

**STUDI SIFAT VIRUS PENYEBAB PENYAKIT KRUPUK PADA
TANAMAN TEMBAKAU (Nicotiana tabacum L.)**

D
633.7
TR1.
S
e. 1

Oleh

Endang Budi Trisusilowati



**FAKULTAS PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR**

1989

RINGKASAN

ENDANG BUDI TRISUSILOWATI. Studi Sifat Virus Penyebab Penyakit Krupuk pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) (Di bawah bimbingan RUSMILAH SUSENO, sebagai ketua, dan SOEMARTONO SOSROMARSONO, BARIZI, SOEDARMADI HARDJOSUWIGNJO, M. ANWAR NUR, sebagai anggota).

Penyakit krupuk pada tembakau merupakan salah satu penyakit yang sangat mempengaruhi kualitas hasil, khususnya pada budidaya tembakau cerutu. Penyakit tersebut disebabkan oleh virus yang ditularkan oleh *Bemisia* sp.

Untuk dapat mengatasi masalah penyakit krupuk tembakau dengan usaha pengendalian yang terarah, perlu diketahui lebih banyak mengenai sifat-sifat virus penyebab penyakit. Penelitian ini dimaksudkan untuk mendapatkan informasi mengenai (i) variasi gejala yang disebabkan virus krupuk tembakau pada jenis tanaman inang tertentu, (ii) penularan virus penyebab penyakit, (iii) sifat serologi, dan (iv) mikroskopi virus.

Variasi gejala krupuk tembakau diamati pada tanaman tembakau yang terinfeksi di lapang maupun yang terinfeksi dari hasil inokulasi buatan. Gejala diamati pula pada tumbuhan lain yang dapat terinfeksi dari hasil uji inokulasi.

Penularan virus dilakukan dengan penyambungan maupun melalui serangga vektor. Penularan virus diuji pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), kapas (*Gossypium hirsutum* L.), tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.), terung panjang (*Solanum melongena* L.), terung (*Solanum khasianum* L.), tembakau (*Nicotiana glutinosa* L.), wedusan (*Ageratum*

conyzoides L.), kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.), dan kedelai (*Glycine max* Merr.). Sebagai sumber inokulum awal untuk penularan digunakan tanaman tembakau (*N. tabacum*) yang terinfeksi virus krupuk tembakau diperoleh dari lapang.

Penularan dengan penyambungan dilakukan melalui penyambungan samping yaitu dengan menyisipkan ujung petiola dari daun tanaman sakit yang digunakan sebagai inokulum pada bagian batang tanaman sehat yang diuji. Untuk penularan virus pada tanaman tembakau digunakan sumber inokulum tanaman sakit dengan berbagai gejala yang didapatkan dari lapang, sedang untuk tanaman uji yang lain hanya digunakan tanaman sakit dengan gejala yang dicirikan sebagai gejala krupuk isolat-1.

Penularan virus melalui serangga diuji dengan mempelajari (i) jenis serangga vektor, (ii) jumlah serangga vektor per tanaman yang efektif untuk inokulasi, (iii) penularan virus pada beberapa jenis tanaman, dan (iv) pengaruh jenis tanaman inang virus sebagai sumber inokulum untuk penularan. Spesies serangga yang diuji sebagai vektor adalah dua spesies kutu Aleyrodidae yaitu *Bemisia tabaci* Genn. asal kedelai dan kutu Aleyrodidae asal tembakau, serta kutudaun *Myzus persicae* Sulzer. Pengujian jumlah serangga vektor per tanaman yang efektif untuk inokulasi dilakukan dengan menggunakan jumlah serangga sebanyak 1-50 ekor per tanaman. Sebagai sumber inokulum digunakan tanaman tembakau yang terinfeksi dengan gejala krupuk isolat-1. Untuk penularan virus ke beberapa jenis tanaman lain yang juga telah diuji melalui penularan dengan penyambungan, digunakan spesies serangga yang berhasil menularkan virus sebanyak 20 ekor per tanaman. Kemudian beberapa jenis tanaman yang dapat terinfeksi dengan penularan tersebut yaitu

tomat, *S. khasianum*, dan *A. conyzoides* diuji pengaruhnya sebagai sumber inokulum untuk penularan virus, dan tanaman tembakau sakit digunakan sebagai pembandingan. Jumlah serangga yang digunakan untuk penularan tersebut sebanyak 1, 2, 3, 5, dan 20 ekor per tanaman. Penularan virus melalui serangga semua dilakukan dengan lama akuisisi dan inokulasi virus masing-masing 24 jam. Pada semua uji penularan virus, pengamatan terutama terhadap jumlah tanaman yang terinfeksi pada setiap uji dan masa inkubasi virus dalam tanaman.

Antigenisitas virus krupuk tembakau diuji dengan menentukan titer antiserum virus melalui beberapa metode pengujian serologi yaitu metode *micro-precipitin*, *Ouchterlony*, dan *Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (I-ELISA)*. Antiserum virus dihasilkan dari serum darah kelinci yang telah diimunisasi dengan suspensi virus "murni-sebagian" diperoleh dari pemurnian ekstrak jaringan tanaman tembakau yang terinfeksi dengan gejala krupuk isolat-1. Antiserum tersebut juga diuji apakah dapat digunakan untuk mendeteksi kembali virus pada beberapa cairan perasan tanaman sakit yang terinfeksi virus krupuk tembakau. Untuk keperluan tersebut digunakan cairan perasan tanaman tomat, *S. khasianum*, *A. conyzoides*, dan tembakau. Cairan perasan tanaman tembakau sehat digunakan sebagai kontrol, dan suspensi virus "murni-sebagian" sebagai pembandingan. Pengujian dilakukan dengan metode *Ouchterlony* dan *I-ELISA*.

Untuk mengetahui pengaruh infeksi virus krupuk tembakau terhadap perubahan yang terjadi pada nukleus sel jaringan floem tanaman yang terinfeksi dan kemungkinan adanya pembentukan badan inklusi virus di dalam nukleus, dilakukan pengamatan irisan jaringan tanaman dengan mikroskop cahaya melalui pewarnaan irisan menggunakan Azure-A 0.1%.

Pengamatan dilakukan pada jaringan tanaman tembakau sakit dari dua tanaman dengan gejala krupuk yang berbeda dari hasil inokulasi buatan. Kedua tanaman tersebut yaitu tanaman dengan gejala krupuk isolat-1 dan krupuk isolat-2. Perubahan pada bentuk dan ukuran nukleus sel jaringan tanaman yang terinfeksi tersebut dibandingkan dengan nukleus sel jaringan tanaman yang sehat.

Untuk mengetahui bentuk partikel virus krupuk tembakau dilakukan pengamatan dengan mikroskop elektron melalui beberapa metode pengamatan yaitu metode celup, irisan halus, dan *Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat lebih dari satu strain virus yang menyebabkan penyakit krupuk pada tembakau dengan gejala yang sangat bervariasi. Dari hasil inokulasi buatan dibedakan dua isolat virus krupuk tembakau yaitu isolat-1 dan isolat-2. Isolat-1 menyebabkan gejala perubahan bentuk daun pada tanaman dengan tepi helaian daun yang sebagian besar menggulung ke arah permukaan atas daun dan ada juga yang melengkung ke bawah, tulang daun tengah dan tulang-tulang daun lateral berkelok-kelok sehingga permukaan helaian daun berkerut tidak teratur, dan terjadi penebalan tulang daun yang disertai ada atau tidak adanya pertumbuhan enasi. Isolat-2 pada tanaman menyebabkan gejala yang hampir menyerupai gejala krupuk isolat-1 tetapi disertai dengan terbentuknya penebalan pada bagian-bagian tertentu secara merata pada semua tulang daun lateral yang dari permukaan bawah daun tampak seperti kerutan dengan warna lebih hijau daripada bagian yang tidak mengalami penebalan. Gejala krupuk isolat-1 tersebut diduga mirip dengan gejala yang oleh Thung (1932) disebut sebagai gejala keriting (*curl* atau

crinkle), sedang gejala krupuk isolat-2 cenderung lebih menyerupai gejala krupuk biasa (*common krupuk*). Bentuk penebalan pada gejala isolat-2 tampak merupakan salah satu bentuk dari enasi dan merupakan ciri gejala yang membedakan dengan gejala krupuk yang lain, maka penulis cenderung untuk menyebut gejala krupuk isolat-2 ini sebagai krupuk enasi.

Kedua isolat virus krupuk tembakau tersebut dapat ditularkan dengan penyambungan dan melalui vektor. Spesies vektor yang dapat menularkan virus yaitu kutu Aleyrodidae tembakau, yang diidentifikasi sebagai *Bemisia* sp. Kutudaun *M. persicae* dan *B. tabaci* asal kedelai tidak menularkan virus krupuk tembakau. Penularan kedua isolat virus itu lebih mudah dilakukan dengan penyambungan daripada melalui *Bemisia* sp., dan dengan melalui *Bemisia* sp. penularan lebih mudah dilakukan untuk isolat-2 daripada isolat-1.

Virus krupuk tembakau isolat-1 dapat menginfeksi tomat, *S. khasianum*, *N. glutinosa*, dan *A. conyzoides*, dan tidak pada kapas, terung panjang, kacang tanah, dan kedelai. Gejala pada tanaman yang terinfeksi tersebut sistemik yaitu perubahan bentuk daun menjadi melengkung dan berkerut, ukuran daun lebih kecil daripada daun yang normal, daun lebih kaku dan rapuh, serta pertumbuhan tanaman terhambat. Pada semua tanaman tidak didapatkan gejala lesio lokal.

Penularan virus krupuk tembakau isolat-1 oleh *Bemisia* sp. lebih mudah dilakukan dari tembakau ke tomat dan *A. conyzoides* daripada dari tembakau ke tembakau, *N. glutinosa*, dan *S. khasianum*. Penularan juga lebih mudah dilakukan dari tomat ke tembakau daripada dari *S. khasianum* dan *A. conyzoides* ke tembakau. Satu ekor *Bemisia* sp.

per tanaman mampu menularkan virus dari tomat dan *A. conyzoides* sakit ke tembakau sehat, sedang untuk penularan dari tembakau sakit ke tembakau sehat diperlukan minimum 3 ekor per tanaman. Persentase tanaman yang terinfeksi pada penularan virus dengan 1-3 ekor serangga per tanaman relatif rendah, tetapi persentase tersebut meningkat dengan jumlah serangga untuk inokulasi yang lebih banyak. Persentase infeksi yang dihasilkan pada penularan dengan tomat sebagai sumber inokulum juga relatif lebih tinggi daripada apabila tembakau, *S. khasianum*, dan *A. conyzoides* yang digunakan sumber inokulum. Oleh karena itu dibandingkan dengan *A. conyzoides* dan *S. khasianum*, tomat merupakan sumber inokulum yang lebih baik dan dapat menjadi sumber virus yang potensial untuk penyebaran di lapang.

Masa inkubasi virus krupuk tembakau berbeda pada inang yang berbeda dan masa inkubasi tersebut akan lebih lama apabila penularan dilakukan dengan vektor daripada apabila dengan penyambungan. Masa inkubasi virus dalam tanaman tembakau berkisar antara 19-46 hari pada penularan dengan vektor, dan hanya 9-26 hari apabila penularan dilakukan dengan penyambungan.

Spektrum absorpsi-UV virus krupuk tembakau isolat-1 "murni-sebagian" menunjukkan bentuk spektrum absorpsi nukleoprotein dengan maksimum dan minimum masing-masing pada panjang gelombang 260 dan 245 nm dan ratio $A_{280}/A_{260} = 0.69$. Virus krupuk tembakau isolat-1 tersebut bersifat antigenik dengan titer antiserum 1/128 dan 1/12 masing-masing dihasilkan dengan metode uji *micro-precipitin* dan Ouchterlony, dan sampai titer 1/4096 masih menunjukkan reaksi positif apabila digunakan metode I-ELISA. Melalui metode I-ELISA juga dapat dibuktikan bahwa

antiserum tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi kembali virus krupuk tembakau isolat-1 pada beberapa tanaman yang terinfeksi.

Hasil pengamatan mikroskop elektron dengan metode ISEM menunjukkan bahwa dalam suspensi virus terdapat bentukan yang diduga partikel virus dengan bentuk isometrik ganda berukuran 17 X 29 nm. Pengamatan dengan mikroskop cahaya untuk mengetahui terdapatnya badan inklusi virus di dalam nukleus sel jaringan yang terinfeksi tidak memberikan hasil seperti yang diharapkan. Tetapi terjadinya hipertrofi pada nuklei dan nukleoli sel jaringan floem yang terinfeksi diduga merupakan perwujudan awal dari infeksi sebelum perubahan struktur nuklear dan nukleolar yang lain.

Berdasarkan sifat-sifat virus tersebut maka virus krupuk tembakau dapat digolongkan sebagai salah satu virus dari kelompok virus gemini yang ditularkan oleh *Bemisia* sp.

STUDI SIFAT VIRUS PENYEBAB PENYAKIT KRUPUK PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.)

Oleh

Endang Budi Trisusilowati

Disertasi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Doktor Dalam Ilmu Pertanian

Pada

Fakultas Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor
Jurusan Entomologi dan Fitopatologi

FAKULTAS PASCASARJANA
INSTITUT PERTANIAN BOGOR

1989

JUDUL DISERTASI : STUDI SIFAT VIRUS PENYEBAB PENYAKIT KRUPUK PADA
TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum* L.)

NAMA PROMOVENDUS : Endang Budi Trisusilowati

NOMOR POKOK : 83530

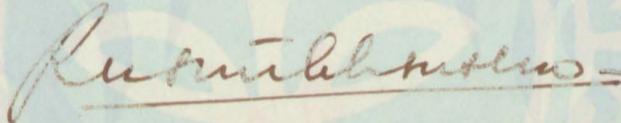
Disertasi Dipertahankan pada Ujian Senat Terbuka

Institut Pertanian Bogor Tanggal 1 April 1989

Pukul 13.00-16.00 WIB Bertempat di Aula

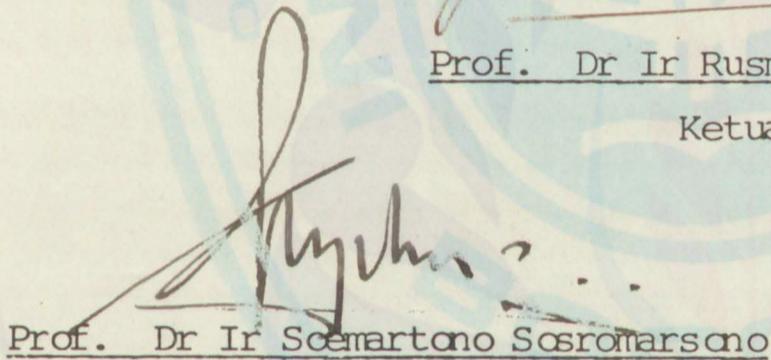
Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor

1. Komisi Penasihat



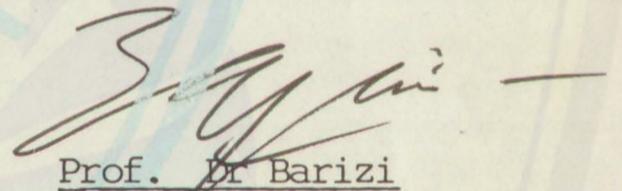
Prof. Dr Ir Rusmilah Suseno

Ketua



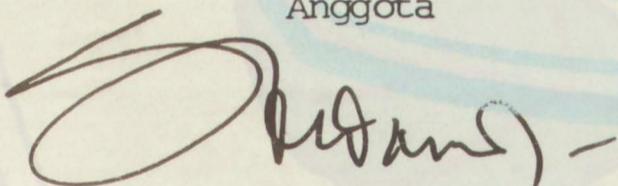
Prof. Dr Ir Soemartono Sosromarsono

Anggota



Prof. Dr Barizi

Anggota



Dr Ir Soedarmadi Hardjosuwignjo

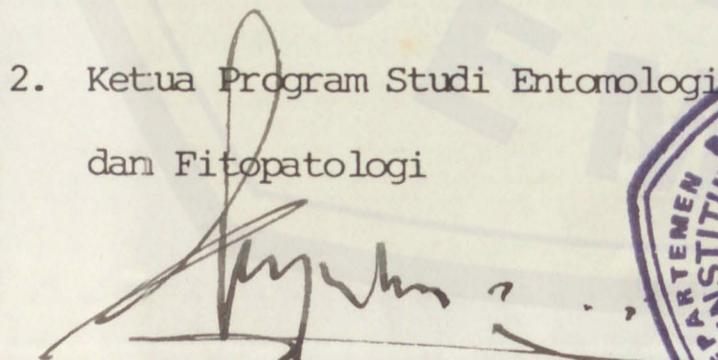
Anggota



Dr Ir M. Anwar Nur

Anggota

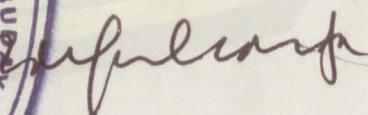
2. Ketua Program Studi Entomologi dan Fitopatologi



Prof. Dr Ir Soemartono Sosromarsono

Dekan Fakultas Pascasarjana





Dr Ir Edi Guhardja

Tanggal Lulus : 1 April 1989

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Jember Jawa Timur pada tanggal 27 Desember 1944, sebagai anak ketiga dari keluarga Soesanto Hadiwardojo dan Syamsi Amindari. Penulis lulus dari Sekolah Menengah Atas (SMA) di Jember pada tahun 1964, dan mendapat gelar Sarjana Muda Pertanian dari Fakultas Pertanian Universitas Negeri Jember pada tahun 1969.

