

DETEKSI SIMULTAN CMV DAN CHIVMV PENYEBAB PENYAKIT MOSAIK PADA TANAMAN CABAI DENGAN DUPLEX RT-PCR

I Gede Agus Adi Chandra¹, I Dewa Nyoman Nyana^{2*}, I G N Alit Susanta Wirya², Gede Suastika³

¹Program Magister Bioteknologi Pertanian, Program Pascasarjana Universitas Udayana

²Laboratorium Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali Indonesia

³Laboratorium Virologi Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor Bogor

*)E-mail: dewanyana@yahoo.com

Abstract

Detect the presence virus causes mosaic symptoms by CMV and ChiVMV infecting chili pepper plants at the same time was conducted. There needs a study that aims to detect the associations of both viruses causes mosaic symptoms by single or double infection and simplify the detection process which is necessary for a long and expensive process. The used method is a duplex RT-PCR in hopes of simultaneously detecting two viruses causes mosaic disease. Based on the results of the study showed that the duplex RT-PCR method can detect double infection of CMV and ChiVMV on chili plants and this method more effective to detect two viruses simultaneously in a single PCR reaction.

Keywords: chili pepper, CMV, ChiVMV, Duplex RT-PCR

1. Pendahuluan

Tingkat produktivitas tanaman cabai dipengaruhi oleh banyak faktor. Menurut Semangun (2000) salah satu faktor yang mempengaruhi rendahnya produktivitas tanaman cabai adalah infeksi oleh virus. Umumnya tanaman cabai yang terinfeksi virus menunjukkan gejala yang biasanya dapat dibedakan menjadi dua gejala khas seperti gejala kuning dan mosaik. Selain masalah tersebut terdapat juga infeksi ganda yang disebabkan oleh *Cucumber mosaic virus* (CMV) dan *Chilli Veinal Mottle Virus* (ChiVMV) yang ditemukan dalam pengamatan. Dilaporkan bahwa infeksi virus secara tunggal maupun secara bersama-sama pada tanaman cabai menyebabkan penghambatan terhadap pertumbuhan tinggi tanaman, dan perkembangan cabang tanaman (Taufik *et al.*, 2005).

Mendeteksi keberadaan virus penyebab gejala mosaik oleh CMV dan ChiVMV yang menginfeksi secara bersamaan sangat susah dibedakan dan belum banyak penelitian yang mengungkap keberadaan asosiasi dari kedua virus ini. Dari masalah tersebut perlu dilakukan suatu penelitian untuk dapat mendeteksi virus penyebab gejala mosaik *single* atau *double* infeksi dengan metode Duplex RT-PCR sehingga nantinya metode dapat menjadi metode yang lebih efektif mengingat mahalnya biaya yang digunakan dalam proses deteksi virus.

