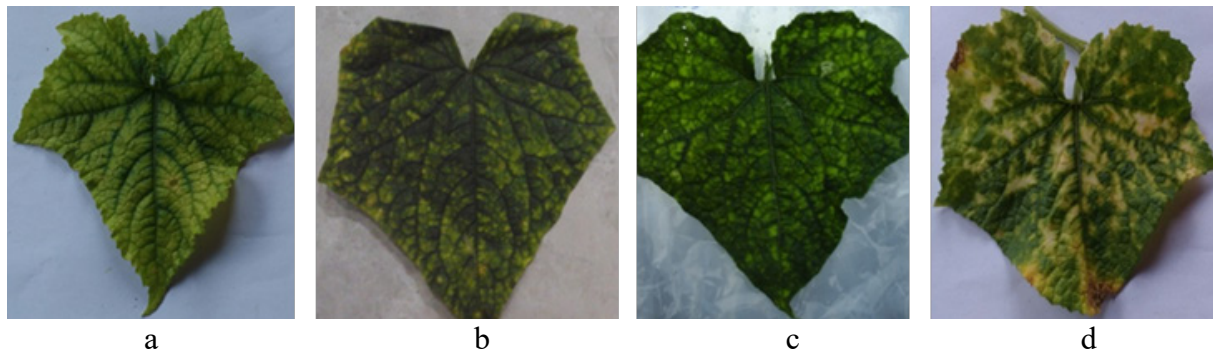
Fragmen DNA PRSV-P hasil amplifikasi dari sampel asal Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, dan Subang berhasil dikloning ke dalam TA vektor pTZ57R/T dan ditransformasi ke dalam sel bakteri kompeten *E. coli* DH5α. Plasmid DNA rekombinan berukuran ±3370 pb berhasil diamplifikasi menggunakan primer M13F (-20)/M13R (-26) pUC dan mendapatkan pita DNA berukuran ± 630 pb (Gambar 3). Hasil PCR tersebut membuktikan plasmid DNA rekombinan mengandung insersi DNA target.

Analisis sikuen nukleotida dan asam amino menunjukkan homologi yang tinggi, berturut-turut 92.3–99.7% dan 96.0–100% dengan sikuen-sikuen PRSV pada basis data di GenBank (Tabel 1). Homologi nukleotida dan asam amino PRSV-P antarisolat Jawa berturut-turut berkisar antara 98.6–99.7% dan 99.3–100%. Sikuen PRSV-P asal Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, dan Subang menunjukkan homologi tertinggi dengan isolat-isolat Bali-Indonesia (LC223115) berturut-turut 95.8–98.0% dan 97.3–99.3%; sedangkan homologinya dengan PRSV-W dari Brazil (DQ374152) sebesar 89.7–90.8% (Tabel 1).

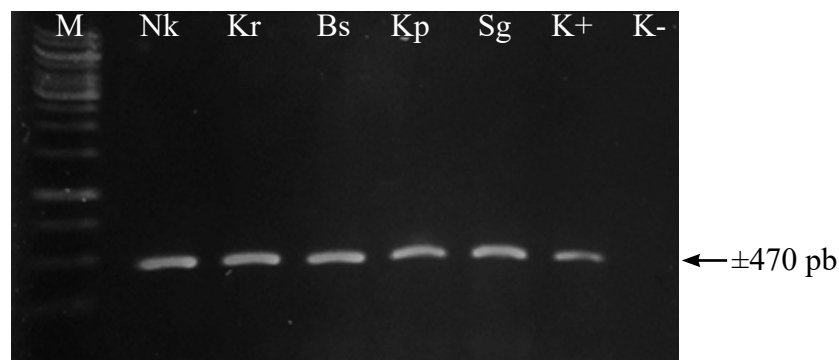
Analisis filogenetika memperlihatkan pengelompokan PRSV-P menjadi 5 grup, yaitu grup I, II, III, IV, dan V yang terpisah dari grup PRSV-W dari Brazil dan *Watermelon mosaic virus* dari Cina sebagai *outgrup*. Isolat PRSV-P yang dipelajari, yaitu dari Nganjuk, Brebes, Kulon Progo, Subang, berada dalam 1 kelompok dengan isolat asal Bali (Gambar 4).