Pada tahun 1975 memperoleh gelar Sarjana Pertanian dari Fakultas Pertanian Universitas Negeri Jember, dan sejak tahun 1976 sampai sekarang mejadi staf pengajar tetap bidang Fitopatologi pada Fakultas Pertanian Universitas Jember, Jember. Penulis mengikuti program pendidikan S₂ pada Fakultas Pascasarjana Institut Pertanian Bogor (IPB) pada tahun 1980, dan memperoleh gelar Magister Sain (MS) pada tahun 1983. Kemudian melanjutkan program pendidikan S₃ juga pada Fakultas Pascasarjana IPB yang dimulai sejak tahun 1983.

UCAPAN TERIMA KASIH

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan ke hadirat Allah Subhanahu Wata'ala, karena atas taufik dan karuniaNya penulis dapat menyusun hasil penelitian ini dalam bentuk karya tulis.

Kepada Prof. Dr Ir Rusmilah Suseno, ketua komisi penasihat, penulis menyampaikan rasa terima kasih atas segala petunjuk, pandangan, saran, koreksi, dan bantuan apapun yang telah diberikan selama pelaksanaan penelitian sampai penyelesaian naskah tulisan ini. Kepada anggota-anggota komisi penasihat, Prof. Dr Ir Soemartono Sosromarsono, Dr Ir Soedarmadi Hardjosuwignjo, Prof. Dr Barizi, Dr Ir M. Anwar Nur diucapkan terima kasih atas saran, bimbingan, dan koreksi dalam penyelesaian tulisan ini. Penulis juga sangat berterima kasih kepada Prof. Dr Ir Soemartono Sosromarsono atas kesempatan yang diberikan untuk melakukan pengamatan morfologi serangga dengan bantuan dan petunjuk beliau.

Terima kasih disampaikan pula kepada Rektor Universitas Jember dan Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember, yang telah memberi dorongan dan izin kepada penulis untuk mengikuti program pendidikan Pascasarjana. Kepada Rektor Institut Pertanian Bogor (IPB) dan Dekan Fakultas Pascasarjana IPB, yang telah memberi kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program pendidikan pada Fakultas Pascasarjana IPB, disampaikan pula terima kasih.

Terima kasih disampaikan kepada Tim Manajemen Pendidikan Doktor (TMPD) Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi, Departemen Pendidikan dan Kebudayaan, yang telah memberikan biaya pendidikan, juga kepada Yayasan

Beasiswa Supersemar yang telah memberikan bantuan untuk tambahan biaya penelitian.

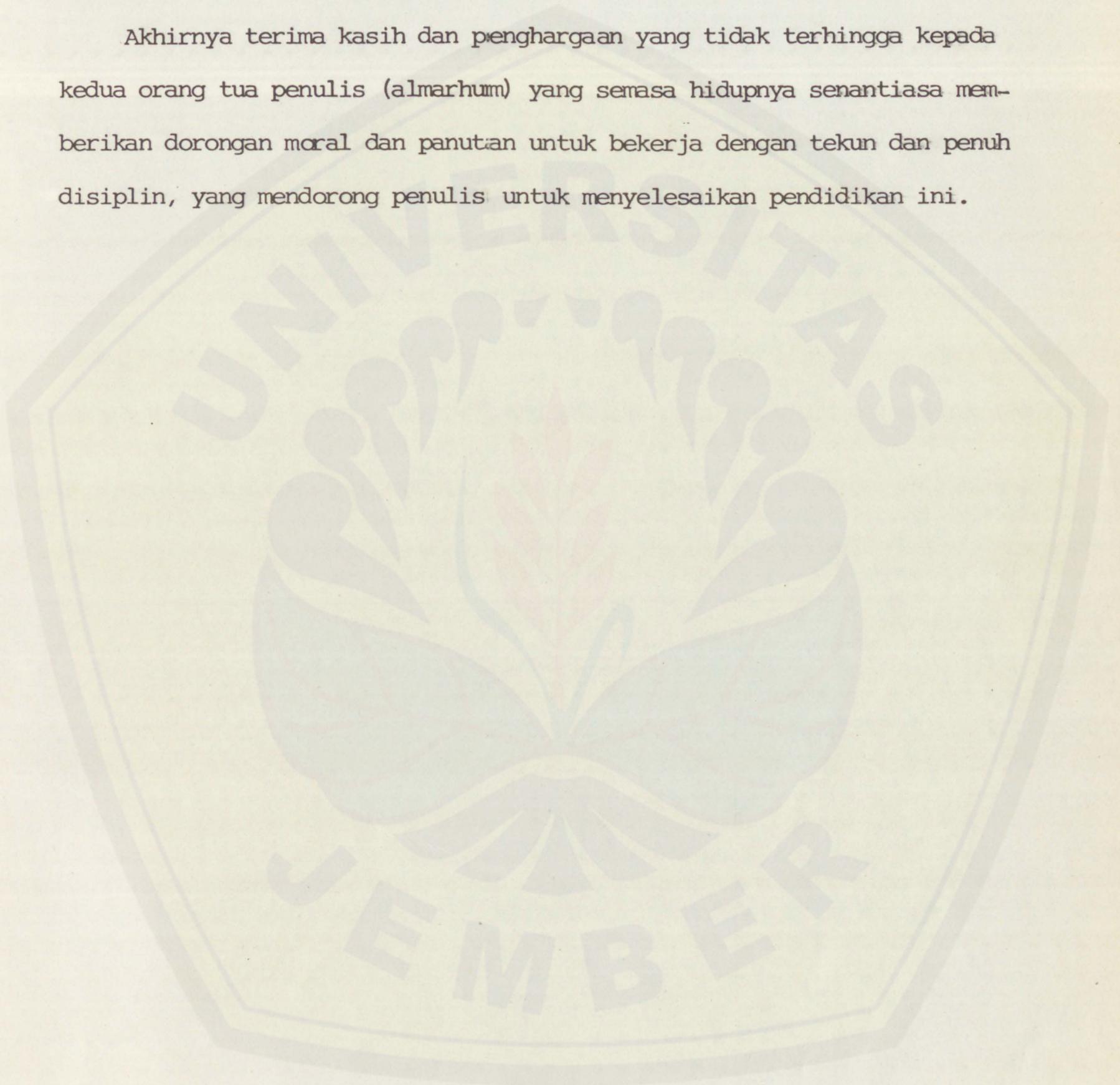
Pada kesempatan ini pula penulis menyampaikan terima kasih kepada Ketua Kelompok Peneliti Hama dan Penyakit Tumbuhan Balai Penelitian Tanaman Pangan (Balittan) Bogor, yang telah memberi ijin untuk menggunakan fasilitas dalam melaksanakan pengamatan di laboratorium biologi sel, Balittan Bogor. Terima kasih disampaikan pula kepada Kepala SubBalai Penelitian Hortikultura (SubBalithor) Segunung, Pacet, Cianjur atas ijin yang diberikan kepada penulis untuk menggunakan tempat dan fasilitas dalam melaksanakan serangkaian pengujian di laboratorium. Penulis juga menyampaikan terima kasih kepada Ketua Departemen Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian, IPB, yang telah memberi ijin untuk menggunakan fasilitas rumah kaca dalam pelaksanaan penelitian.

Kepada Dr Ir Nasir Saleh dan Ir M. Roechan, Staf Peneliti Penyakit Tumbuhan pada Balittan, Bogor yang telah banyak memberikan pengarahan dan bantuan dalam pelaksanaan pengamatan dengan Elektron Mikroskop di laboratorium Biologi Sel Balittan, Bogor, Penulis sangat berterima kasih. Demikian pula terima kasih disampaikan kepada Ir Agus Muharam MS, Staf Peneliti pada bagian Virologi SubBalithor Segunung yang juga telah banyak memberikan sumbangan pikir dan bantuan dalam melaksanakan pengujian di laboratorium.

Rasa terima kasih juga penulis sampaikan kepada semua staf bagian Entomologi dan Fitopatologi Balittan Bogor, staf bagian Virologi SubBalithor Segunung, dan staf Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan IPB, yang telah banyak memberikan bantuan dalam pelaksanaan penelitian

ini. Kepada semua pihak perorangan maupun Lembaga yang secara langsung telah membantu penulis selama penelitian sampai tersusunnya tulisan ini disampaikan pula terima kasih.

Akhirnya terima kasih dan penghargaan yang tidak terhingga kepada kedua orang tua penulis (almarhum) yang semasa hidupnya senantiasa memberikan dorongan moral dan panutan untuk bekerja dengan tekun dan penuh disiplin, yang mendorong penulis untuk menyelesaikan pendidikan ini.



KATA PENGANTAR

Serangkaian penelitian di rumah kaca dan di laboratorium telah dilaksanakan sebagai usaha untuk mempelajari beberapa sifat virus penyebab penyakit krupuk pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai pedoman untuk mengatasi masalah penyakit krupuk pada tembakau tersebut dengan suatu cara pengendalian yang tepat.

Dengan telah terlaksananya penelitian tersebut dan tersusunnya tulisan ini, penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak perorangan maupun Lembaga yang secara langsung telah memberikan bantuan kepada penulis sejak selama pelaksanaan penelitian sampai tersusunnya tulisan ini.

Harapan penulis semoga tulisan ini bermanfaat.

Bogor, April 1989

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xxi
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang Masalah	1
Tujuan Penelitian	3
TINJAUAN PUSTAKA	4
Penyebaran Penyakit	4
Etiologi dan Gejala	5
Penularan Virus	10
Tumbuhan Inang	18
BAHAN DAN METODE	22
Percobaan 1. Pengamatan Variasi Gejala Krupuk Tembakau	22
Percobaan 2. Penularan Virus	24
Percobaan 3. Pengujian Serologi	32
Percobaan 4. Mikroskopi Virus	39
HASIL DAN PEMBAHASAN	43
Variansi Gejala Krupuk Tembakau	43
Penularan Virus	53
Sifat Serologi	77
Mikroskopi Virus	86
KESIMPULAN	95
SARAN	97
DAFTAR PUSTAKA	98
LAMPIRAN	104

DAFTAR TABEL

Nomer	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Tumbuhan inang <i>B. tabaci</i> (Wolf <i>et al.</i> , 1949; Gameel, 1977).	20
2.	Inokulasi Virus Krupuk Tembakau dari Tembakau Sakit ke Tembakau Sehat dengan Penyambungan.	54
3.	Inokulasi Virus Krupuk Tembakau dari Tembakau Sakit ke Beberapa Tanaman Lain dengan Penyambungan.	56
4.	Inokulasi Kembali Virus Krupuk Tembakau Secara Penyambungan dengan Sumber Inokulum Tanaman Tomat (<i>L. esculentum</i>), terung (<i>S. khasianum</i>), dan tembakau (<i>N. glutinosa</i>) yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau Isolat-1.	57
5.	Inokulasi Virus Krupuk Tembakau dengan Spesies Serangga yang Berbeda.	58
6.	Pengaruh Jumlah Serangga terhadap Inokulasi Virus Krupuk Tembakau.	59
7.	Kemampuan Bertahan Hidup <i>Bemisia</i> Kedelai pada Beberapa Macam Inang.	60
8.	Inokulasi Virus Krupuk Tembakau ke Beberapa Tanaman dengan Vektor Kutu Aleyrodidae Asal Tembakau Sebanyak 20 ekor per Tanaman.	68
9.	Pengaruh Inang Sebagai Sumber Inokulum terhadap Inokulasi Virus Krupuk Tembakau oleh Kutu Aleyrodidae Tembakau pada Tembakau.	72
10.	Reaksi Antiserum terhadap Beberapa Cairan Perasan Tanaman yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau Isolat-1.	85
11.	Beda Harga Rataan Panjang dan Lebar Nukleus Sel Jaringan Floem Tanaman Tembakau yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau dan yang Sehat.	88

DAFTAR GAMBAR

Nomer	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Penyambungan Samping. a. Irisan ujung petiola daun tanaman sakit. b. Sayatan pada bagian batang tanaman sehat (dari samping). c. Sayatan pada bagian batang (dari depan).	26
2.	Pemeliharaan dan Perbanyakkan Serangga. A. Kutu Aleyrodidae dan <i>B. M. persicae</i> . A. a. Berisi tanaman inang sehat (1) dan imago serangga (2); b. Berisi (1) yang telah mengandung telur serangga (3) dan imago bebas virus yang dihasilkan (4); c. Berisi tanaman sakit unakuisisi virus. B. a. Berisi tanaman inang sehat (1) dan imago serangga (2); b. Berisi keturunan serangga (3), tanaman sehat yang baru (4), dan imago bebas virus yang dihasilkan (5); c. Berisi tanaman sakit untuk akuisisi virus.	29
3.	Inokulasi Virus Krupuk Tembakau Melalui Vektor. 1. Akuisisi virus: a. Tanaman sakit; b. Kurungan plastik milar; c. Ventilasi; d. Serangga vektor. 2. Inokulasi virus: a. Tanaman sehat yang diinokulasi; b. Serangga (d) yang telah infeksi. 3. Tanaman yang telah diinokulasi. 4. Alat pemindah serangga: a. Aspirator dari selang plastik; b. Kuas gambar nomer 1.	30
4.	A. Lempeng Plastik Optik untuk Uji <i>micro-precipitin</i> . a. Lempeng tutup tebal 5 mm; b. Lempeng bingkai tebal 1 mm; c. Lempeng dasar tebal 6 mm (ukuran lempeng 90 X 120 mm); d. Kertas grafik untuk pola tetesan berisi 7 X 10 titik. B. Letak tetesan. AS (1, 2, 3). Antiserum yang diuji; a. Diabsorpsi; ta. Tidak diabsorpsi; SN. Serum normal; k-r. Konsentrasi AS dari 1/8-1/1024; S. Cairan perasan tanaman sakit; Se. Cairan perasan tanaman sehat; V. Suspensi virus; P. Larutan penyangga.	36
5.	A. 1. Pelubang agar; 2. Penghisap potongan agar terdiri dari tabung hampa (a); Sekat karet. (b); Selang penghisap (c); Pipet kecil (d). B. Pola Tetesan pada Agar (Uji Ouchterlony); An. Lubang tengah, letak antigen; AS. Lubang di sekeliling lubang tengah, letak antiserum (konsentrasi AS mulai dari lubang bertanda AS searah jarum jam, untuk a: 1/6, 1/12, 1/24,, 1/192 dan untuk ta: 1/1, 1/2, 1/4,, 1/32).	37