2. Bahan dan Metode

2.1 Deteksi Duplex CMV dan ChiVMV dengan RT-PCR

RNA total diekstraksi dari jaringan daun tanaman cabai bergejala klorosis dengan menggunakan *Rneasy Plant Mini Kits* (Qiagen Inc., Chatsworth, CA., USA). Tahapannya adalah sampel daun sebanyak 0,1 g digerus menggunakan mortar dan pistil steril dengan bantuan nitrogen cair. Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 ml dan ditambahkan 450 μ l buffer RLT yang mengandung 1% merkaptoethanol, kemudian divortex. Sampel diinkubasi pada suhu 56° C selama 10 menit. Sampel dipipet, lalu dimasukkan ke dalam *QIAshredder spin column* ungu dan ditempatkan pada tabung koleksi 2 ml, lalu disentrifuse dengan kecepatan 13000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipipet tanpa menyentuh pelet dalam tabung koleksi, lalu dipindahkan ke dalam tabung mikro 2 ml baru. Kemudian ditambahkan 0,5 vol ethanol 96% (\pm 225 ml) dan dicampur dengan rata. Sampel (\pm 650 ml) termasuk endapan yang terbentuk ke dalam *RNeasy mini column* pink, kemudian ditempatkan pada tabung koleksi 2 ml dan disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Cairan yang terdapat pada tabung koleksi dibuang, kemudian ditambahkan 700 ml buffer RW1 ke dalam *RNeasy column*, ditutup dengan baik dan disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik untuk mencuci column. *RNeasy column* dipindahkan ke dalam tabung koleksi 2 ml baru, buffer RPE dipipet sebanyak 500 μ l kemudian dimasukkan ke dalam *RNeasy column* dan ditutup dengan rapat, disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 15 detik. Tabung koleksi digunakan kembali, ditambahkan sebanyak 500 μ l buffer RPE dan disentrifuse pada kecepatan 10000 rpm selama 2 menit. Untuk meyakinkan bahwa column telah kering, column dipindahkan pada tabung koleksi baru, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Selanjutnya, 40 μ l *RNAse free water* ditambahkan ke dalam *RNeasy column*, didiamkan 10 menit kemudian disentrifuse pada kecepatan 10000 rpm selama 1 menit. Siapan RNA total ini digunakan sebagai template dalam reaksi RT-PCR.

RNA hasil ekstraksi selanjutnya ditranskripsi balik menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan menggunakan teknik *Reverse Transcriptase* (RT). Reaksi RT dibuat dengan total volume 10 μ l yang mengandung 2 μ l RNA total, 1 μ l buffer RT 10X, 0,35 μ l 50 mM DTT (*dithiothreitol*), 2 μ l 10 mM dNTP (*deoksiribonukleotida triphosphat*), 0,35 μ l M-MuLV Rev, 0,35 μ l *RNAse inhibitor*, 0,75 μ l oligo (dT), dan 3,2 μ l H₂O. Komponen-komponen tersebut digunakan untuk satu kali reaksi RT. Reaksi RT dilakukan dalam sebuah *Aucabaied Thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700; PE Applied Biosystem, USA) yang diprogram untuk satu siklus pada suhu 25° C selama 5 menit, 42° C selama 60 menit, dan 70° C selama 15 menit. Siapan cDNA hasil RT ini, digunakan sebagai DNA template dalam reaksi PCR.

2.2 Amplifikasi DNA dengan PCR.

Amplifikasi DNA virus dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Dalam penelitian ini, dilakukan tiga cara untuk mengamplifikasi DNA CMV, ChiVMV, dan keduanya. Pertama, adalah menggunakan pasangan primer ChiVMV, kedua, digunakan pasangan primer CMV, dan ketiga, digunakan pasangan primer CMV dan ChiVMV yang dicampur untuk mengamplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan pasangan primer spesifik yang telah didesain khusus untuk mengamplifikasi masing-masing virus secara terpisah (Tabel 1).

Tabel 1. Nama primer yang mengamplifikasi gen *coat protein* masing-masing virus

Nama Virus	Primer (5'-3')	Produk PCR	Pustaka
ChiVMV	ChiVMV F Ind AACCTGAGCGTATAGTTTCA	900 bp	Jan <i>et al</i> (2000)
	ChiVMV R Ind TACGCTTCAGCAAGATTGCT		
CMV	CMV-CP-F ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTG	657 bp	GenBank dengan nomor asesi FR820451
	CMV-CP-R TCAAAGTGGGAGCACCCCAGATGTG		