PEMBAHASAN

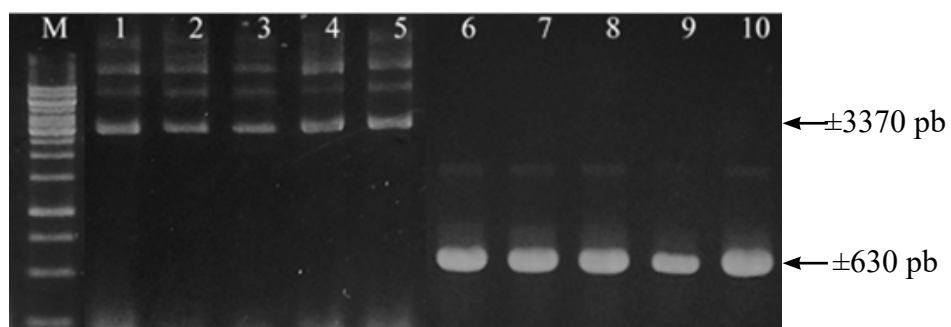
Gejala infeksi virus yang ditemukan pada tanaman mentimun di lapangan sangat bervariasi. Gejala mosaik dan klorosis



Gambar 1 Gejala infeksi virus pada tanaman mentimun di Jawa. a, Daun sehat; b, Mosaik kuning; c, Mosaik hijau muda; d, Klorosis.



Gambar 2 Amplifikasi DNA PRSV dari sampel mentimun asal Jawa menggunakan primer PRSV326/PRSV800. Nk, Nganjuk-Jawa Timur; Kr, Kediri-Jawa Timur; Tg, Tulungagung-Jawa Timur; Sg, Subang-Jawa Barat; Im, Indramayu-Jawa Barat; Bg, Bogor-Jawa Barat; Kp, Kulon Progo-Yogyakarta; Kn, Klaten-Jawa Tengah; Bs, Brebes-Jawa Tengah dan; M, Penanda DNA 1 kb (Thermo Scientific).



Gambar 3 Visualisasi hasil isolasi plasmid DNA rekombinan. Lajur 1-5 dari bakteri transforman DH5 α ; Lajur 6-10, pita DNA gen CP PRSV dan vektor PTZ57R/T yang terpisah setelah dilakukan amplifikasi menggunakan primer M13F (-20)/M13R (-26) pUC; dan M, Penanda DNA 1 kb (Thermo Scientific).

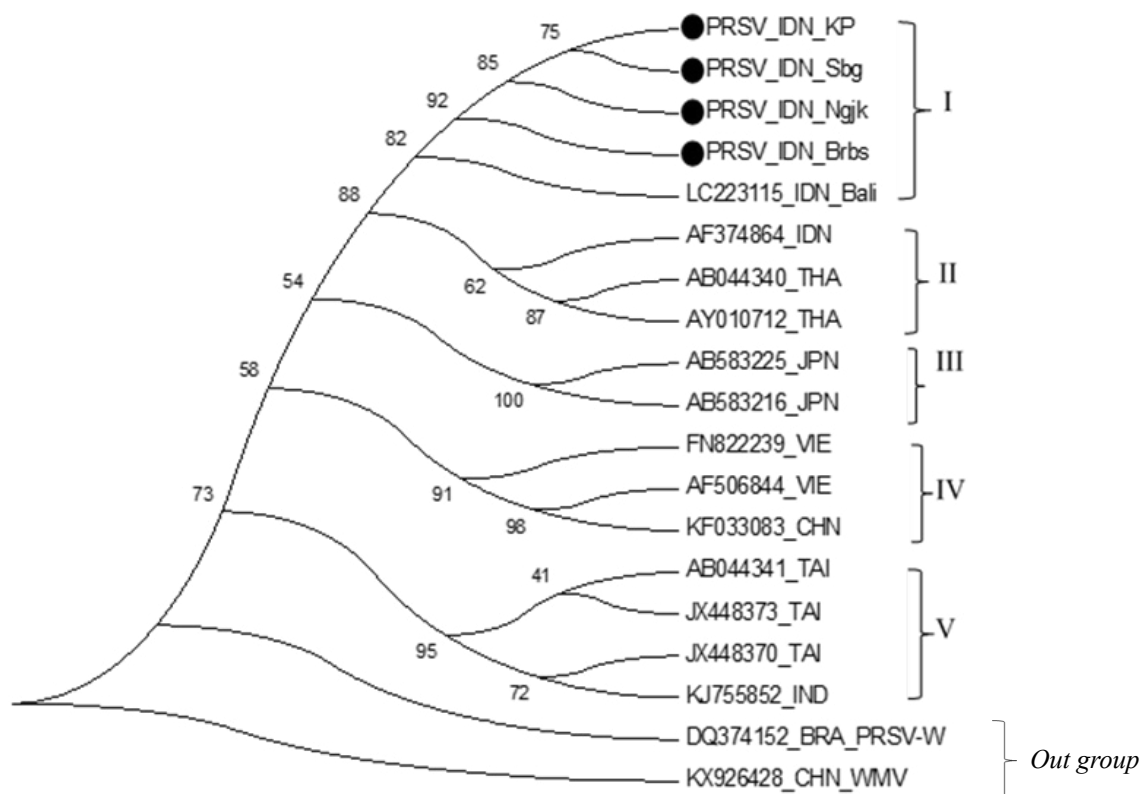
merupakan gejala yang paling banyak ditemukan. Variasi gejala penyakit dapat disebabkan oleh perbedaan kultivar, umur tanaman, dan kondisi lingkungan (Harmiyati *et al.* 2015). Variasi gejala akibat infeksi PRSV juga pernah dilaporkan pada tanaman pepaya oleh Hidayat *et al.* (2012).