6.	Susunan Letak Perlakuan Dalam Lubang Plat Mikrotiter pada <i>Indirect Elisa</i> . X. Lubang kosong; B (2-11). AS ₂ (1/8-1/4096) + V (1/10); C (2-11). AS ₁ (1/8-1/4096) + V (1/10); F (2-11). AS ₂ (1/8-1/4096) + Se (1/10); G (2-11). AS ₁ (1/8-1/4096) + Se (1/10); D dan E (2-11). Digunakan untuk reaksi AS dengan cairan perasan beberapa tanaman sakit; A (1). AS ₂ + V (1/1).	38
7.	Pembuatan Preparat Nukleus Sel dengan Pewarnaan Azu-re-A.	40
8.	Beberapa Variasi Gejala Krupuk Tembakau. 1. Krupuk isolat-1; 2. Krupuk daun tebal; 3. Campuran antara krupuk isolat-1 dan krupuk daun tebal; 4. Krupuk isolat-1 dengan tulang daun yang berkelok-kelok pada permukaan bawah daun (a) dan enasi (b); 5. Tanaman sehat; 6. Krupuk daun tebal yang disertai klorosis..	45
9.	Gejala Krupuk Tembakau Hasil Inokulasi Buatan. 1. Tanaman dengan gejala krupuk isolat-1 sebagai sumber inokulum; 2 dan 3. Gejala krupuk isolat-1 dari hasil inokulasi; 4. Bentuk tepi daun yang melengkung ke arah permukaan bawah daun (a), bentuk tulang daun yang berkelok-kelok (b dan d), dan bentuk tepi daun yang menggulung ke arah permukaan atas daun (c). ...	47
10.	Gejala Krupuk Tembakau Hasil Inokulasi Buatan dengan Sumber Inokulum Tanaman dengan Gejala Krupuk Daun Tebal Atau dengan Gejala Campuran Antara Krupuk Isolat-1 dan Krupuk Daun Tebal. 1. Gejala krupuk isolat-1, permukaan bawah daun (a) dan permukaan atas daun (b); 2. Gejala krupuk isolat-2, permukaan bawah daun (a) dan permukaan atas daun (b).	48
11.	Gejala pada Tanaman Tomat yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau Isolat-1. 1. Tanaman sehat (a) dan sakit (b); 2. Daun tanaman sehat (a) dan sakit (b); 3. Tanaman yang terinfeksi dilihat dari atas.	51
12.	Gejala pada Tanaman <i>A. conyzoides</i> dan <i>S. khasianum</i> yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau Isolat-1. 1. Tanaman <i>A. conyzoides</i> sakit (a) dan sehat (b); 2. Permukaan atas daun <i>A. conyzoides</i> , sakit (a) dan sehat (b); 3. Permukaan bawah daun <i>A. conyzoides</i> , sakit (a) dan sehat (b); 4. Gejala pada <i>S. khasianum</i> , sakit (a) dan sehat (b).	52

Nomer	Halaman
13. Imago Kutu Aleyrodidae. 1. <i>Bemisia</i> kedelai; 2. Kutu Aleyrodidae tembakau; a. Besar sebenarnya; b. Pembesaran 40 kali.	63
14. Kulit Pupa Kutu Aleyrodidae. Asal kedelai (kanan) dan asal tembakau (kiri); A. Pengamatan pada permukaan daun (pembesaran 50 kali) dan B. Pengamatan pada preparat pupa (pembesaran 100 kali).	65
15. Spektrum Absorpsi-UV Virus Krupuk Tembakau Isolat-1 "Murni-sebagian".	78
16. Bentuk Endapan Hasil Reaksi Antara Antiserum (AS) dengan Antigen (V) pada Uji <i>Micro-precipitin</i> . a. AS + V (+++); b. AS + V (++); c. AS + V (++) ; d. AS + V (+); e. AS + Se (-); f. SN + V (-); g. SN + S (-); h. AS (ta) + V (x). a-e. AS (a). .	79
17. Endapan Hasil Reaksi antara AS dengan Antigen pada Uji Ouchterlony. Lubang tengah letak antigen: S = Cairan perasan tanaman sakit; Se = Cairan perasan tanaman sehat; V = Suspensi virus "murni-sebagian". Lubang di sekeliling lubang tengah letak AS: A. AS (ta) dimulai dari tanda 1 searah jarum jam berarti 1/1, 1/2, 1/4,, dan 1/32; B. AS (a) dimulai dari tanda 6 searah jarum jam berarti 1/6, 1/12, 1/24,, dan 1/192.	80
18. Perubahan Warna Larutan pada <i>Indirect ELISA</i> . B dan C (2-11). Contoh yang diuji (AS + V); F dan G (2-11). Kontrol (AS + Se); A (1). Pembanding yaitu AS (1/8) + V (1/1); D dan E (6-7). Kontrol (AS + penyangga).	82
19. Hubungan Titer Antiserum Virus Krupuk Tembakau Isolat-1 dengan Nilai Absorbansi Larutan Hasil Reaksi antara Antiserum dan Virus. I. AS ₁ = antiserum pada pengambilan darah satu minggu setelah suntikan terakhir; II. AS ₂ = antiserum pada pengambilan darah dua minggu setelah suntikan terakhir; Y ₁ = absorbansi contoh; Y ₂ = 2 X absorbansi kontrol.	83
20. Endapan Hasil Reaksi Antiserum (AS) dengan Cairan perasan Tanaman yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau (S = tembakau sakit; To = tomat sakit; Tr = <i>S. khassianum</i> sakit; Ag = <i>A. conyzoides</i> sakit; Se = tembakau sehat) dan Suspensi Virus Krupuk Tembakau Isolat-1 "murni-sebagian" (V). ta = antiserum tanpa diabsorpsi; a = antiserum yang diabsorpsi.	86

Nomer

Halaman

21. Bentuk dan Ukuran Nuklei (N) dan Nukleoli (Ni) Sel Jaringan Floem Tanaman Tembakau. a. Sel jaringan sehat; b. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-1; c. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-2. 87
22. Bentuk Nuklei (N) dengan Beberapa Nukleoli (Ni) dari Sel Jaringan Floem Tanaman Tembakau. a. Sel jaringan sehat; b. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-1; c. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-2; NI. Nukleolus yang berukuran lebih besar daripada yang normal. ... 91
23. Partikel Virus Krupuk Tembakau Isolat-1. V. Partikel ganda (pembesaran 240 000 kali). 93
24. Partikel Virus Krupuk Tembakau, Suatu Virus Gemini dengan Bentuk Isometrik Ganda. Ukuran Partikel 15-20 X 25-30 nm. Gambar direproduksi dari Osaki dan Inouye (1978). 94

DAFTAR LAMPIRAN

Nomer	<u>Teks</u>	Halaman
1.	Skema Pemurnian Virus Krupuk Tembakau (Osaki dan Inouye, 1978).	105
2.	Skema Absorpsi Antiserum (AS) oleh Protein Normal Tanaman Sehat (Lommel <i>et al.</i> , 1982).	106
3.	Prinsip Metode <i>Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (I-ELISA) (Clark dan Adams, 1977; Voller <i>et al.</i> , 1979).	107
4.	Absorbansi Larutan Virus Krupuk Tembakau Isolat-1 "murni-sebagian" (1:10) pada Kisaran Panjang Gelombang 230-325 nm.	108

PENDAHULUAN

Latar Belakang Masalah

Masalah hama dan penyakit merupakan salah satu faktor yang menentukan berhasil atau tidaknya pembudidayaan tembakau, karena dapat menurunkan produksi baik kuantitas maupun kualitas. Mengingat tembakau merupakan salah satu komoditi ekspor Indonesia yang penting selain untuk memenuhi kebutuhan konsumsi dalam negeri, masalah tersebut tidak dapat diabaikan.

Penyakit krupuk merupakan salah satu penyakit yang sangat mempengaruhi kualitas hasil terutama untuk jenis tembakau cerutu. Akibat penyakit tersebut daun tanaman mengalami perubahan bentuk dengan tepi daun yang umumnya menggulung ke atas, tulang daun menebal dan berkelok-kelok, permukaan daun tidak rata, dan daun menjadi lebih kaku dan rapuh sehingga tidak dapat digunakan sebagai daun pembungkus. Menurut Thung (1932) penyakit krupuk disebabkan oleh virus yang ditularkan oleh *Bemisia* sp. dan dengan penyambungan. Thung (1949, dalam Semangoen, 1971) kemudian melaporkan bahwa *Bemisia tabaci* Genn. merupakan vektor virus krupuk tembakau yang penting.

Di Indonesia penyakit krupuk tembakau dianggap kurang berarti apabila dibandingkan dengan penyakit virus mosaik tembakau, karena lebih jarang terdapat (Semangoen, 1971). Namun demikian ledakan penyakit tersebut dengan intensitas yang berat terjadi pada musim tanaman 1984/1985 di beberapa daerah tembakau di Jawa Timur. Di daerah Bojonegoro pada saat terjadi ledakan, luas pertanaman yang rusak akibat penyakit krupuk ditaksir mencapai sekitar 30 persen dari seluruh luas areal

pertanaman tembakau (Poebokoescemo, 1984). Dibandingkan dengan keadaan pada tahun-tahun sebelumnya yang hanya merusak luas pertanaman berkisar antara 2-3 persen, maka penyakit tersebut perlu mendapatkan perhatian.

Pengetahuan mengenai penyakit krupuk tembakau di Indonesia masih sangat terbatas. Sejak penelitian Thung (1932) tidak banyak dilaporkan tentang hasil-hasil penelitian penyakit ini. Dilihat dari segi perbedaan gejala krupuk pada tanaman tembakau yang terinfeksi, kemungkinan ada lebih dari satu jenis virus yang menyebabkan penyakit krupuk pada tembakau. Thung (1932) membedakan tiga macam penyakit krupuk pada tembakau dengan gejala yang berbeda masing-masing disebut sebagai krupuk biasa (*common krupuk*), keriting (*curl* atau *crinkle*), dan krupuk jernih (*transparent krupuk*). Mengenai perbedaan gejala ini masih perlu ditinjau kembali karena diduga telah terjadi berbagai variasi.

Perkembangan penyakit krupuk tembakau antara lain dipengaruhi oleh populasi dan kemampuan serangga vektornya menularkan virus. Dalam tahun-tahun akhir ini banyak diberitakan bahwa populasi *B. tabaci* cukup tinggi dan menyerang tanaman kedelai di berbagai daerah di Indonesia. Populasi *B. tabaci* yang cukup tinggi pada pertanaman kedelai tersebut mungkin ada hubungannya dengan terjadinya ledakan penyakit krupuk pada tembakau. Untuk membuktikan hal tersebut kemampuan *B. tabaci* asal pertanaman kedelai untuk menularkan virus krupuk tembakau perlu diuji.

B. tabaci diketahui mempunyai kisaran inang yang luas, selain sebagai hama juga merupakan vektor dari sejumlah besar virus tanaman (Kalshoven, 1981). Gejala krupuk seperti pada tembakau sering dijumpai

pada berbagai tumbuhan gulma maupun tanaman budidaya yang telah dilaporkan sebagai inang *B. tabaci*. Apakah penyebab gejala krupuk pada berbagai tanaman tersebut berasal dari tembakau masih harus dibuktikan, sebab apabila memang benar maka penyebaran virus krupuk tembakau oleh vektornya juga akan membahayakan tanaman budidaya yang lain.

Agar lebih dapat membandingkan antara virus krupuk tembakau dengan virus penyebab gejala krupuk yang lain, perlu dipelajari morfologi partikel virus dan beberapa sifat lainnya. Pengetahuan yang lebih banyak mengenai sifat virus penyebab penyakit krupuk tembakau tersebut diperlukan, karena akan sangat membantu dalam usaha mengatasi masalah penyakit itu. Berdasarkan pemikiran tersebut maka penelitian ini dilakukan.

Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari sifat virus krupuk tembakau antara lain melalui variasi gejala yang diakibatkan pada beberapa spesies inang, penularan virus, serologi, dan morfologi partikel virus melalui mikroskopi.

TINJAUAN PUSTAKA

Penyebaran Penyakit

Penyakit krupuk tembakau tersebar di semua tempat penghasil tembakau di daerah tropis maupun subtropis yaitu di Afrika, India, Indonesia, Australia, Filipina, Rumania, Rusia, Brazil, Puerto Rico, Venezuela, Kolombo, Madagaskar, Maroko, Meksiko, Panama, Taiwan, Jepang, dan Amerika Serikat (Wolf, Whitcomb, dan Mooney, 1949; Lucas, 1975; Osaki dan Inouye, 1981). Menurut Thung (1932) penyakit krupuk di Jawa kemungkinan sama dengan penyakit yang oleh beberapa peneliti sebelum Thung disebut sebagai gila (Jochems), krupuk dan krekoh (Keucheni-us, Gandrup, dan Schweizer), *faltenzwerg* (Peters dan Schwartz), *crinkle* (Roberts), dan *crinkly dwarf* (Storey). Kemudian Wolf *et al.* (1949) dan Lucas (1975) mengemukakan bahwa penyakit krupuk tembakau selanjutnya disebut dengan nama yang berbeda menurut bahasa yang digunakan oleh setiap peneliti yaitu sebagai krupuk dan krekoh (Jawa), gila (Deli), *faltenzwerg* (Jerman), *leaf curl*, *crinkle*, *crinkly dwarf* atau *cabbaging* (Inggris), serta *kroeshaar* dan *krulziekte* (Belanda). Nama yang kemudian secara umum digunakan di Indonesia untuk penyakit tersebut ialah krupuk.

Di Indonesia penyakit krupuk tembakau banyak terdapat di Jawa dan Sumatera. Di Jawa luas pertanaman yang rusak akibat penyakit tersebut mencapai hampir 20 persen dari luas semua areal pertanaman tembakau (Departemen Pertanian, 1983). Menurut Poerbokoesoemo (1984) pada saat terjadinya ledakan penyakit pada musim tanam 1984/1985, luas pertanaman yang rusak akibat penyakit tersebut ditaksir mencapai

sekitar 30 persen dari luas areal pertanaman tembakau. Penyakit tersebut dilaporkan pula tersebar merata di setiap areal pertanaman dengan persentase dan intensitas penyakit yang berbeda-beda.

Penyakit krupuk juga pernah merupakan penyakit yang paling merugikan pada pertanaman tembakau di Afrika Timur, Rhodesia, dan di daerah Transvaal (Afrika Selatan) karena hampir 50 persen dari luas pertanaman dan bahkan ada yang keseluruhan luas pertanaman terinfeksi (Moore, 1933 dalam Wolf *et al.*, 1949). Di Venezuela selama musim kering luas pertanaman yang terinfeksi biasanya berkisar 5-10 persen, meskipun di tempat-tempat tertentu semua areal pertanaman terinfeksi. Menurut Pal dan Tandon (1937) di India Utara luas pertanaman yang terinfeksi juga berkisar 5-10 persen, dan hanya di beberapa kebun terjadi serangan pada semua tanaman.

Etiologi dan Gejala

Penyakit krupuk tembakau pertama kali dilaporkan terdapat di Indonesia oleh Peters dan Schwartz pada tahun 1912. Penyebab penyakit tersebut tidak diketahui sampai Storey (1931) dan Thung (1932) secara hampir bersamaan melaporkan bahwa penyakit krupuk tembakau disebabkan oleh virus yang ditularkan melalui spesies serangga Aleyrodidae. Sharp dan Wolf (1949) yang pertama kali mengamati terdapatnya partikel virus krupuk tembakau dalam cairan perasan tanaman tembakau yang terinfeksi, dan mendapatkan bahwa partikel tersebut berbentuk tongkat dengan ukuran $15 \times 280-1140$ nm yang hampir mirip dengan partikel virus mosaik tembakau. Sharp dan Wolf (1951) dari hasil pengujian berikutnya kemudian melaporkan bahwa partikel virus krupuk tembakau tersebut

ternyata tidak berbentuk tongkat tetapi merupakan partikel yang halus, berbentuk isometrik dengan diameter 39 nm. Dua dasawarsa setelah penemuan tersebut Kiriyama (1972, dalam Lucas, 1975) kemudian mengemukakan bahwa partikel virus krupuk tembakau tersebut berukuran 30 nm. Menurut Kitajima dan Costa (1964, dalam Costa, 1969) sebagian besar virus yang ditularkan oleh serangga Aleyrodidae yang telah diuji umumnya memang berbentuk isometrik.