Reaksi PCR dengan total volume 25 μ l, terdiri atas 1 μ l masing-masing primer, 2,5 μ l buffer PCR 10X + Mg^{2+} , 0,5 μ l 10 mM dNTP, 2,5 μ l sucrose cresol 10X, 0,3 μ l *Taq* DNA polymerase, 15,2 μ l H_2O , dan 1 μ l DNA template. Amplifikasi ini dilakukan pada *Aucabaied Thermal cyclers* (Gene Amp PCR System 9700; PE Applied Biosystem, USA). Amplifikasi ini didahului dengan denaturasi awal pada 93,5° C selama 3 menit. Kemudian dilanjutkan dengan 17 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 93,5° C selama 45 detik, penempelan primer (*annealing*) pada 55° C selama 45 detik, dan pemanjangan pada 72° C selama 1 menit, dan dilanjutkan kembali dengan 18 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94° C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada 47° C selama 2 menit, dan pemanjangan pada 72° C selama 2 menit. Khusus untuk siklus terakhir, ditambahkan 10 menit pada 72° C untuk tahapan sintesis, dan siklus berakhir pada suhu 4° C. Setelah dilakukan PCR, dilanjutkan dengan elektroforesis.

2.3 Elektroforesis.

Pembuatan gel agarose dilakukan dengan konsentrasi 1%. Agarose sebanyak 3 g dimasukkan ke dalam tabung Erlenmeyer 100 ml, lalu ditambahkan 30 ml buffer Tris-Acetate EDTA (TAE) 0,5x (0,045 M Tris-Acetate, 0,01 M EDTA). Kemudian campuran dipanaskan dalam *microwave* sampai agarose larut. Larutan agar didinginkan hingga suhu 60° C selama kurang lebih 15 menit, lalu ditambahkan 1,5 µl *ethidium bromida* kemudian diaduk. Selanjutnya, larutan gel agarose dituang ke dalam cetakan. Gel didiamkan sampai mengeras (30-45 menit). Setelah mengeras, gel diambil dan diletakkan ke dalam bak elektroforesis yang berisi buffer TAE 0,5 kali. Sebanyak 7 µl DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam sumur gel elektroforesis dan pada sumuran gel elektroforesis yang berada di posisi sebelah kiri dimasukkan 10 µl 100 bp DNA ladder. Elektroforesis dilakukan dengan tegangan 50 volt selama 60 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan *transluminator ultraviolet*. Pita DNA yang terbentuk pada hasil elektroforesis tersebut dipotret dengan menggunakan kamera digital.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Gejala Infeksi Ganda CMV dan Potyvirus pada Tanaman Cabai Rawit

Hasil pengamatan di Desa Kerta, Payangan, Gianyar, Bali, tanaman cabai yang terinfeksi ChiVMV pada daun memperlihatkan gejala mosaik dan bentuk daun membulat pada ujungnya serta melengkung ke atas. Gejala yang terinfeksi CMV terlihat belang hijau tua dan hijau muda pada daun-daunnya, gejala ini disertai dengan perubahan bentuk daun (cekung, keriting atau memanjang). Hal ini telah diverifikasi dalam hasil penelitian sebelumnya oleh Sukada (2014) pada uji serologi dengan teknik ELISA yang menunjukkan bahwa sampel yang dikoleksi berdasarkan atas gejala yang diamati terbukti bahwa untuk gejala mosaik pada tanaman cabai berasosiasi dengan CMV, dan ChiVMV. Adanya asosiasi CMV dan ChiVMV yang menginfeksi tanaman cabai dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman cabai yang terinfeksi CMV dan ChiVMV meliputi gejala: 1. Mosaik, 2. Klorosis dan 3. *Leaf cupping*.