Hasil survei dan deteksi secara DIBA menunjukkan bahwa infeksi PRSV-P pada tanaman mentimun sudah menyebar merata di Jawa. Sebelumnya, serangan PRSV dilaporkan di daerah Aceh, Medan, Bogor, dan Bali (Hidayat *et al.* 2012; Harmiyati *et al.* 2015; Nurhantoro 2017). Infeksi PRSV

Tabel 1 Homologi nukleotida dan asam amino PRSV-P isolat Jawa terhadap isolat dari negara lain yang tersedia pada GenBank

Asal isolat	Homologi (%)								Nomor aksesori
	Nganjuk		Brebes		Kulon Progo		Subang		
	nt	aa	nt	aa	nt	aa	nt	aa	
IDN_Nganjuk	100.0	100.0	98.6	99.3	99.7	100.0	99.3	99.8	LC311783
IDN_Brebes	98.6	99.3	100	100	99.3	99.8	98.8	99.3	LC311784
IDN_Kulon Progo	99.7	100	99.3	99.8	100.0	100.0	99.1	99.8	LC311781
IDN_Subang	99.3	99.8	98.8	99.3	99.1	99.8	100.0	100.0	LC311782
IDN_Bali	98.0	99.3	96.9	98.6	98.0	99.3	97.5	98.8	LC223115
IDN	97.5	99.3	96.4	98.6	97.5	98.8	97.1	98.6	AF374864
THA	97.1	98.0	96.0	97.3	97.1	98.6	96.6	97.6	AB044340
THA	96.9	98.0	95.8	97.3	96.9	98.6	96.4	97.6	AY010712
JPN	95.1	98.6	94.0	98.0	95.1	98.0	94.7	97.4	AB583225
JPN	94.9	98.6	94.0	98.0	94.9	98.3	94.4	98.0	AB583216
VIE	94.7	99.3	93.6	98.6	94.7	98.3	94.2	98.0	FN822239
VIE	94.7	99.3	93.6	98.6	94.7	98.3	94.2	98.0	AF506844
CHN	94.5	99.3	93.4	98.6	94.4	98.0	94.0	97.8	KF033083
TAI	93.4	98.6	92.3	98.0	93.3	98.0	92.9	97.3	AB044341
TAI	94.4	98.0	92.3	97.3	93.3	97.8	92.9	97.3	JX448373
TAI	93.8	97.3	92.7	96.6	93.8	98.3	93.3	98.0	JX448370
IND	93.4	98.0	92.3	96.0	93.3	98.0	92.9	97.6	KJ755852
PRSV-W_BRA	90.8	96.6	89.7	97.3	90.7	97.0	90.2	96.6	DQ374152
WMV-CHN*	64.9	65.3	65.2	65.3	64.9	65.3	64.6	65.3	KX926428

*WMV, *Watermelon mosaic virus* isolat Cina yang menginfeksi panax ginseng sebagai *out group*; nt, nukleotida; aa, asam amino; IDN, Indonesia; THA, Thailand; JPN, Jepang; VIE, Vietnam; CHN, Cina; TAI, Thailand; BRA, Brazil.



Gambar 4 Pohon filogenetika PRSV-P dari sampel mentimun asal Jawa (PRSV_DN_KP, PRSV_DN_Sbg, PRSV_Ngk, dan PRSV_DN_Brbs) menggunakan perangkat MEGA 6.0 dengan metode *neighbour joining* dengan bootstrap 1000×.

pada tanaman pepaya juga dilaporkan di Jawa Tengah (Kebumen, Boyolali dan Magelang) dan Yogyakarta (Sleman, Bantul, Gunung Kidul, dan Kulon Progo) (Saraswati dan Daryono 2014).

Sikuen gen CP PRSV-P isolat Jawa memiliki homologi yang tertinggi dengan PRSV-P isolat IDN Bali. Harmiyati *et al.* (2015) melaporkan bahwa PRSV-P antara isolat Indonesia memiliki homologi yang tinggi dibandingkan dengan isolat dari negara lain. Tingkat homologi gen protein selubung PRSV yang tinggi antar isolat menunjukkan rendahnya keragaman genetik PRSV antar daerah.