Selanjutnya Osaki dan Inouye (1978) dengan menggunakan suspensi murni virus krupuk tembakau berhasil mendapatkan bahwa partikel virus tersebut berbentuk isometrik yang senantiasa terdapat dalam keadaan berpasang-pasangan (ganda), menggambarkan suatu bentuk partikel gemini dengan ukuran 15-20 X 25-30 nm. Berdasarkan hasil penemuan tersebut kemudian diduga bahwa virus krupuk tembakau termasuk ke dalam kelompok virus gemini. Menurut Bock (1982) kelompok virus gemini merupakan golongan virus yang mempunyai asam nukleat dalam bentuk deoksiribonukleat (DNA), lokasinya dalam tanaman terbatas pada jaringan floem, dan ada kecenderungan bahwa partikel virus terakumulasi di dalam nukleus sel jaringan floem yang terinfeksi.

Penyakit krupuk tembakau jarang dijumpai di pembibitan tembakau. Gejala penyakit tersebut pada tanaman biasanya baru terlihat setelah 2-3 minggu sejak bibit dipindahkan ke lapang. Infeksi virus penyebab penyakit tersebut pada tanaman yang masih muda menyebabkan pertumbuhan tanaman terhambat, tanaman jarang dapat tampak normal kembali dan bahkan dapat menjadi rusak sama sekali. Daun yang masih muda pada setiap umur tanaman merupakan bagian yang rentan. Daun pada bagian atas yang dekat dengan titik tumbuh tanaman tampak menggulung dan

menjadi keriting, sedang daun yang letaknya lebih di bawah dan sudah lebih tua tetap normal dan tanaman yang sakit biasanya juga menjadi kerdil (Wolf *et al.*, 1949).

Thung (1932) membedakan tiga gejala krupuk pada tanaman tembakau yang terinfeksi virus krupuk tembakau yaitu gejala krupuk biasa, keriting, dan krupuk jernih. Tanaman dengan gejala krupuk biasa menunjukkan tepi daun yang melengkung ke arah permukaan bawah daun, helaian daun tidak rata, pada permukaan bawah daun tulang daun tampak berkelok-kelok dengan penebalan pada tempat-tempat tertentu yang sering berkembang menjadi enasi. Tanaman yang digolongkan menunjukkan gejala keriting yaitu tanaman yang seluruh bagian tepi daunnya melengkung ke arah permukaan bawah daun, helaian daun diantara tulang-tulang daun lateral menonjol ke arah permukaan bawah daun sehingga tampak bergelombang, dan pada permukaan bawah daun tulang daun berkelok-kelok serta terdapat pembentukan enasi. Pada krupuk jernih tanaman menunjukkan tepi daun yang melengkung ke arah permukaan atas daun, tidak terjadi penebalan tulang daun dan pembentukan enasi tetapi tulang daun terutama tulang-tulang daun lateral menjadi jernih.

Pal dan Tandon (1937) melaporkan bahwa di India terdapat lima macam gejala krupuk tembakau yang masing-masing disebut sebagai krupuk A, B, C, D, dan X. Pada krupuk A dan B pertumbuhan tanaman jelas terhambat, daun lebih hijau daripada yang normal, dan ada pembentukan enasi. Krupuk A mempunyai daun yang lebih kecil, lebih berkerut dan tebal, serta menjadi kaku dan rapuh, sedang pada krupuk B daun tidak menebal dan tidak kaku. Pada krupuk C dan D tulang daun menjadi jernih, dan tidak terdapat pembentukan enasi. Krupuk C dapat dibedakan dari D,

karena pada C terdapat penebalan berwarna hijau pada tempat-tempat tertentu sepanjang tulang daun. Krupuk X merupakan bentuk yang bervariasi dan tampak merupakan campuran dari beberapa atau semua bentuk krupuk yang lain.

Menurut Pal dan Tandon (1937) beberapa diantara gejala krupuk tersebut ada kemungkinan sama seperti yang didapatkan oleh Thung (1932) di Jawa. Krupuk A diduga identik dengan bentuk keriting dari Thung (1932), sedang krupuk C menyerupai krupuk jernih. Pada krupuk A terbentuk sejumlah enasi yang berdasarkan bentuknya dibedakan menjadi tiga macam yaitu (1) seperti jumbai-jumbai, (2) seperti mangkok dan tidak bertangkai, dan (3) seperti mangkok dan bertangkai.

Berdasarkan perbedaan gejala krupuk tersebut Kerling (1933) menduga bahwa ada lebih dari satu virus yang termasuk dalam satu kumpulan virus krupuk tembakau, yang masing-masing ditularkan oleh serangga Aleyrodidae. Pal dan Tandon (1937) menganggap bahwa krupuk A, B, C, dan D disebabkan oleh virus yang berbeda dan disebut sebagai virus krupuk tembakau 1-4, sedang krupuk X diduga disebabkan oleh campuran dari dua atau lebih virus-virus tersebut dalam kombinasi yang berbeda. Keempat gejala krupuk tersebut yaitu krupuk A, B, C, dan D dengan mudah dapat segera dipisahkan, sedang krupuk X sangat bervariasi dan dapat mendekati setiap gejala krupuk yang lain. Krupuk A tampak yang paling virulen dan berturut-turut diikuti oleh B, D, dan C. Gejala krupuk C yang paling lemah dan tidak selalu dengan mudah dibedakan dari tanaman yang sehat, tetapi mengenai kuat atau lemahnya gejala tersebut juga dipengaruhi oleh varietas tembakau.

Beberapa peneliti menganggap bahwa virus krupuk tembakau identik dengan virus krupuk ubi kayu (*Manihot esculenta* Granz.) dan virus krupuk kapas (*Gossypium hirsutum* L.), tetapi dari hasil inokulasi silang Wolf *et al.* (1949) menyimpulkan bahwa ketiga virus tersebut adalah virus yang berbeda dan diduga ketiga virus itu sebagai penyebab penyakit krupuk tembakau. Osaki dan Inouye (1978) melaporkan bahwa virus krupuk tembakau di Jepang identik dengan *tomato yellow dwarf virus*, yang menurut Osaki dan Inouye (1981) pada tanaman tembakau virus umumnya mengakibatkan pertumbuhan tanaman terhambat, batang terpilin, daun melengkung dan berkerut dengan ukuran yang lebih kecil daripada yang normal, tulang daun terpilin dan sepanjang tulang daun sering terbentuk penebalan berwarna hijau atau enasi. Pada tanaman tomat virus menyebabkan daun tanaman melengkung, berkerut, dan menguning, dan pada cabai gejala yang ditimbulkan ialah daun melengkung, menggulung, berkerut, pelepuhan, dan pembengkakan tulang daun.

Bermacam-macam gejala yang lain juga dihasilkan pada beberapa tanaman seperti pada *Datura stramonium*, virus menyebabkan tulang daun lateral pada daun yang muda menjadi transparan dan diikuti dengan terjadinya klorosis pada daerah diantara tulang-tulang daun lateral. Selain itu pertumbuhan tinggi tanaman juga terhambat disertai dengan ukuran daun yang lebih kecil daripada normal, serta daun melengkung dan terpilin seperti spiral (Osaki dan Inouye, 1981). Infeksi virus krupuk tembakau tersebut pada *Nicotiana glutinosa* menyebabkan daun tanaman menjadi melengkung, keriting dengan ukuran yang tetap kecil, dan kadang-kadang enasi atau penebalan berwarna hijau terbentuk pada sejumlah besar tulang daun lateral.

Penularan Virus

Virus krupuk tembakau ditularkan oleh vektor *Bemisia* sp. maupun dengan secara penyambungan, dan tidak melalui cairan perasan tanaman sakit, biji, maupun melalui tanah (Thung, 1932). Penularan dan pemencaran virus tersebut di lapang tergantung pada aktivitas *Bemisia*.

Penularan Melalui Serangga

Hopkins (1932), Wolf *et al.* (1949), dan Thung (1949, dalam Semangoen, 1971) melaporkan bahwa *B. tabaci* merupakan vektor virus krupuk tembakau yang penting di berbagai daerah penyebaran penyakit krupuk tembakau. Menurut Gameel (1977) *B. tabaci* adalah sinonim dari *B. gossypiperda* Misra dan Lamba yang diketahui sebagai vektor virus krupuk pada kapas.

Selain *B. tabaci*, dua spesies Aleyrodidae yang lain yaitu *B. tuberculata* Bondar dan *Aleurotrachelus socialis* Bondar juga dilaporkan dapat bertindak sebagai vektor virus krupuk tembakau (Wolf *et al.*, 1949). McClean (1940) juga melaporkan bahwa spesies Aleyrodidae *Trialeurodes natalensis* Corb. dapat menularkan virus krupuk tembakau, tetapi kemampuan spesies serangga tersebut untuk menularkan virus tidak sama. Salah satu koloni *T. natalensis* dilaporkan tidak dapat menularkan virus krupuk tembakau, sedang koloni yang lain dapat. Koloni *T. natalensis* yang dapat menularkan virus diduga terdiri dari dua spesies serangga, dan spesies yang lain kemungkinan *B. gossypiperda*.

Yamauchi, Imoto, Hibi, dan Komuro (1976) melaporkan bahwa spesies *Trialeurodes* yang lebih dikenal sebagai kutu putih rumah kaca yaitu *T. vaporariorum* (Westw.) ternyata tidak menularkan virus krupuk tembakau.

T. vaporariorum diketahui sebagai vektor *beet pseudo-yellows virus* serta virus bunga matahari, dan semula diduga pula sebagai vektor virus krupuk tembakau.

Sampai saat ini belum dilaporkan serangga selain spesies dari Aleyrodidae yang dapat berperan sebagai vektor virus krupuk tembakau. Thung (1932) tidak berhasil menularkan virus krupuk tembakau melalui *Thrips* dan *Myzus persicae* Sulzer. Menurut Wolf et al. (1949) *Dicyphus minimus* juga tidak berperan sebagai vektor virus krupuk tembakau.

Biologi *B. tabaci*

Morfologi *B. tabaci* umumnya dicirikan mempunyai tubuh imago berwarna kuning, sayap tertutup oleh tepung berwarna putih, dan panjang tubuh 1.0-1.5 mm (Kalshoven, 1981). Menurut Gameel (1977) imago dan pupa berwarna putih kekuning-kuningan, tubuh imago ditutup oleh sekresi seperti tepung, imago jantan lebih kecil daripada yang betina, sayap berwarna putih dengan bentuk dan ukuran yang sama, dan antena ruas ketiga lebih panjang daripada ruas-ruas yang lain.

Perkembangan *B. tabaci* terjadi melalui empat stadia yaitu telur, nimfa, pupa, dan imago. Telur berbentuk bulat panjang (panjang 0.2-0.3 mm) dengan tangkai yang pendek pada salah satu ujungnya (Gameel, 1977). Telur diletakkan satu per satu dengan posisi tegak lurus pada permukaan bawah daun. Pada tanaman kapas serangga betina setelah meletakkan telur pada permukaan bawah daun kemudian bergerak pindah ke permukaan atas daun, dan peletakan telur pada daun-daun yang muda lebih banyak daripada pada daun yang tua. Menurut Badri (1983) telur yang baru diletakkan berwarna kekuning-kuningan dan tertutup oleh

tepung lilin, setelah 24 jam warnanya berubah menjadi coklat dan dalam waktu dua hari telah terbentuk dua bintik merah kecoklat-coklatan yaitu mata facet embrio.

Masa inkubasi telur tergantung pada keadaan lingkungan, terutama suhu. Pada suhu antara $26-32^{\circ}\text{C}$ masa inkubasi berlangsung selama 4-6 hari, sedang pada suhu $18-22^{\circ}\text{C}$ meningkat menjadi 10-16 hari dan perkembangan embrio terhenti pada suhu 16°C (Gameel, 1977).

B. tabaci mempunyai tiga instar nimfa yang perkembangannya secara keseluruhan berlangsung selama 12-15 hari pada suhu $28-32^{\circ}\text{C}$, dan 28-32 hari pada suhu $20-24^{\circ}\text{C}$. Pada suhu tinggi yaitu $30-34^{\circ}\text{C}$ periode perkembangan tersebut lebih cepat, dan menjadi lebih lama apabila suhu mencapai $18-22^{\circ}\text{C}$ (Gameel, 1977). Nimfa instar pertama yang baru keluar dari telur aktif bergerak dan mengisap cairan makanan pada permukaan bawah daun selama 1-2 hari, dan setelah mendapatkan tempat yang sesuai akan menetap dan tidak bergerak lagi. Menurut Badri (1983) nimfa instar pertama *B. tabaci* berbentuk bulat panjang, berwarna hijau cerah, dan bagian pinggir tubuh nimfa terdapat bulu-bulu halus dengan lapisan lilin tipis. Nimfa instar kedua dan ketiga tidak bergerak dan berwarna hijau. Panjang tubuh nimfa berkisar antara 0.2-0.4 mm.

Pupa *B. tabaci* berbentuk bulat panjang dengan bagian toraks agak melebar dan cembung, berwarna kuning, dan ruas abdomen tampak jelas (Badri, 1983). Bagian pinggir pupa tidak rata dan pada bagian dorsal terdapat tujuh pasang duri dan satu pasang pada ujung anal. *Vasiform orifice* berbentuk segitiga dan memanjang, serta operkulum menutupi hampir separuh bagian dari *vasiform orifice*.

Menurut Gameel (1977) imago *B. tabaci* yang baru menjadi dewasa akan mengembangkan sayapnya selama lebih kurang 8-15 menit dan kemudian tubuh serangga mulai tertutup tepung lilin. Imago mempunyai antena tujuh ruas, ruas terakhir meruncing dan ditutupi oleh rambut-rambut halus. Lama hidup imago bervariasi tergantung pada keadaan lingkungan dan faktor-faktor lain. Lama hidup serangga jantan umumnya lebih pendek dibandingkan dengan serangga betina yaitu berkisar antara 9.54-17.20 hari, sedang yang betina dapat mencapai 37.75-74.20 hari. Menurut Kalshoven (1981) lama hidup imago lebih kurang hanya 6 hari.

Pruthi dan Samuel (1939) mengemukakan bahwa lama hidup kutu *Aleyrodidae* yang dipelihara pada tanaman sehat berbeda dengan yang dipelihara pada tanaman sakit yang terinfeksi virus. Pada tanaman sakit umur serangga tidak lebih dari 4 hari, sedang pada tanaman sehat serangga dapat hidup selama 6-10 hari.

Imago *B. tabaci* tampak lebih memilih tempat yang agak terlindung seperti pada permukaan bawah daun, dan serangga sangat aktif pada siang hari. Kopulasi terjadi lebih kurang dua jam setelah serangga menjadi dewasa, dan dapat berlangsung pada siang maupun malam hari. Hampir semua serangga betina dapat meletakkan telur setelah berumur 24 jam.

Pola dan Mekanisme Penularan Virus

Sumber infeksi utama untuk penularan virus krupuk tembakau berasal dari luar pertanaman tembakau (Thung, 1932). Pruthi dan Samuel (1942) menduga bahwa virus krupuk tembakau ditularkan ke pertanaman tembakau dari salah satu tanaman berikut yaitu *Ageratum conyzoides* L.,

Crotalaria juncea L., *Vernonia cinerea* Less., *Euphorbia hirta* L., *Launea asplenifolia* Hook., *Sida rhombifolia* L., tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Solanum nigrum* L., *Scoparia dulcis* L., dan *Zinnia elegans* Jacq. Van der Laan (1940, dalam Wolf *et al.*, 1949) mengemukakan pula bahwa *A. conyzoides*, *Eupatorium odoratum* L., *Stachytarpheta jamaicensis* Gardn., dan *Synedrella nodiflora* Gaertn. dapat menjadi sumber virus krupuk tembakau. Namun menurut Thung (1934) meskipun banyak spesies gulma di Jawa yang digunakan sebagai tanaman makanan oleh *B. tabaci*, tetapi hanya *A. conyzoides*, *S. nodiflora*, dan *V. cinerea* yang tersedia sebagai sumber inokulum untuk penularan virus ke pertanaman tembakau di lapang.