Gejala infeksi virus CMV dan ChiVMV yang tampak pada Gambar 1, merupakan hasil interaksi antara patogen, inang dan lingkungan. Pengaruh timbulnya penyakit sangat tergantung pada jumlah populasi patogen, kemampuan patogen untuk menimbulkan penyakit yaitu berupa kemampuan menginfeksi dan kemampuan menyerang tanaman inang, kemampuan adaptasi patogen, penyebaran, ketahanan hidup dan kemampuan replikasi patogen. Pengaruh tanaman inang terhadap timbulnya suatu penyakit tergantung dari jenis tanaman inang, kerentanan tanaman, bentuk dan tingkat pertumbuhan, struktur dan kerapatan populasi, kesehatan tanaman dan ketahanan inang. Pengaruh keadaan lingkungan terhadap penyakit yang disebabkan oleh virus sangat tergantung pada kondisi inangnya, mengingat virus tidak dapat melakukan metabolisme sendiri. Sinar matahari dan suhu sering mempengaruhi perkembangan gejala yang tampak pada tanaman inang. Sinar matahari, suhu, ketersediaan air dan unsur hara yang kurang optimal dapat mengakibatkan meningkatnya penampakan gejala pada tanaman. Hal ini diakibatkan karena virus memerlukan hasil metabolisme dari tanaman inang yang aktif untuk keperluan perbanyakannya (Bos, 1994). Apabila hasil metabolisme inang tidak cukup untuk memenuhi kebutuhan pertumbuhan tanaman dan keperluan virus, maka akan timbul gejala khas virus seperti kerdil, daun keriput, dan klorosis. Munculnya gejala penyakit virus pada tanaman disebabkan oleh adanya pergerakan virus ke jaringan tanaman melalui pembuluh floem dan akan tersebar ke seluruh bagian tanaman bersamaan dengan peredaran hasil fotosintat (Hull 2002; Martin, 2004). Semakin cepat proses perkembangan dan penyebaran virus di dalam sel tanaman, maka gejala sistemik muncul semakin cepat dan tingkat keparahannya semakin tinggi. Keparahan gejala penyakit yang muncul juga terkait dengan interaksi antara CMV dan ChiVMV dengan kultivar tanaman cabai.

Walaupun demikian dalam jumlah asam nukleat virus yang cukup besar dalam tumbuhan belum tentu dapat memperlihatkan gejala. Pengaruh tersebut mungkin terjadi melalui sintesis protein baru (asing) oleh tumbuhan yang disebabkan oleh virus (enzim, hormon, dan lain-lain) yang menyebabkan metabolisme inang menjadi terganggu (Bos, 1994., Agrios, 2005).

Serangga vektor mempunyai peranan penting dalam penyebaran virus terutama dari kelompok kutu daun (Aphididae: Homoptera). Spesies kutu daun yang dilaporkan dapat menularkan ChiVMV adalah *A. craccivora*, *A. gossypii*, *A. spiraeicola*, *M. persicae*, *Toxoptera citricidus*, *Hystreroneura setariae* dan *Rhopaloshium maydis*. Penyebaran CMV dapat dilakukan oleh lebih dari 60 spesies aphid, khususnya oleh *Aphis gossypii* dan *Myzus persicae* secara *non-persistent*. Virus ini bisa ditularkan hanya dalam waktu 5 detik sampai 10 detik dan ditranslokasikan dalam waktu kurang dari satu menit. Kemampuan CMV untuk ditranslokasikan menurun kira-kira setelah 2 menit dan biasanya hilang

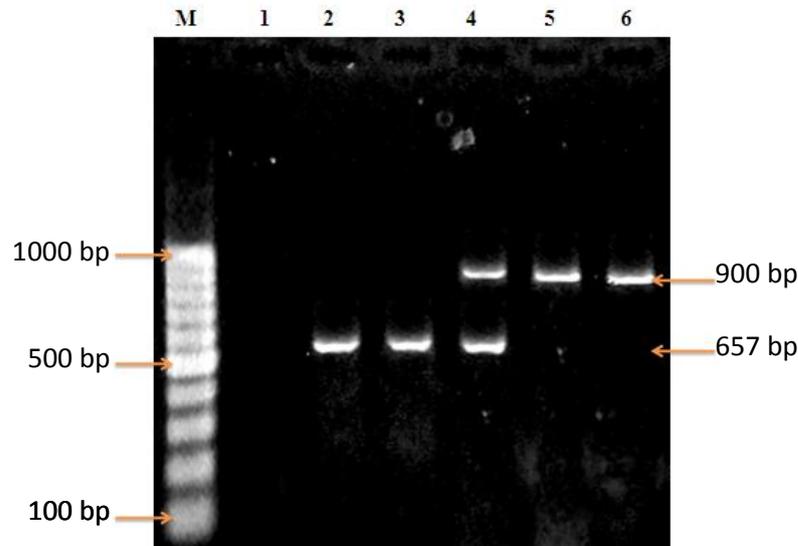
dalam 2 jam. Selain itu, beberapa isolat dapat kehilangan kemampuannya untuk ditularkan oleh spesies kutu daun tertentu tetapi dapat ditularkan oleh spesies kutu daun yang lain. Berbagai spesies gulma dapat menjadi inang CMV, oleh karenanya dapat menjadi sumber virus bagi tanaman budidaya lain (Khetarpal *et al.*, 1998). Pada daerah subtropis CMV dapat melewati musim dingin dan bertahan pada gulma-gulma tahunan (Agrios, 2005).