Analisis filogenetika menunjukkan bahwa 4 isolat PRSV-P yang dipelajari membentuk satu cabang dengan isolat PRSV-P asal Bali. Hasil ini menunjukkan PRSV-P yang dipelajari berasal dari Indonesia. PRSV-P yang menginfeksi tanaman mentimun diduga karena ditularkan oleh vektor kutudaun dari tanaman pepaya yang sakit disekitar tanaman mentimun. Selain itu, kemungkinan juga tanaman mentimun telah terinfeksi PRSV-P tetapi belum ada yang melaporkan.

Penelitian sebelumnya hanya melaporkan bahwa PRSV-P mampu menginfeksi tanaman mentimun ketika dilakukan inokulasi secara mekanis (Harmiyati *et al.* 2015). Dengan demikian, hasil penelitian ini merupakan laporan pertama infeksi dan karakterisasi molekuler PRSV-P pada tanaman mentimun di Indonesia.

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 51/Permentan/Kr.010/ 9/2015 tentang jenis organisme pengganggu tumbuhan karantina, PRSV termasuk dalam organisme pengganggu tumbuhan karantina (OPTK) kategori A2. Infeksi PRSV-P yang ditemukan pada tanaman mentimun di Jawa menunjukkan potensi PRSV-P untuk menyebar luas secara geografi dan tanaman inangnya. Pengendalian penyebaran infeksi PRSV-P yang dapat disarankan ialah pencegahan peredaran bibit tanaman yang terinfeksi ke wilayah yang masih bebas, eradikasi tanaman terinfeksi, pengendalian serangga vektor, dan penanaman varietas tahan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi Republik Indonesia yang telah mendanai penelitian ini melalui dana penelitian program Pendidikan Magister Menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU).

DAFTAR PUSTAKA

- Asniwita, Hidayat SH, Suastika G, Sujiprihati S. 2014. Penggunaan galur lemah *Chili veinal mottle virus* untuk proteksi silang. *J Fitopatol Indones.* 5(9):145–152. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.9.5.145>.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19:11–15.
- Gonsalves D, Tripathi S, Carr JB, Suzuki JY. 2010. *Papaya ringspot virus*. *Plant Health Instructor.* 149(12):2435–2442. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2010-1004-01>.
- Harmiyati T, Hidayat SH, Adnan AM. 2015. Deteksi dan respons lima varietas pepaya terhadap tiga isolat *Papaya ringspot virus* (PRSV). *J Agr Biogen.* 11(3):87–94.
- Hidayat SH, Nurulita S, Wiyono S. 2012. Temuan penyakit baru infeksi *Papaya ringspot virus* pada tanaman pepaya di Nangroe Aceh Darussalam. *J Fitopatol Indones.* 8(6):184–187. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.8.6.184>.
- Kalleshwaraswamy CM, Kumar NK. 2008. Transmission efficiency of *Papaya ringspot virus* by three aphid species. *Phytopathology.* 98(5):541–546. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0541>.
- Mansilla PJ, Moreira AG, Mello APOA, Rezende JAM, Ventura JA, Yuki VA, Levatti FJ. 2013. Importance of cucurbits in the epidemiology of *Papaya ringspot virus* type P. *Plant Pathol.* 62:571–577. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02677.x>.

- Martinez DR, Duarte PDSG, Olmedo JG, Figueira ADR. 2014. Molecular and biological studies of *Papaya ringspot virus* isolates from Brazil and Cuba. *AJAF*. 2:209–218. DOI: <https://doi.org/10.11648/j.ajaf.20140205.11>.
- Martinez DR, Figuera AR, Duarte PSG, Costa SBFG, Olmedo JG. 2015. First report and molecular characterization of an isolate of *Papaya ringspot virus* (PRSV-W) detected in pumpkin in Cuba. *Biosci J*. 31(4): 1133–1142. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v31n4a2015-26181>.
- Mohammed H, Mangli A, Zicca S, Mohammed M, Tomassoli L. 2012. First report of *Papaya ringspot virus* in pumpkin in Sudan. *New Dis Rep*. 26:26–33. DOI: <https://doi.org/10.5197/j.2044-0588.2012.026.026>.
- Nurhantoro I. 2017. Konstruksi pelacak DNA *Papaya ringspot virus* berdasarkan gen *helper component* untuk metode deteksi hibridisasi asam nukleat [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sambrook J, Russel DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saraswati U, Daryono BS. 2014. Karakterisasi molekuler *coat protein gene Papaya ringspot virus* pada tanaman papaya (*Carica papaya* L.) di Indonesia [disertasi]. Yogyakarta (ID): Universitas Gadjah Mada.
- Tennant PF, Fermin GA, Roye ME. 2007. Viruses infecting papaya (*Carica papaya*): Etiology, pathogenesis, and molecular biology. *Plant Viruses*. 1:178–188.
- Zhu L, Yang T, Chen LJ, Lin HH, Xi DH. 2016. First Report of *Papaya ringspot virus* infecting bitter melon in China. *Plant Dis*. 100(11):2338. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0086-PDN>.