Virus krupuk tembakau umumnya lebih mudah ditularkan oleh *Bemisia* dari *C. juncea* dan *A. conyzoides* ke tembakau, dan jarang dari tembakau ke tembakau (Pruthi dan Samuel, 1939). Inokulasi kembali dari tembakau ke *C. juncea* sulit dilakukan, sedang *A. conyzoides* dengan mudah dapat terinfeksi. Virus krupuk tersebut juga lebih mudah ditularkan oleh *Bemisia* dari *C. juncea* ke *A. conyzoides* daripada sebaliknya. Menurut Storey (1935) meskipun kapas telah lebih dulu dikenal sebagai inang virus krupuk tembakau, tetapi virus tersebut ternyata tidak dapat ditularkan dari tembakau ke kapas atau sebaliknya.

Beberapa peneliti menganggap bahwa tanaman tembakau sakit di lapang bukan merupakan sumber infeksi yang penting untuk penularan virus krupuk ke tanaman tembakau sehat. Akan tetapi menurut Wolf *et al.* (1949) tidak hanya tanaman tembakau sakit, bahkan tanaman tomat yang terinfeksi pun mempunyai kapasitas sebagai sumber infeksi awal untuk penularan virus krupuk ke pertanaman tembakau. McClean (1940) dengan

menggunakan tanaman tembakau sakit sebagai sumber inkulum berhasil menularkan virus krupuk tembakau ke tanaman *D. stramonium*, *Helichrysum monstrosus* Hort., *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium* Mill., *Nicandra physaloides* Gaertn., *Petunia violacea* Lindl., *N. glutinosa*, *Physalis peruviana* L., dan *Z. elegans*.

Penularan virus tanaman oleh serangga Aleyrodidae umumnya menunjukkan bahwa (Costa, 1969) (1) virus tidak diperoleh secepat seperti virus-virus yang ditularkan secara mekanis oleh kutudaun, (2) efisiensi penularan dari vektor meningkat dengan periode akuisisi pada sumber virus yang lebih lama sampai beberapa jam, (3) periode inkubasi dalam tubuh vektor ada, tetapi relatif pendek, dan (4) virus bertahan dalam tubuh vektor selama beberapa hari sampai 20 hari, tetapi infektivitas serangga tidak terus menerus melainkan ada waktu-waktu tertentu serangga tidak infektif. Berdasarkan kenyataan tersebut maka timbul suatu anggapan bahwa hubungan virus-virus yang ditularkan oleh serangga Aleyrodidae tersebut dengan vektornya bersifat sirkulatif atau persisten.

Imago kutu Aleyrodidae adalah penghisap cairan floem. Capoor (1949) mengemukakan bahwa *B. tabaci* memerlukan lebih dari 15-30 menit untuk dapat mencapai floem, dan Varma (1952, dalam Costa, 1969) menduga bahwa dipuasakan lebih dulu sebelum periode akuisisi dapat mengurangi waktu yang diperlukan oleh serangga untuk mencapai floem. *B. tabaci* memerlukan periode akuisisi tertentu untuk memperoleh virus dari sumber virus dan menjadi infektif. Periode akuisisi terpendek *B. tabaci* untuk virus krupuk tembakau 5 jam, tetapi periode yang lebih pendek belum diuji. Varma (1963) mengemukakan bahwa kutu Aleyrodidae

biasanya memerlukan akuisisi yang lebih lama apabila dibandingkan dengan kutudaun.

Periode inokulasi virus oleh kutu Aleyrodidae ke dalam lokasi inang yang sesuai yang memungkinkan terjadinya infeksi yaitu dari 10 menit sampai 1-2 jam (Costa, 1969). Varma (1963) menyatakan bahwa umumnya kutu Aleyrodidae memerlukan waktu yang lebih pendek untuk menginfeksi tanaman daripada untuk memperoleh virus. Kenyataan tersebut sebagai suatu petunjuk bahwa akuisisi virus tergantung pada vektor untuk mencapai jaringan floem, sedang inokulasi virus ke dalam tanaman dapat terjadi pada jaringan-jaringan yang lain. Perbedaan waktu inokulasi dari 10 menit sampai 1 dan 2 jam pada spesies kutu Aleyrodidae yang sama untuk menularkan virus yang berbeda, menunjukkan bahwa ada faktor lain yang juga berpengaruh. Faktor tersebut antara lain jumlah serangga dan tempat makan serangga pada saat inokulasi.

Beberapa virus telah diketahui dapat ditularkan hanya dengan satu ekor *B. tabaci* termasuk diantaranya virus krupuk kapas (*cotton leaf curl*), virus krupuk tembakau, dan *tomato yellow leaf curl* (Kirkpatrick, 1931; Pruthi dan Samuel, 1939; Cohen dan Nitzany, 1966). Menurut Pruthi dan Samuel (1939) satu ekor *B. tabaci* mampu menularkan virus krupuk tembakau dari *A. conyzoides* sakit ke tembakau sehat dengan periode akuisisi 24 jam, tetapi apabila tembakau sakit yang digunakan sebagai sumber inokulum diperlukan dua ekor serangga dengan periode akuisisi 16 jam. Jumlah serangga yang lebih sedikit dari yang telah disebut belum pernah diuji. Bagaimanapun agar dapat diperoleh infeksi hampir mencapai 100% paling tidak diperlukan 10 ekor *B. tabaci* yang *viruliferous* per tanaman. Menurut Cohen dan Nitzany (1966) untuk

menghasilkan 100% penularan *tomato yellow leaf curl virus* diperlukan 15 ekor vektor per tanaman.

Wolf *et al.* (1949) melaporkan bahwa menurut beberapa peneliti tanaman tembakau pertama kali terlihat menunjukkan gejala krupuk pada saat 2-3 minggu setelah *B. tabaci* yang *viruliferous* disebarkan pada tanaman tembakau sehat, tetapi dari hasil pengujiannya Wolf *et al.* mendapatkan bahwa gejala mulai tampak setelah 12-33 hari dari saat inokulasi. Menurut Thung (1934) masa inkubasi virus krupuk tembakau berkisar antara 22-36 hari. Thung (1932) serta Pal dan Tandon (1937) melaporkan pula bahwa masa inkubasi virus krupuk tembakau tersebut lamanya 4 minggu apabila inokulasi dilakukan dengan penyambungan, dan bahkan dapat hanya 3 minggu apabila pada penyambungan tanaman sakit yang digunakan sebagai batang bawah.

Masa inkubasi virus krupuk tembakau dalam tanaman dipengaruhi oleh umur dan vigor tanaman (daun) pada saat tanaman terinfeksi, serta faktor lingkungan seperti suhu dan kelembaban. Tanaman tembakau paling rentan terhadap perkembangan penyakit krupuk jika infeksi terjadi saat tanaman berumur 8 minggu (Pruthi dan Samuel, 1939). Pada umur tanaman yang sama masa inkubasi akan minimum apabila infeksi terjadi pada suhu tinggi, dan menjadi maksimum apabila infeksi berlangsung pada suhu yang lebih rendah. Menurut Pal dan Tandon (1937) saat paling awal gejala krupuk mulai tampak yaitu pada saat stadia tanaman berdaun lima. Meskipun demikian tidak mungkin untuk membedakan berbagai gejala krupuk pada saat tersebut, karena gejala pada daun yang masih muda umumnya keriting (*crinkle*). Pada sekitar enam minggu setelah penanaman baru mungkin untuk membedakan berbagai gejala krupuk tembakau.

Tumbuhan Inang

Tumbuhan inang virus krupuk tembakau yang telah dilaporkan masih sangat sedikit. Pada penularan dengan vektor pengujian kisaran inang masih terbatas pada spesies-spesies dari famili Solanaceae, Compositae, dan Caprifoliaceae (Sugiura, Bandaranayake, dan Hemachandra, 1975 dalam Osaki dan Inouye, 1981). Namun demikian beberapa tanaman dari lima famili yang lain telah dilaporkan dapat terinfeksi secara alami yaitu *A. conyzoides*, *Carica papaya* L., *E. odoratum*, *E. hirta*, *Lonicera japonica* Thunb., *S. rhombifolia*, dan *V. cinerea* (Pruthi dan Samuel, 1942; Nariani, 1956; Osaki, Kobatake, dan Inouye, 1979 dalam Osaki dan Inouye, 1981).

B. tabaci sebagai vektor utama virus krupuk tembakau bersifat polifag, mempunyai kisaran inang yang sangat luas dan diketahui berkembang biak pada berbagai tanaman budidaya maupun gulma (Gameel, 1977; Kalshoven, 1981). Wolf *et al.* (1949) dan Gameel (1977) mencatat sejumlah tanaman dari sekitar 14-16 famili yang diketahui berperan sebagai inang *B. tabaci* (Tabel 1). Di antara tanaman-tanaman tersebut dilaporkan beberapa dapat menunjukkan gejala yang sama dengan gejala krupuk tembakau setelah dihinggap *B. tabaci*, sedang spesies tertentu lainnya tetap tanpa gejala. Meskipun demikian belum dapat dipastikan apakah semua spesies gulma dan tanaman budidaya seperti yang tercantum pada Tabel 1 tersebut dapat dinyatakan sebagai inang virus krupuk tembakau.

Pruthi dan Samuel (1939) melaporkan beberapa spesies gulma dan tanaman budidaya yang diamati senantiasa menunjukkan gejala krupuk

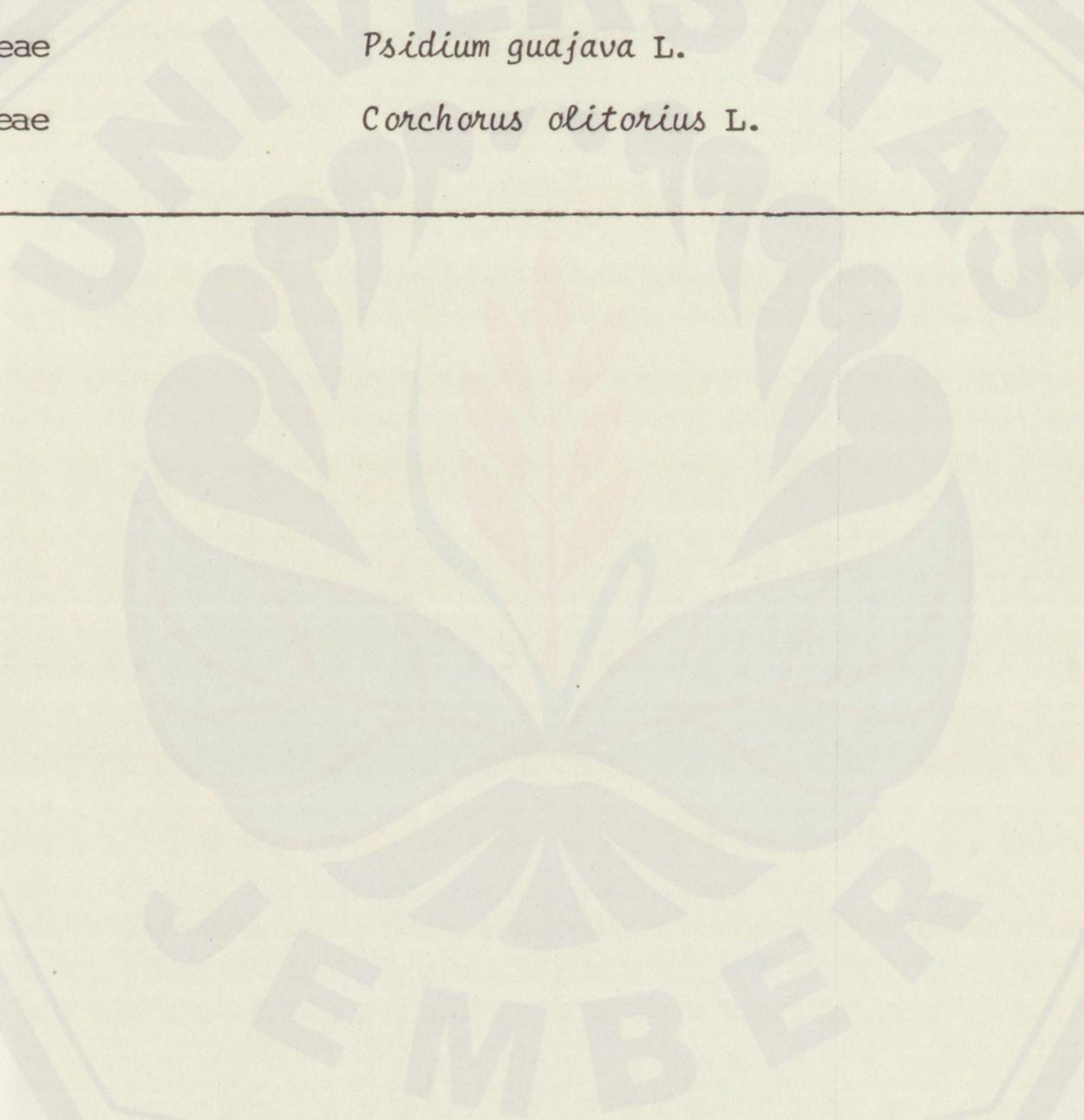
setelah dihinggap *B. tabaci* yaitu *Cucumis sativus* L., *Althea rosea* Cav., *Lagenaria vulgaris* Ser., *Petunia* sp., *L. esculentum*, *Phaseolus calcaratus* Roxb., *Z. elegans*, *S. dulcis*, *D. stramonium*, dan *S. rhombifolia*. Adapun spesies tanaman yang telah diuji melalui inokulasi buatan dan terbukti dapat menjadi inang virus krupuk tembakau ialah *A. conyzoides*, *C. juncea*, *S. nigrum*, *N. glutinosa*, *N. rustica* L., *L. esculentum*, *L. pimpinellifolium*, *P. violacea*, *H. monstrosus*, *N. physaloides*, *Z. elegans*, *P. peruviana*, *C. papaya*, *D. stramonium*, dan *Capsicum annuum* L. (Pal dan Tandon, 1937; Pruthi dan Samuel, 1939; McClean, 1940; Osaki dan Inouye, 1981).

Thung (1934) menekankan bahwa tumbuhan yang mempunyai potensi sebagai inang virus krupuk tembakau ialah *A. conyzoides*, *S. nodiflora*, *V. cinerea*, *C. sativus*, dan *M. utilissima*. Thung dan Hadiwidjaja (1953) juga mengamati adanya gejala menyerupai krupuk tembakau pada *C. anagyroides* dan *A. hypogaea*, tetapi juga belum dibuktikan apakah gejala pada kedua tanaman tersebut disebabkan oleh virus yang sama dengan virus krupuk tembakau.

Tabel 1. Tumbuhan Inang *B. tabaci* (Wolf et al., 1949; Gameel, 1977)

Famili	Spesies
Compositae	<i>Acanthospermum hispidum</i> D. C., <i>Ageratum conyzoides</i> L., <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Carthamus tinctorius</i> L., <i>Cosmos bipinnatus</i> Cav., <i>Eupatorium odoratum</i> L., <i>Helichrysum monstrosus</i> Hort., <i>Inula restita</i> Wall., <i>Launa asplenifolia</i> Hook., <i>Synedrella nodiflora</i> Gaertn., <i>Vernonia anthelmintica</i> Willd., <i>V. cinerea</i> Less., <i>V. hirta</i> L., <i>Zinnia elegans</i> Jacq.
Convolvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i> Poir.
Cruciferae	<i>Brassica napus</i> L., <i>B. oleracea</i> L., <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L., <i>B. rapa</i> L., <i>Raphanus sativus</i> L.
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i> L., <i>Lagenaria vulgaris</i> Ser., <i>Luffa aegyptica</i> Mill., <i>L. acutangula</i> Roxb., <i>Trichosanthes anguina</i> Lam.
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia hirta</i> L., <i>Phyllanthus niruri</i> L., <i>Manihot esculenta</i> Crantz.
Labiatae	<i>Anisomeles orata</i> R. Br., <i>Ocimum sanctum</i> L., <i>Moschosma polystachyum</i> Willd.
Leguminosae	<i>Arachis hypogaea</i> L., <i>Cajanus cajan</i> Spring., <i>Cicer arietinum</i> L., <i>Crotalaria juncea</i> L., <i>Phaseolus calcaratus</i> Roxb., <i>P. mungo</i> L., <i>P. radiatus</i> L., <i>Crotalaria striata</i> D. C., <i>Glycine hispida</i> Max.
Linaceae	<i>Linum usitatissimum</i> L.
Malvaceae	<i>Althea rosea</i> Cav., <i>Gossypium herbaceum</i> L., <i>Hibiscus cannabinus</i> L., <i>H. esculentus</i> L., <i>H. rosa-sinensis</i> L., <i>Sida carpinifolia</i> L., <i>S. cordifolia</i> L., <i>S. humulis</i> Cav., <i>S. rhombifolia</i> L., <i>S. veronicaefolia</i> Lam.
Pedaliaceae	<i>Sesamum indicum</i> L.
Scrophulariaceae	<i>Scoparia dulcis</i> L.
..... dilanjutkan

.....
Solanaceae		<i>Capsicum annuum</i> L., <i>Datura stramonium</i> L., <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., <i>L. pimpinellifolium</i> Mill., <i>Nicotiana tabacum</i> L., <i>N. rustica</i> L., <i>N. glutinosa</i> L., <i>Nicandra physaloides</i> Gaertn., <i>Petunia violacea</i> Lindl., <i>Physalis angulata</i> L., <i>P. peruviana</i> L., <i>P. minima</i> L., <i>Solanum melongena</i> L.
Urticaceae		<i>Cannabis sativa</i> L.
Verbenaceae		<i>Stachytarpheta jamaicensis</i> Gardn.
Myrtaceae		<i>Psidium guajava</i> L.
Tiliaceae		<i>Corchorus olitorius</i> L.