Partikel virus memperbanyak diri di dalam sel inang sehingga mengganggu proses fisiologi tanaman inang. Virus yang mampu melakukan replikasi dengan cepat di dalam sel tanaman memiliki daya virulensi yang tinggi (Goodman *et al.*, 1986). Respon tanaman terhadap infeksi virus juga menentukan bagaimana virus bereplikasi di dalam jaringan tanaman. Fraser (1998), menyatakan bahwa gejala tidak terjadi apabila tanaman imun terhadap infeksi virus. Apabila tanaman mampu untuk membatasi perkembangan virus dalam sel tertentu sehingga virus tidak menyebar ke sel-sel yang lain, maka tanaman tersebut tahan terhadap infeksi virus (Matthews, 1991).

3.2 Deteksi dengan RT-PCR

PCR merupakan suatu teknik amplifikasi fragmen DNA spesifik dimana terjadi penggandaan jumlah molekul DNA pada setiap siklusnya secara eksponensial dalam waktu yang relatif singkat. Teknik ini sangat ideal untuk mengidentifikasi patogen dengan cepat dan akurat. Secara umum proses ini dapat dikelompokkan dalam tiga tahap yang berurutan yaitu denaturasi, *annealing* dan *extension* (Watson *et al.*, 1992). Tujuan dari PCR ini adalah agar genom dari DNA sampel dapat teridentifikasi pada proses selanjutnya.

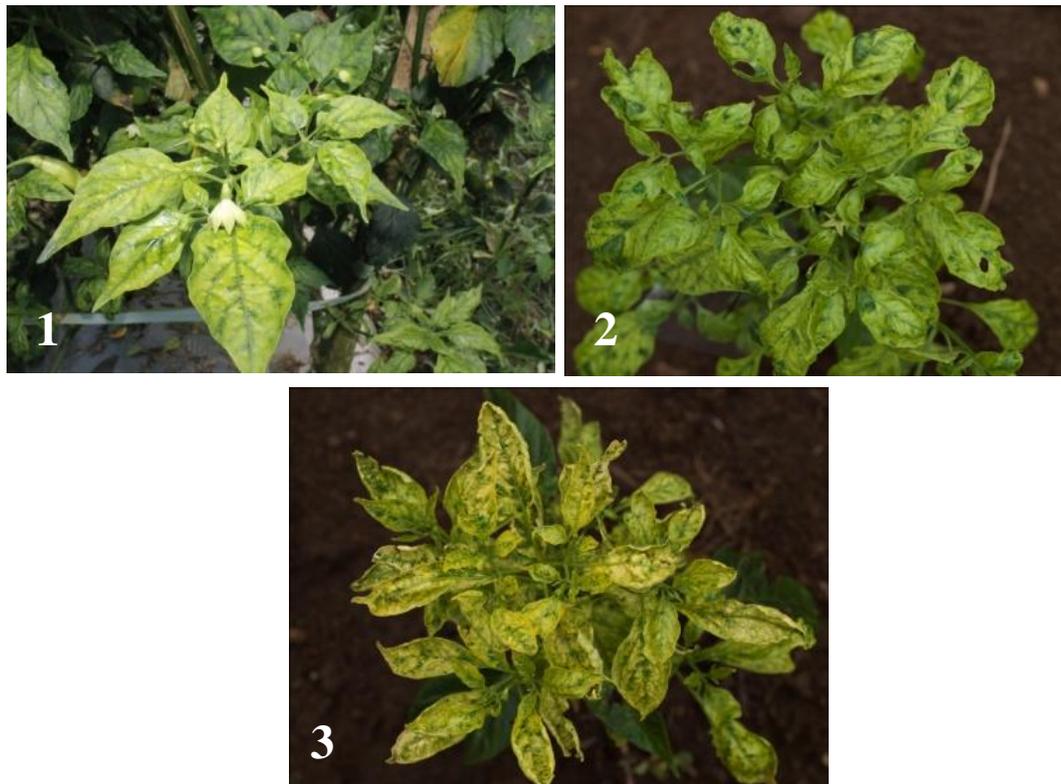
Sampel dengan gejala CMV dan ChiVMV diambil di kawasan Desa Kerta, Payangan, yang kemudian dideteksi dengan RT-PCR menggunakan 2 primer spesifik ChiVMV dan CMV. Pada penelitian ini dengan menggunakan metode Duplex RT-PCR kemudian dilanjutkan dengan PCR berhasil menghasilkan produk dengan pita DNA berukuran sekitar 900 bp dan 657 bp sesuai dengan primer yang digunakan (Gambar 5.2).