BAHAN DAN METODE

Penelitian yang dilakukan meliputi empat percobaan yaitu (1) pengamatan variasi gejala krupuk tembakau pada beberapa jenis inang, (2) penularan virus, (3) pengujian serologi, dan (4) mikroskopi virus. Dalam percobaan 1 dan 2 termasuk perbanyakan sumber inokulum, pemeliharaan dan perbanyakan vektor, serta serangkaian uji penularan virus dilakukan di rumah kaca Jurusan Hama dan penyakit Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor. Percobaan 3 dan 4 untuk pengujian serologi dan pengamatan nukleus sel jaringan yang terinfeksi dengan mikroskop cahaya (MC) dilakukan di laboratorium Virologi SubBalai Penelitian Hortikultura Se-gunung, Pacet, Cianjur, dan untuk pengamatan partikel virus dengan mikroskop elektron (ME) dilakukan di laboratorium Biologi Sel Balai Penelitian Tanaman Pangan, Bogor.

Penelitian dilakukan selama sekitar 26 bulan, yang dimulai sejak bulan Oktober 1985 sampai dengan Januari 1988.

Percobaan 1. Pengamatan Variasi Gejala Krupuk Tembakau

Bahan dan Metode Pengamatan

Variasi gejala yang diakibatkan oleh infeksi virus krupuk tembakau, diamati pada tanaman tembakau dan tumbuhan lain yang dapat terinfeksi.

Gejala pada Tanaman Tembakau. Pada tembakau gejala diamati pada tanaman yang terinfeksi virus krupuk tembakau di lapang dan yang terinfeksi dari hasil inokulasi buatan di rumah kaca. Contoh tanaman sakit dikumpulkan dari lokasi pertanaman tembakau cerutu milik petani di

desa Rambipuji, Wirolegi, dan Arjasa kabupaten Jember, Jawa Timur pada musim tanam tembakau tahun 1985 (Agustus/September-Nopember/Desember 1985) dan musim tanam tahun 1986 (Nopember/Desember 1986-Februari/Maret 1987).

Contoh tanaman sakit diperoleh dari pertanaman yang berumur sekitar 6-8 minggu setelah tanam. Pemilihan contoh tanaman sakit terutama didasarkan pada tanaman dengan kriteria gejala menurut Thung (1932) yaitu tanaman dengan gejala krupuk biasa, keriting, krupuk jernih. Selain ketiga gejala tersebut diamati pula kemungkinan adanya gejala lain yang menyerupai gejala krupuk tembakau.

Gejala yang dijumpai pada tanaman dicatat, tanaman dipisahkan berdasarkan gejala dan diuji melalui penularan secara penyambungan samping maupun dengan cara mekanis ke tanaman tembakau. Gejala yang timbul dari hasil inokulasi tersebut diamati dan dibandingkan dengan gejala dari tanaman semula yang digunakan sebagai sumber inokulum.

Gejala pada Inang Lain. Gejala diamati pada beberapa tanaman yaitu tomat, *Solanum khasianum* L., *N. glutinosa*, dan *A. conyzoides* yang terinfeksi dari hasil inokulasi secara penyambungan maupun melalui vektor dengan sumber inokulum tanaman tembakau yang menunjukkan gejala krupuk isolat-1. Tanaman untuk sumber inokulum tersebut dihasilkan melalui perbanyakan inokulum (lihat percobaan 2.).

Gejala pada setiap tanaman dicatat, dan dibandingkan dengan gejala krupuk pada tanaman tembakau yang digunakan sebagai inokulum.

Percobaan 2. Penularan Virus

Bahan dan Peralatan

Inokulasi virus krupuk tembakau dilakukan dengan penyambungan dan melalui serangga vektor. Bahan dan peralatan yang digunakan antara lain sumber inokulum, serangga vektor, tanaman uji yaitu tembakau (*N. tabacum*) varietas H₃₈₂, tomat (*L. esculentum*), kapas (*G. hirsutum*) cultivar Tamcot SP-37, terung panjang (*S. melongena*), *S. khasianum*, kacang tanah (*A. hypogaea*), kedelai (*Glycine max* Merr.), *N. glutinosa*, dan *A. conyzoides*, kurungan plastik milar, aspirator, parafilm-M, dan beberapa peralatan lain yang biasa digunakan untuk inokulasi.

Sumber inokulum yang digunakan ialah tanaman tembakau sakit dengan gejala krupuk isolat-1, yang diperoleh dari hasil perbanyakan inokulum. Perbanyakan inokulum dilakukan dengan menginokulasi tanaman tembakau sehat secara penyambungan, menggunakan sumber inokulum tanaman tembakau dengan gejala krupuk yang dicirikan sebagai gejala krupuk isolat-1 yang diperoleh dari lapang. Tanaman yang terinfeksi dari hasil inokulasi tersebut yang kemudian digunakan sebagai inokulum pada setiap uji penularan.

Serangga vektor yang diuji ialah tiga spesies serangga, dua spesies kutu Aleyrodidae dan satu spesies kutudaun *M. persicae* forma merah. Spesies kutu Aleyrodidae masing-masing diperoleh dari koloni tanaman kedelai dan dari koloni tanaman tembakau. Spesies yang berasal dari koloni tanaman kedelai oleh Badri (1983) telah diidentifikasi sebagai *B. tabaci* (untuk selanjutnya akan disebut dengan *Bemisia* kedelai). Imago *Bemisia* kedelai dikumpulkan dari pertanaman kedelai

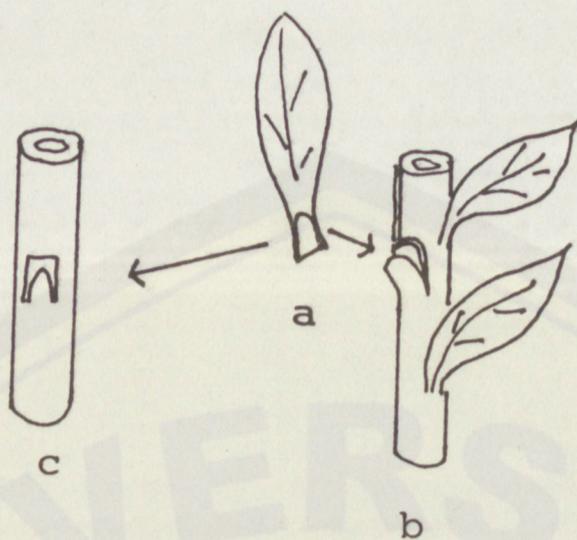
di rumah kaca bagian Entomologi Balittan, Bogor dan koloni yang berasal dari tanaman tembakau diperoleh dari pertanaman tembakau di kebun percobaan SubBalithor Segunung, Pacet, Cianjur. Imago *M. persicae* dikumpulkan dari pertanaman tembakau di daerah Jember, Jawa Timur. Yang digunakan sebagai vektor untuk penularan virus ialah keturunan dari imago serangga tersebut yang dihasilkan melalui pemeliharaan serangga.

Metode Percobaan

Inokulasi dengan Penyambungan. Bahan inokulum yang digunakan dalam penyambungan ialah daun tembakau sakit yang relatif masih muda dengan gejala yang jelas, berukuran sekitar 8-10 X 15-25 cm. Daun tua yang letaknya lebih di bawah yang biasanya kurang menunjukkan gejala, dan daun pucuk yang lebih muda serta terlalu kecil tidak digunakan.

Inokulasi dilakukan dengan membuat irisan tipis dan pipih pada bagian ujung petiola dari daun tanaman sakit, dan disisipkan ke dalam sayatan agak serong ke dalam yang dibuat pada bagian sisi batang tanaman sehat (Gambar 1). Bagian sambungan kemudian dibalut dengan menggunakan parafilm-M. Untuk menghindari banyaknya penguapan selama proses penyambungan, 2-3 daun paling bawah dari tanaman yang diinokulasi dipetik dan selama 3-4 hari tanaman dilindungi dari pengaruh cahaya matahari langsung. Setelah itu pelindung dibuka dan semua tanaman yang penyambungannya berhasil selama pertumbuhannya dipelihara di rumah kaca.

Semua tanaman uji ditanam dalam kantong plastik hitam (*polibag*) ukuran 20 X 30 cm sebanyak satu tanaman untuk setiap kantong. Inokulasi dilakukan pada saat umur tanaman antara 4-5 minggu setelah tanam untuk tembakau, 5-6 minggu setelah tanam untuk *N. glutinosa*, dan



Gambar 1. Penyambungan Samping. a. Irisan ujung petiola dari daun tanaman sakit. b. Sayatan pada bagian batang tanaman sehat (dari samping). c. Sayatan pada bagian batang (dari depan).

4-6 minggu setelah penyebaran benih untuk tanaman uji yang lain. Untuk tanaman uji selain tembakau, daun tanaman sakit yang digunakan sebagai inokulum dipilih yang ukurannya agak kecil disesuaikan dengan diameter batang setiap tanaman. Sebagai kontrol dengan cara yang sama dibuat pula penyambungan antara daun tembakau sehat dengan setiap tanaman yang diuji. Untuk setiap tanaman uji diinokulasi sebanyak 20-40 tanaman.

Untuk pemeliharaan tanaman selama pengujian diberikan pemupukan, penyiraman, dan perlindungan terhadap serangga maupun patogen yang sering berkembang di rumah kaca dengan pestisida seperti yang lazim dilakukan. Pemberian semprotan pestisida dilakukan selang 1-2 minggu sekali tergantung keadaan.

Pengamatan hasil inokulasi dilakukan setiap hari sampai timbul gejala. Keadaan yang diamati yaitu jumlah tanaman yang terinfeksi dari

setiap tanaman uji, masa inkubasi virus pada setiap tanaman uji, dan perbedaan gejala yang dihasilkan pada setiap tanaman uji yang terinfeksi.

Semua tanaman uji yang telah diinkulasi dengan atau tanpa gejala, diuji kembali dengan melakukan inokulasi kembali ke tanaman tembakau sehat. Untuk tanaman uji selain tembakau, inokulasi kembali juga dilakukan ke setiap jenis tanamannya sendiri. Sebagai kontrol penyambungan dilakukan dengan menggunakan daun tanaman yang sehat. Pada perlakuan ini dibuat sebanyak 5-10 penyambungan untuk setiap tanaman uji.

Inokulasi Melalui Vektor. Inokulasi virus dilakukan dengan menggunakan imago serangga bebas virus yang baru terbentuk, yang dihasilkan melalui pemeliharaan dan perbanyakkan serangga dalam kurungan di rumah kaca. Untuk keperluan tersebut *Bemisia* kedelai dipelihara pada tanaman kapas sehat umur 4-6 minggu setelah sebar, dan koloni kutu Aleyrodidae asal tembakau serta *M. persicae* dipelihara pada tanaman tembakau sehat umur 8-10 minggu setelah sebar.

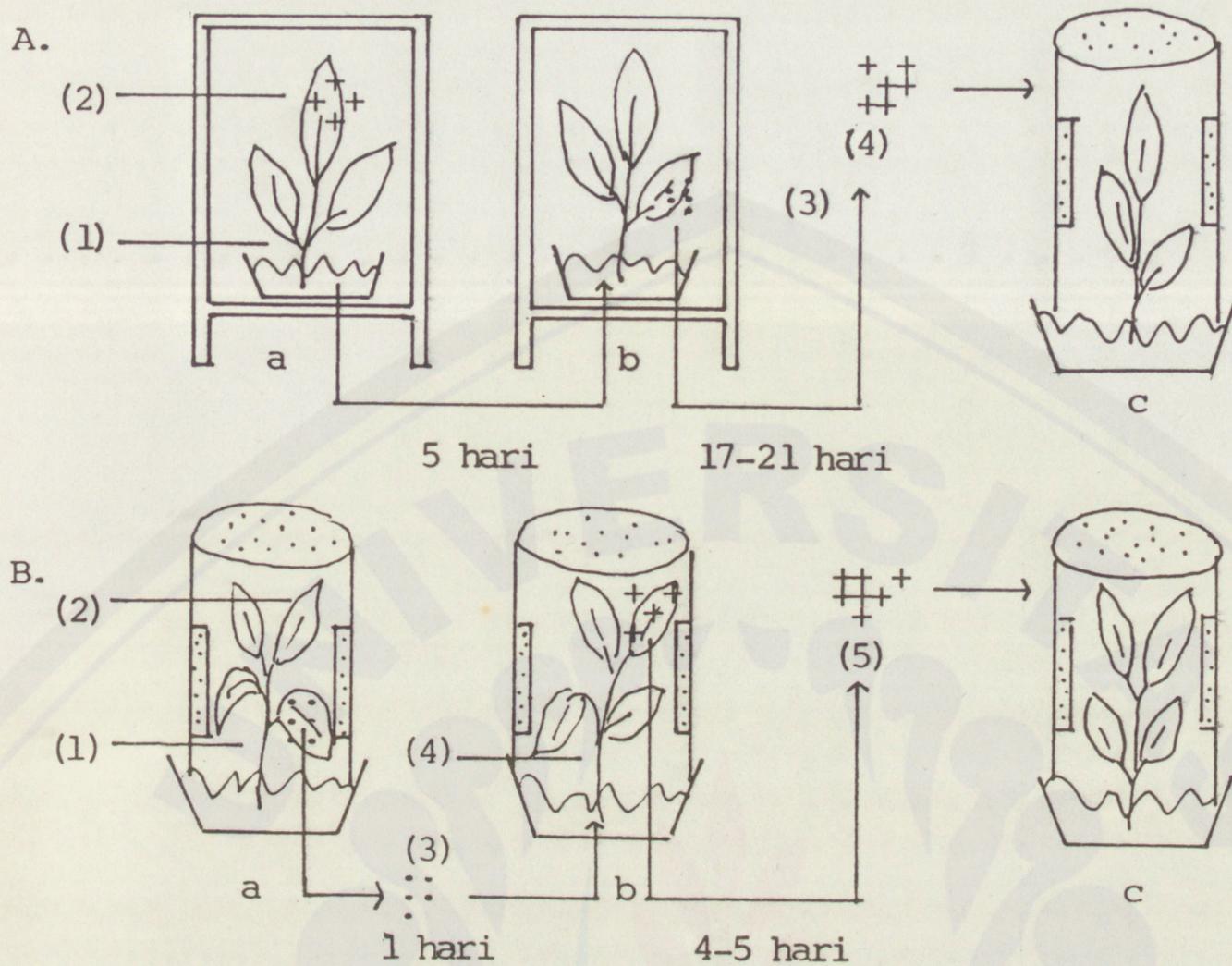
Sebanyak 25-50 pasang imago masing-masing spesies kutu Aleyrodidae tersebut diberi kesempatan meletakkan telur pada tanaman inang di dalam kurungan serangga (a) selama 5 hari. Kemudian tanaman yang diperkirakan telah mengandung sejumlah telur serangga, dipindahkan dari kurungan (a) ke kurungan (b) tanpa diikuti serangganya dan ke dalam kurungan (a) dimasukkan lagi tanaman inang yang baru. Setelah 17-21 hari sejak infestasi serangga ke dalam kurungan (a), pada kurungan (b) telah terbentuk imago yang baru. Imago yang baru terbentuk tersebut merupakan imago yang bebas virus, yang kemudian digunakan sebagai vektor. Demikian setiap kali selang 5 hari dilakukan pemindahan tanaman inang

yang telah diinfestasi dengan serangga, sehingga senantiasa dihasilkan imago-imago yang baru.