Gambar 2. Hasil elektroforesis sampel tanaman cabai yang terinfeksi ganda CMV dan ChiVMV dengan menggunakan metode RT-PCR dan Duplex RT-PCR. M: Marker DNA 100bp (Promega,USA). 1: Kontrol negatif (tanaman sehat). 2: Kontrol positif CMV (isolat koleksi IPB). 3: Uji sampel dengan satu primer CMV (isolat Kerta Payangan). 4: Uji sampel dengan primer Duplex CMV dan ChiVMV (isolat Kerta Payangan). 5: Kontrol positif ChiVMV (isolat koleksi IPB). 6: Uji sampel dengan primer ChiVMV (isolat Kerta Payangan).

Hasil dari elektroferesis menunjukkan bahwa sampel yang diuji positif ditemukan adanya infeksi ganda ChiVMV dan CMV. Marker DNA (Promega,USA) yang digunakan dalam tahap RT-PCR ini berukuran 100 bp. Hal ini berdasarkan hasil elektroforesis dari hasil RT-PCR yang terlihat pada Gambar 5.2 dimana pita DNA ChiVMV dengan ukuran sekitar 900 bp sesuai dengan primer yang digunakan (Jan *et al.*, 2000), dan CMV juga berhasil diamplifikasi dengan didapat pita DNA berukuran 657 bp sesuai dengan primer yang digunakan.

Keparahan gejala yang muncul berkaitan dengan sistem ketahanan yang dimiliki oleh tanaman dan tingkat kemampuan virus yang menginfeksi. Pada Gambar 5.3 dapat dilihat bahwa secara umum gejala yang timbul pada tanaman cabai yang terinfeksi ganda (CMV bersama ChiVMV) lebih berat bila dibandingkan tanaman yang terinfeksi oleh masing-masing virus secara tunggal.



Gambar 3. Gejala tanaman cabai yang terinfeksi virus. 1 Gejala infeksi tunggal CMV. 2 Gejala infeksi tunggal ChiVMV. 3 Gejala infeksi ganda CMV dan ChiVMV.