Untuk memperbanyak kutudaun *M. persicae*, sebanyak 10-20 kutudaun tanpa sayap dipindahkan ke tanaman tembakau sehat sebagai inang dan tanaman dikurung dengan kurungan plastik milar selama satu hari. Pada hari berikutnya telah diperoleh sejumlah kutudaun yang baru lahir, dan ini dipindahkan ke tanaman dalam kurungan yang lain. Empat atau lima hari setelah pemindahan tersebut imago yang baru telah terbentuk, dan ini yang digunakan sebagai vektor. Bagan cara pemeliharaan dan perbanyak serangga vektor terlihat pada Gambar 2.

Inokulasi virus dilakukan dengan mula-mula memberi kesempatan sejumlah individu serangga bebas virus untuk akuisisi selama 24 jam pada tanaman sakit sebagai sumber inokulum. Pada hari berikutnya sejumlah tertentu serangga tersebut yang diperlukan untuk inokulasi dipindahkan ke tanaman sehat yang diuji, dan dibiarkan selama 24 jam untuk inokulasi virus. Setelah itu serangga dimatikan satu per satu dan tanaman disemprot dengan insektisida. Tanaman yang telah diinokulasi tersebut selanjutnya dipelihara di rumah kaca. Pada inokulasi ini pemindahan kutu Aleyrodidae dilakukan dengan aspirator, dan untuk *M. persicae* dengan kuas nomer 1. Bagan cara inokulasi virus melalui vektor tersebut terlihat pada Gambar 3.

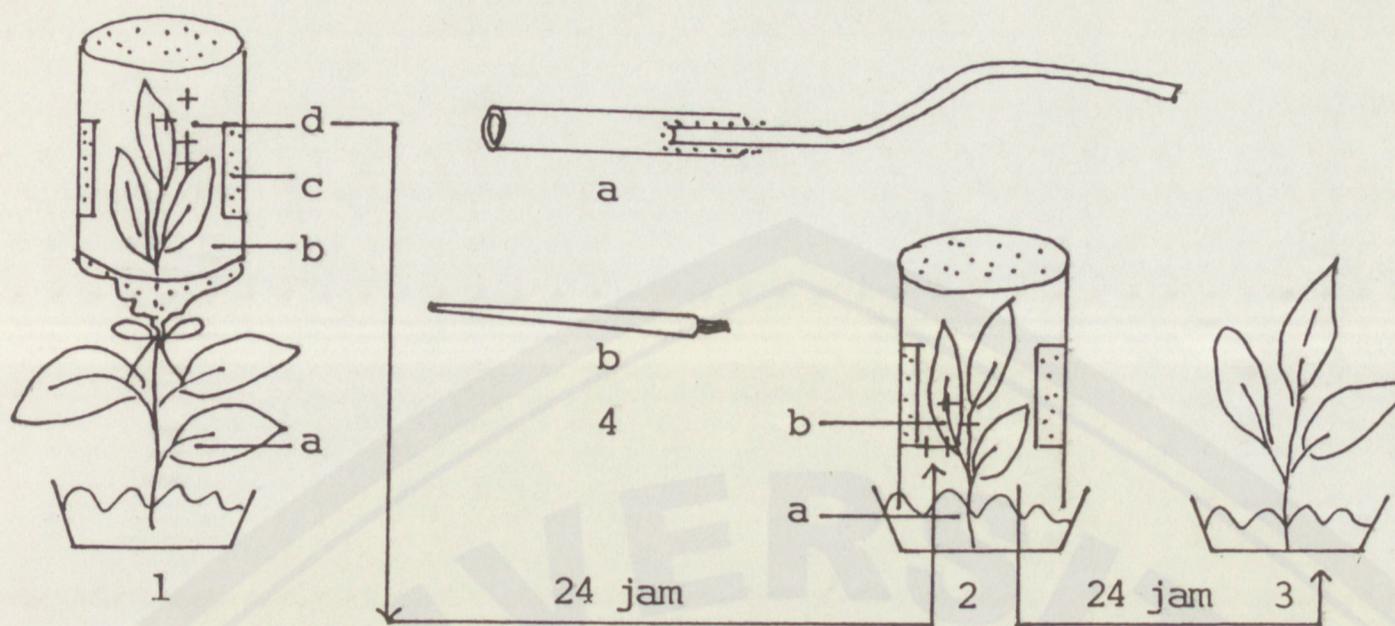
Inokulasi virus krupuk tembakau melalui vektor dilakukan untuk mempelajari (1) pengaruh jenis serangga vektor, (2) pengaruh jumlah serangga per tanaman yang digunakan untuk inokulasi, (3) penularan virus pada beberapa jenis tanaman, dan (4) pengaruh jenis tanaman inang virus sebagai sumber inokulum untuk penularan.



Gambar 2. Pemeliharaan dan Perbanyakkan Serangga.
 A. Kutu Aleyrodidae dan B. *M. persicae*.
 A. a. Berisi tanaman inang sehat (1) dan imago serangga (2); b. Berisi (1) yang telah mengandung telur serangga (3) dan imago bebas virus yang dihasilkan (4); c. Berisi tanaman sakit untuk akuisisi virus.
 B. a. Berisi tanaman inang sehat (1) dan imago serangga (2); b. Berisi keturunan serangga (3), tanaman sehat yang baru (4), dan imago bebas virus yang dihasilkan (5); c. Berisi tanaman sakit untuk akuisisi virus.

Pengaruh Jenis Serangga Vektor

Untuk menguji pengaruh jenis serangga vektor terhadap inokulasi, tiga spesies serangga yang digunakan ialah kutu Aleyrodidae tembakau, *Bemisia kedelai*, dan *M. persicae* masing-masing diberi kesempatan untuk



Gambar 3. Inokulasi Virus Krupuk Tembakau Melalui Vektor. 1. Akuisisi virus: a. Tanaman sakit; b. Kurungan plastik milar; c. Ventilasi; d. Serangga vektor. 2. Inokulasi virus: a. Tanaman sehat yang diinokulasi; b. Serangga (d) yang telah infeksi. 3. Tanaman yang telah diinokulasi. 4. Alat pemindah serangga: a. Aspirator dari selang plastik; b. Kuas gambar nomer 1.

akuisisi virus pada tanaman tembakau sakit sebagai sumber inkulum. Serangga yang telah mengisap virus pada tanaman sakit tersebut, kemudian dipindahkan ke tanaman tembakau sehat yang diinokulasi. Inokulasi dilakukan pada tanaman yang berumur 7-8 minggu setelah penyebaran benih. Untuk setiap tanaman digunakan 10 ekor serangga dari setiap spesies dengan lama akuisisi dan inokulasi virus masing-masing 24 jam.

Pada setiap perlakuan digunakan 15-20 tanaman. Sebagai kontrol tanaman tembakau diinokulasi dengan setiap spesies serangga yang bebas virus, yaitu serangga yang pada saat akuisisi dikurung pada tanaman sehat. Pengamatan dilakukan terhadap spesies serangga yang berhasil digunakan sebagai vektor, jumlah tanaman yang terinfeksi dari setiap inokulasi, dan masa inkubasi virus dalam tanaman.

Pengaruh Jumlah Serangga per Tanaman Untuk Inokulasi

Pada pengujian ini spesies serangga yang berhasil menularkan virus dengan jumlah 10 ekor per tanaman, diuji kembali dengan jumlah serangga yang berbeda untuk setiap tanaman. Untuk keperluan tersebut digunakan 1, 2, 3, 5, 10, 20, dan 50 ekor per tanaman. Spesies serangga yang tidak berhasil menularkan virus dengan jumlah 10 ekor per tanaman, juga diuji kembali tetapi dengan jumlah serangga yang lebih banyak ialah 10, 20, dan 50 ekor per tanaman.

Periode akuisisi dan inokulasi virus masing-masing selama 24 jam. Untuk setiap perlakuan diinokulasi sebanyak 10-20 tanaman tembakau, dan sebagai kontrol tanaman diinfestasi dengan serangga bebas virus dengan jumlah yang sama untuk setiap perlakuan. Hasil inokulasi diamati setiap hari sampai timbul gejala, dan diamati jumlah tanaman yang terinfeksi pada setiap perlakuan, jumlah minimum serangga per tanaman yang efektif untuk inokulasi, dan masa inkubasi virus dalam tanaman.

Penularan Virus pada Beberapa Jenis Tanaman

Beberapa jenis tanaman yang telah digunakan pada inokulasi virus krupuk tembakau dengan penyambungan yaitu kapas, tomat, *S. khasianum*, terung panjang, kacang tanah, kedelai, *N. glutinosa* dan *A. conyzoides* diuji reaksinya terhadap infeksi virus dengan inokulasi melalui vektor, dan tanaman tembakau digunakan sebagai pembanding. Spesies serangga yang digunakan ialah yang dapat digunakan untuk menularkan virus krupuk tembakau, dan untuk setiap tanaman digunakan 20 ekor serangga. Periode akuisisi dan inokulasi virus masing-masing 24 jam.

Sebagai sumber inokulum ialah tanaman tembakau sakit dengan gejala krupuk isolat-1. Untuk setiap tanaman diinokulasi sebanyak

10-20 tanaman, dan 10 tanaman untuk kontrol. Pengamatan ditujukan terhadap jenis-jenis tanaman yang dapat terinfeksi, jumlah tanaman yang terinfeksi, dan masa inkubasi virus pada setiap jenis tanaman yang dapat terinfeksi.

Pengaruh Jenis Tanaman Inang Virus Sebagai Sumber Inokulum

Pada pengujian ini beberapa jenis tanaman yaitu tomat, *S. khasianum*, dan *A. conyzoides* yang dari hasil inokulasi menunjukkan dapat menjadi tanaman inang virus krupuk tembakau, diuji potensinya sebagai sumber inokulum untuk penularan virus. Melalui tanaman tersebut virus krupuk tembakau ditularkan ke tanaman tembakau, dan tanaman tembakau sakit dengan gejala krupuk isolat-1 digunakan sebagai pembanding.

Inokulasi virus dilakukan melalui serangga vektor, dan spesies serangga yang digunakan ialah yang dapat digunakan untuk menularkan virus krupuk tembakau. Jumlah serangga yang digunakan sebanyak 1, 2, 3, 5, dan 20 ekor per tanaman, dengan periode akuisisi dan inokulasi virus masing-masing 24 jam. Pada setiap perlakuan digunakan 10-20 tanaman, dan untuk kontrol tanaman tembakau sehat diinfestasi dengan serangga bebas virus. Pada pengujian ini diamati jumlah tanaman yang terinfeksi pada setiap perlakuan dan masa inkubasi virus dalam tanaman.

Percobaan 3. Pengujian Serologi

Bahan dan Peralatan

Bahan untuk pengujian serologi antara lain suspensi virus krupuk tembakau "murni-sebagian", antiserum virus krupuk tembakau, ekstrak tanaman tembakau yang terinfeksi dengan gejala krupuk isolat-1, ekstrak

tanaman tomat, *S. khasianum*, *A. conyzoides* yang telah diinokulasi dengan virus krupuk tembakau, kelinci, beberapa bahan kimia antara lain larutan penyangga Borat, penyangga Tris, penyangga K-fosfat, *Phosphate buffer saline* (PBS), *Phosphate buffer saline Tween-20* (PBST), *coating buffer*, *enzyme buffer*, *substrate buffer*, *P-nitrophenyl phosphate*, *adjuvant*, *2-mercaptoethanol*, *n-butanol*, dan *conjugate Goat anti-Rabbit IgG alkaline Phosphatase* (Sigma No. A-8025).

Beberapa peralatan yang digunakan ialah *superspeed refrigerated centrifuge* RC-5-Sorvall, *angular rotor* tipe SS-34, blender, almari es, almari pendingin, pengocok magnetik, *homogenizer*, inkubator, mikroskop cahaya fase kontras, pipet mikro, jarum suntik 1 ml, cawan petri plastik ($\varnothing = 13$ cm), pelubang agar, satu set lempeng plastik (*perspex*), plat mikrotiter dari *polystyrene* dengan 96 lubang (*Microelisa substrate plate*, Dynatch, Labs., Inc., 900 Staters Lane Va 22314), spektrofotometer-Hitachi model 101, dan *Elia reader*-Fisher Scientific Company.

Metode Percobaan

Pada pengujian serologi digunakan suspensi virus "murni-sebagian", yang diperoleh melalui pemurnian virus dengan metode Osaki dan Inouye (1978) yang dimodifikasi (Lampiran 1). Sebelum digunakan suspensi virus tersebut diuji lebih dulu dengan mengukur nilai absorbansi (A) larutan pada kisaran panjang gelombang (λ) antara 230-325 nm, menggunakan spektrofotometer.

Antiserum (AS) virus diperoleh dengan cara mengimunitasi seekor kelinci dengan suspensi virus melalui kombinasi suntikan *intravenous* dan *intramuscular* (Matthews, 1957; Ball, 1964 dalam Noordam, 1973).

Suntikan *intravenous* diberikan sebanyak dua kali dengan selang empat hari, menggunakan campuran suspensi virus (V) dan Freund's *adjuvant complete* (1:1) masing-masing sebanyak 0.4 ml dan 0.6 ml. Suntikan *intramuscular* diberikan dua minggu kemudian dengan campuran yang sama sebanyak 1 ml. Sebelum imunisasi lebih dulu diambil darah kelinci sehat untuk mendapatkan serum darah yang normal. Pengambilan darah setelah imunisasi dilakukan pada saat satu, dua, dan empat minggu setelah suntikan terakhir, dan antiserum yang diperoleh masing-masing disebut AS₁, AS₂, dan AS₃. Antiserum dipisahkan dari plasma darah setelah lebih dulu disimpan dalam almari es selama satu malam, dan selanjutnya disentrifus dengan kecepatan rendah (9 000 rpm) selama 30 menit (Noordam, 1973). Selama penyimpanan ke dalam setiap AS ditambahkan natrium azid (NaN₃) sampai konsentrasi akhir 0.01%, untuk menghindari kontaminasi dengan mikroorganisme.

Sebelum digunakan AS dibebaskan lebih dulu dari kemungkinan adanya antibodi dari bahan tanaman di dalam AS tersebut, dengan mengabsorpsi AS menggunakan protein tanaman sehat menurut metode Lommel, MC. Cain, dan Morris (1982) (Lampiran 2). Dalam pengujian ini digunakan AS (a) yaitu yang telah diabsorpsi oleh protein tanaman sehat, dan AS (ta) yang tidak diabsorpsi sebagai pembanding. Antigenisitas virus diuji dengan menentukan titer AS dan mengamati reaksi AS terhadap cairan perasan tanaman tembakau, tomat, *S. khasianum*, dan *A. conyzoides* sakit yang terinfeksi virus krupuk tembakau.