Hasil pengamatan gejala di lapangan menunjukkan bahwa tanaman cabai yang terinfeksi ganda menunjukkan gejala yang lebih parah dibandingkan dengan tanaman cabai yang terinfeksi tunggal. Perbandingan gejala tanaman cabai yang terinfeksi tunggal dan ganda dapat dilihat pada gambar 5.3. Pada daun tanaman cabai 1 menunjukkan perubahan warna belang hijau muda kekuningan diantara warna hijau normal atau hijau tua merupakan gejala yang sebabkan adanya infeksi CMV, sedangkan pada daun tanaman cabai 2 menunjukkan gejala belang-belang hijau gelap dan bercak-bercak hijau gelap merupakan gejala yang sebabkan adanya infeksi ChiVMV. Pada kedua gambar tersebut terlihat juga adanya perkembangan generatif yang tampak dengan adanya bunga yang dapat terbentuk meskipun telah terinfeksi oleh satu jenis virus. Namun pada daun tanaman cabai 3 gejala yang tampak adalah adanya perubahan warna belang hijau muda kekuningan diantara warna hijau normal, memperlihatkan gejala belang-belang hijau gelap yang polanya menyatu ke tulang daun di dekatnya dan tidak terlihatnya perkembangan generatif pada tanaman. Gejala yang tampak pada daun tanaman cabai 3 merupakan gejala yang gabungan dari infeksi ganda CMV dan ChiVMV. Hal ini disebabkan karena virus tanaman umumnya menyebabkan terganggunya perkembangan serta fungsi sel, dengan jalan menggunakan

substansi sel inang, mengganggu komponen dan proses sel, memenuhi ruangan dalam sel dan mengganggu proses metabolisme (Nurhayati, 2012). Virus tanaman merupakan parasit molekuler yang memperbanyak diri dengan memanfaatkan sel-sel inangnya untuk replikasi. Gangguan fisiologis pada tanaman pada umumnya dapat dilihat dengan munculnya gejala pada daun sebagai salah satu bagian tanaman. Terjadinya gejala mosaik, kuning dan klorosis pada tanaman akan dapat menyebabkan terganggunya proses fotosintesis yang pada akhirnya akan berakibat terhadap pertumbuhan dan penurunan hasil (Agrios, 2005).

Infeksi sinergis umumnya menyebabkan gejala yang lebih berat dibandingkan gejala akibat infeksi tunggal masing-masing virus (Walkey & Payne, 1990; Cho *et al.*, 2000; Hull, 2002). Pada tanaman yang terinfeksi ganda terjadi interaksi antara kedua virus yang bersifat meningkatkan kemampuan salah satu atau kedua virus dalam proses perkembangan dan penyebarannya di dalam sel tanaman terinfeksi. Virus bergerak ke jaringan tanaman melalui pembuluh floem dan akan tersebar ke seluruh bagian tanaman bersamaan dengan peredaran hasil fotosintat (Hull, 2002; Martin, 2004). Semakin cepat proses perkembangan dan penyebaran virus di dalam sel tanaman, maka gejala sistemik muncul semakin cepat dan tingkat keparahannya semakin tinggi. Keparahan gejala penyakit yang muncul juga terkait dengan interaksi antara CMV dan ChiVMV dengan kultivar tanaman cabai. Dalam hal ini kemampuan setiap tanaman (kultivar) berbeda tergantung pada kultivar dan umur tanaman serta kondisi lingkungan yang mendukung perkembangan penyakit (Hull, 2002).

Kosaka and Fukunishi (1997) menyatakan bahwa, tanaman mentimun yang terinfeksi *Cucumber mosaic virus*, *Zucchini yellow mosaic virus*, dan *Watermelon mosaic virus* secara bersama-sama menunjukkan gejala mosaik berat, nekrosis, dan distorsi daun dan buah, sehingga tanaman mengalami penurunan produksi yang nyata. Walaupun tidak selalu ditemukan korelasi antara konsentrasi virus pada tanaman terinfeksi dengan tingkat keparahan gejala tetapi gejala pada tanaman cabai yang terinfeksi CMV atau ChiVMV tampaknya berkaitan dengan konsentrasi virus di dalam jaringan tanaman. Gejala pada tanaman yang terinfeksi CMV atau ChiVMV secara tunggal relatif lebih ringan dibandingkan pada tanaman yang terinfeksi CMV dan ChiVMV secara bersama-sama. Infeksi CMV dan ChiVMV selain menimbulkan gejala pada tanaman cabai juga mempengaruhi produksinya (Widyastuti dan Hidayat, 2005).

4. Simpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa metode Duplex RT-PCR dapat mendeteksi infeksi ganda dari CMV dan ChiVMV pada tanaman cabai dan merupakan metode yang tepat dan efektif untuk mendeteksi dua virus sekaligus dalam sekali reaksi PCR.

5. Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Fitrianingrum Kurniawati, S.P., M.Si dan teman-teman virologi yang sudah membantu mengerjakan teknik PCR selama penelitian di Laboratorium Virologi, Institut Pertanian Bogor.

Daftar Pustaka

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th Ed. Academic Press, New York.
- Bos, L. 1994. *Pengantar Virologi Tumbuhan*. Penerjemah Triharso. Gajah Mada University Press.
- Cho, J. D., J. S. Kim, H. S. Choi, Y. J. La, K. S. Kim. 2000. Ultrastructural aspects of the mixed infections of watermelon mosaic potyvirus isolated from pumpkin and cucumber green mottle mosaic tobamovirus from watermelon. *Plant Pathol J* 16:216-221.
- Fraser, R. S. S. 1998. The Genetic of Plant Virus Interaction Implication for Plant Breeding. *Euphytica* 63:175-185
- Goodman, R. N., Z. Kiraly, K. R. Wood. 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease*. Columbia: University of Missouri Press.
- Hull, R. 2002. *Matthew's Plant Virology*. Ed. Ke-4. San Diego: Academic Press.
- Jan, F. J., C. Fagoaga, S. Z. Pang and D. Gonsalves. 2000. A Single Chimeric Transgene Derived from Two Distinct Viruses Confers Multi-Virus Resistance in Transgenic Plants Through Homology Dependent Gen Silencing. *J. Gen. Virol.* 81:2103-2109.
- Khetarpal, R. K., B. Maisonneuve, Y. Maury, B. Chalhough, Dinant, H. Lecoq, A. Varma. 1998. Breeding for resistance to plant viruses. *In: Hadidi, A., R.K. Khetarpal, H. Koganezawa (eds.) Plant Virus Disease Control. APS Press.* pp: 14-32.
- Kosaka, Y. and T. Fukunishi. 1997. Multiple Inoculation with Three Attenuated Viruses for the Control of Cucumber Virus Disease. *Plant Dis* 81:733-738.
- Martin, E. M. 2004. Novel cytopathological structures induced by mixed infection of unrelated plant viruses. *Phytopathology* 94:111-119.
- Matthews, R.E.F. 1991. *Plant Virology*. 3rd ED. Academic press. New York.
- Nurhayati. 2012. *Virus Penyebab Penyakit Tanaman*. Unsri Pers. Palembang

- Semangun, H. 2000. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 850 Hlm
- Sukada, W. 2014. “Pengaruh Infeksi beberapa Jenis Virus Terhadap Penurunan Hasil pada Tanaman Cabai (*Capsicum Frutescens* L.)” (skripsi). Konsentrasi Perlindungan Tanaman Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Denpasar.
- Taufik, M., A. P. Astuti, S. H. Hidayat. 2005. Survey infeksi *Cucumber mosaic virus* dan *Chilli veinal mottle virus* pada tanaman cabai dan seleksi ketahanan beberapa kultivar cabai. *J. Agrikultura* 16:146-152.
- Walkey, D. G. A. and C. J. Payne. 1990. The reaction of two lettuce cultivars to mixed infection by beet western yellows virus, lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Plant Pathol* 39:156-160.
- Watson, J. D., M. Gilman, J. Witkowski, and M. Zoller. 1992. *Recombinant DNA* (2nd ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Widyastuti, D., S. H. Hidayat. 2005. Pengaruh Waktu Infeksi Virus Kerdil Pisang terhadap Kerentanan Tiga Kultivar Pisang. *J HPT Tropika* 5:42-49.