Titer AS ditentukan melalui metode uji *micro-precipitin* dengan tetesan di antara dua lempeng plastik (Noordam, dalam Noordam, 1973), Ouchterlony (van Slogteren, 1955 dalam Noordam, 1973, dan metode

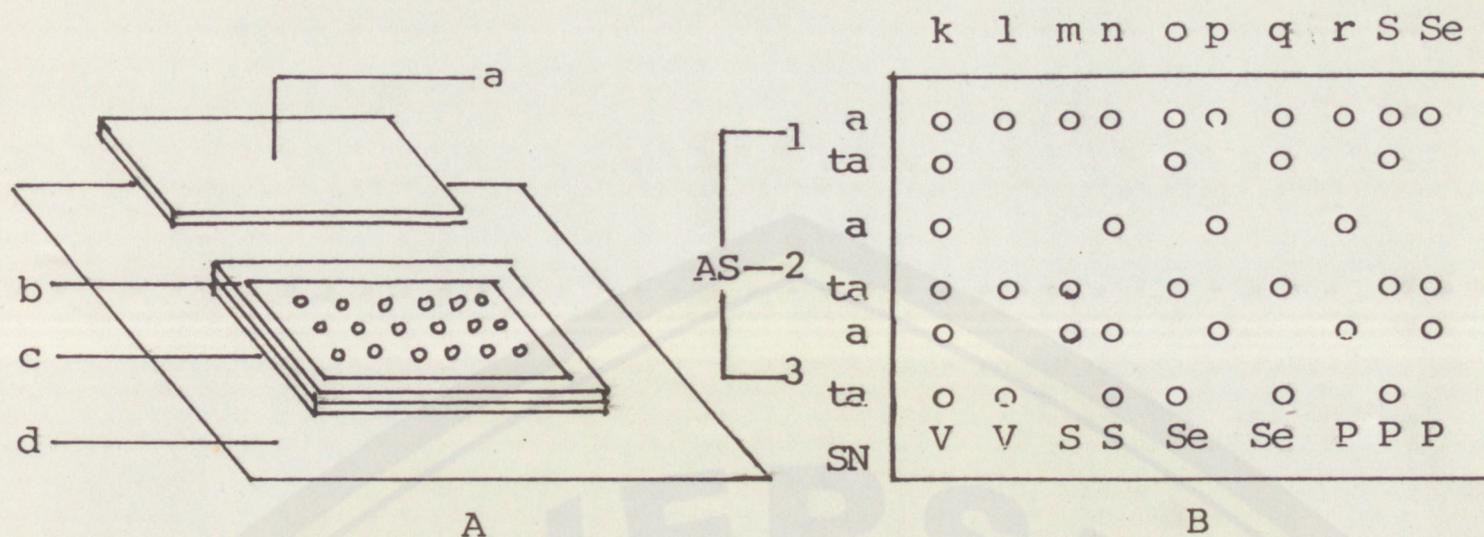
Indirect-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (I-ELISA) (Clark dan Adams, 1977; Voller, Bidwell, dan Bartlett, 1979). Reaksi AS terhadap beberapa cairan perasan tanaman yang terinfeksi virus krupuk tembakau, diamati melalui *I-ELISA* dan uji Ouchterlony.

Penentuan Titer

Uji Micro-precipitin. Sederet pengenceran AS dalam 0.01 M penyangga Tris pH. 7.6 (mengandung 0.85% NaCl dan 0.01% NaN_3) dengan konsentrasi 1/8, 1/16, 1/32,, dan 1/1024 masing-masing direaksikan dengan suspensi virus "murni-sebagian" (V) pada konsentrasi 1/10. Dengan menggunakan pipet mikro 10 ul tetesan kedua reaktan tersebut dicampur di atas lempeng plastik optik yang digunakan untuk uji *micro-precipitin* (Gambar 4). Sebagai kontrol AS direaksikan dengan cairan perasan tanaman sehat (Se), dan untuk perbandingan serum normal (SN) direaksikan dengan V. Letak tetesan reaksi seperti terlihat pada Gambar 4.

Hasil reaksi berupa terbentuknya endapan putih diamati setelah inkubasi selama satu malam, menggunakan mikroskop cahaya latar belakang gelap dengan pembesaran 100 kali. Intensitas reaksi dibedakan menurut kriteria tidak ada endapan (-), endapan sedikit (+), endapan sedang (++) , endapan banyak (+++), endapan sangat banyak (++++), dan endapan tidak jelas (x).

Uji Ouchterlony. Dalam pengujian ini sederet konsentrasi AS (1/6, 1/12, 1/24,, dan 1/32) masing-masing direaksikan dengan antigen pada konsentrasi 1/10, dalam lubang-lubang yang dibuat pada agar 1% dalam penyangga Tris. Sebagai antigen digunakan V maupun cairan perasan tanaman tembakau sakit (S), dan untuk kontrol AS direaksikan dengan Se. Setiap lubang diisi dengan suspensi reaktan sebanyak 50 ul

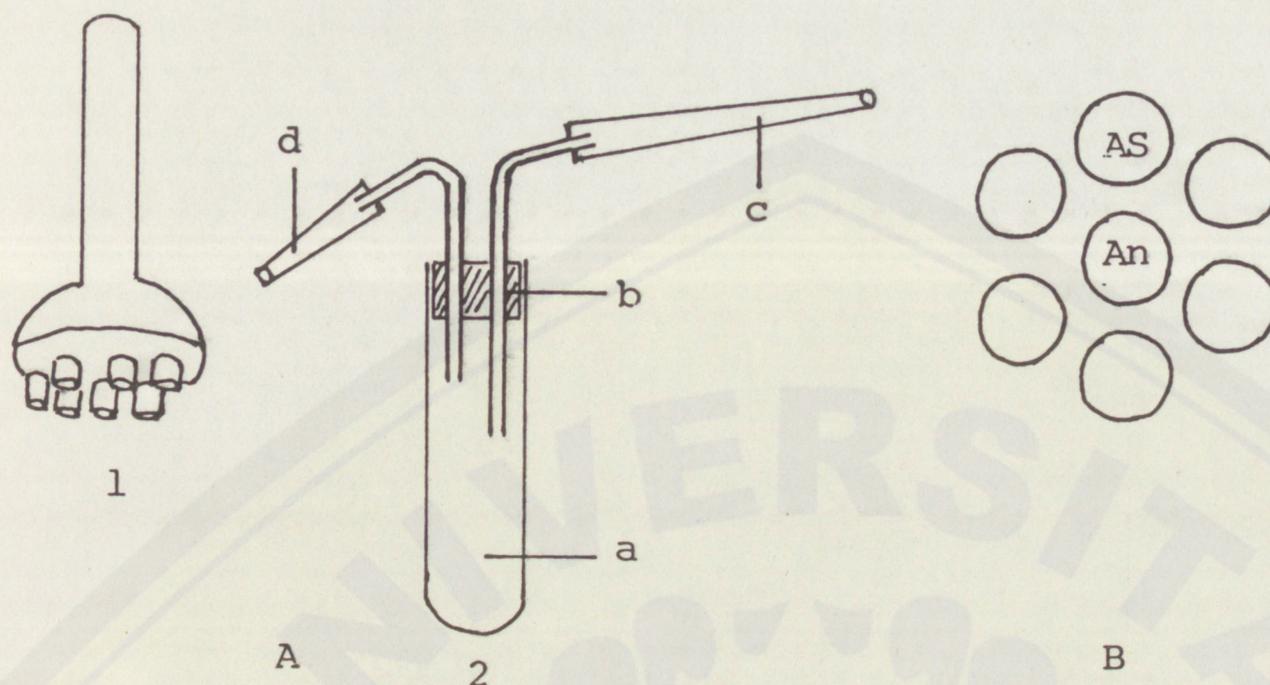


Gambar 4. A. Lempeng Plastik Optik Untuk Uji *Micro-precipitin*. a. Lempeng tutup tebal 5 mm; b. Lempeng bingkai tebal 1 mm; c. Lempeng dasar tebal 6 mm (ukuran lempeng 90 X 120 mm); d. Kertas grafik untuk pola tetesan berisi 7 X 10 titik. B. Letak tetesan. AS (1, 2, 3). Antiserum yang diuji; a. Diabsorbsi; ta. Tidak diabsorbsi; SN. Serum normal; k-r. Konsentrasi AS dari 1/8-1/1024; S. Cairan perasan tanaman sakit; Se. Cairan perasan tanaman sehat; V. Suspensi virus; P. Larutan penyangga.

menurut letak masing-masing sesuai dengan pola yang telah ditentukan (Gambar 5).

Pada pengujian ini hanya digunakan AS₁ dan AS₂. Bentuk dan letak garis endapan yang terjadi sebagai hasil reaksi diamati 2-4 hari setelah inkubasi.

Indirect-ELISA. Sederet pengenceran AS dalam *enzyme buffer* pada konsentrasi 1/8, 1/16, 1/32,, dan 1/4096 masing-masing direaksikan dengan V yang dilarutkan dalam *coating buffer* pada konsentrasi 1/10. Sebagai kontrol AS pada konsentrasi yang sama direaksikan pula dengan Se pada konsentrasi 1/10 dalam *coating buffer*. Antiserum yang digunakan pada pengujian ini AS₁ dan AS₂ yang telah diabsorbsi oleh protein tanaman sehat. Sebagai *conjugate* digunakan *Goat anti-Rabbit IgG alkaline phosphatase* 10⁻³ dalam *enzyme buffer*, dan sebagai



Gambar 5. A. 1. Pelubang agar; 2. Penghisap potongan agar terdiri dari tabung hampa (a); Sekat karet (b); Selang penghisap (c); Pipet kecil (d).
 B. Pola tetesan pada agar (uji Ouchterlony);
 An. Lubang tengah, letak antigen; AS. Lubang di sekeliling lubang tengah, letak antiserum (konsentrasi AS mulai dari lubang bertanda AS searah jarum jam, untuk a: $1/6$, $1/12$, $1/24$,, $1/192$ dan untuk ta: $1/1$, $1/2$, $1/4$,, $1/32$).

substrat ialah 1 mg/ml *P-nitrophenyl phosphate* dalam *substrate buffer*.

Reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 M NaOH .

Pengujian dilakukan dengan menggunakan plat mikrotiter, dengan susunan letak perlakuan dalam lubang plat sesuai dengan pola yang telah ditentukan (Gambar 6). Tahap-tahap perlakuan pada pengujian ini mengikuti metode Clark dan Adams (1977) dan Voller *et al.* (1979) yang dimodifikasi (Lampiran 3). Hasil reaksi diamati secara visual melalui perubahan warna larutan, dan pembacaan nilai A larutan pada $\lambda = 405 \text{ nm}$ dengan *Elia reader*. Secara visual reaksi dinyatakan positif apabila warna larutan berubah menjadi kuning dan apabila berdasarkan nilai A,

reaksi baru dinyatakan positif jika nilai A contoh \gg 2 kali nilai A kontrol (Voller *et al.*, 1979).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
B	X	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048	1/4096	X
C	X	1/8			1/64			1/512			1/4096	X
D	X											X
E	X											X
F	X	1/8		1/32		1/128			1/1024		1/4096	X
G	X	1/8			1/64		1/256			1/2048	1/4096	X
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Gambar 6. Susunan Letak Perlakuan dalam Lubang Plat Mikrotiter pada *Indirect ELISA*. X. Lubang kosong; B (2-11). AS₂ (1/8-1/4096) + V (1/10); C (2-11). AS₁ (1/8-1/4096) + V (1/10); F (2-11). AS₂ (1/8-1/4096) + Se (1/10); G (2-11). AS₁ (1/8-1/4096) + Se (1/10); D dan E (2-11). Digunakan untuk reaksi AS terhadap cairan perasan beberapa tanaman sakit; A (1). AS₂ + V (1/1).

Reaksi AS terhadap Beberapa Cairan Perasan Tanaman Sakit

Cairan perasan beberapa tanaman sakit yang terinfeksi virus krupuk tembakau (tembakau, tomat, *S. khasianum*, dan *A. conyzoides*) diuji terhadap AS virus krupuk tembakau dengan metode *I-ELISA* dan Ouchterlony. Antiserum yang digunakan ialah AS₂ yang (a) maupun (ta) untuk uji Ouchterlony, dan hanya yang (a) untuk *I-ELISA*. Konsentrasi AS dan cairan perasan tanaman masing-masing 1/8 dan 1/1 untuk uji Ouchterlony serta 1/50 dan 1/10 untuk *I-ELISA*.

Pada konsentrasi yang sama, reaksi AS dengan cairan perasan tanaman sehat dari setiap tanaman yang diuji digunakan sebagai kontrol.

Pada uji Ouchterlony digunakan pula pembandingan yaitu reaksi antara AS dengan V.

Percobaan 4. Mikroskopi Virus

Bahan dan Peralatan

Bahan yang digunakan untuk pengamatan virus dengan mikroskop antara lain ialah jaringan tanaman tembakau yang terinfeksi virus krupuk tembakau, jaringan tanaman tembakau sehat, suspensi virus krupuk tembakau "murni-sebagian" (V), antiserum virus krupuk tembakau (AS), serta beberapa bahan kimia seperti zat warna Azure-A 0.1%, 2-methoxyethanol, asam fosfotungstat (PTA), uranil asetat (UA), penyangga Tris, penyangga fosfat, glutaraldehid 3%, osmium tetroksida 1%, aseton, dan epon.

Beberapa peralatan untuk pengamatan digunakan mikroskop cahaya biasa (MC), mikroskop elektron (ME) model Hitachi HS-9, dan seperangkat peralatan untuk pengamatan dengan ME.

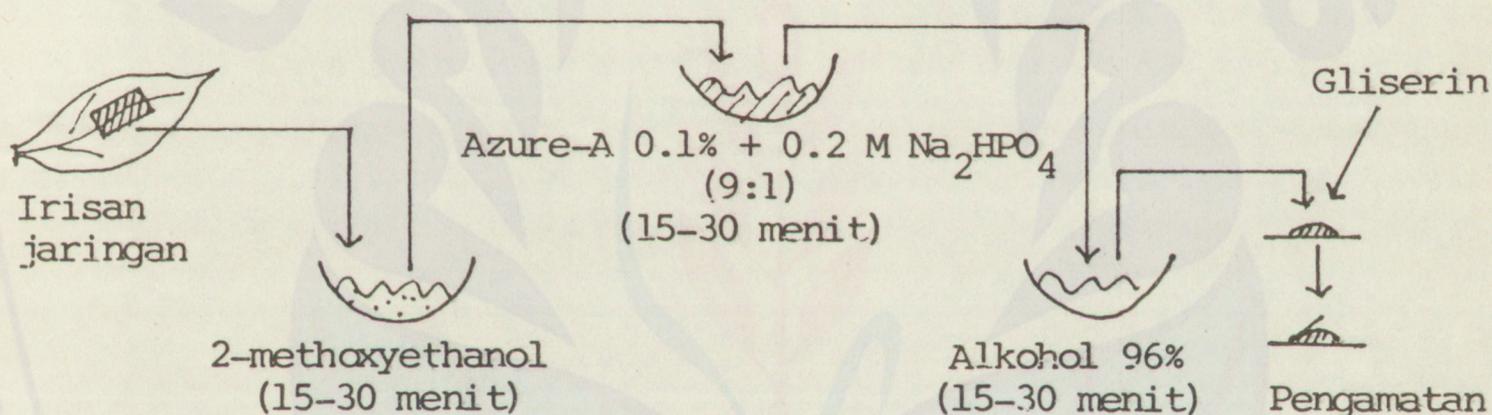
Metode Percobaan

Pengamatan dengan Mikroskop Cahaya (MC)

Pengamatan ini untuk mengetahui bentuk dan ukuran nukleus, serta kemungkinan adanya pembentukan badan inklusi di dalam nukleus sel jaringan floem tanaman yang terinfeksi. Tanaman yang diperiksa adalah yang terinfeksi virus krupuk tembakau dengan gejala krupuk isolat-1, terinfeksi virus krupuk tembakau dengan gejala krupuk isolat-1 yang disertai penebalan merata pada tempat-tempat tertentu sepanjang tulang-tulang daun lateral (selanjutnya disebut dengan krupuk isolat-2),

dan tanaman yang sehat sebagai kontrol.

Preparat mikroskop disiapkan dengan cara membuat irisan tipis jaringan tulang daun dan diwarnai dengan zat warna Azure-A 0.1% menurut metode Christie dan Edwarsen (1986) dan Christie, Falk, Hielbert, Lastra, Bird, dan Kim (1986) yang prinsipnya seperti digambarkan pada Gambar 7. Pengamatan dengan pembesaran 1 000 kali menggunakan minyak emersi. Pada pengamatan diamati sejumlah 50 nukleus sel untuk setiap contoh jaringan tanaman yang diperiksa, dan untuk membandingkan perbedaan ukuran nukleus sel dari ketiga contoh tersebut digunakan rancangan acak lengkap.



Gambar 7. Pembuatan Preparat Nukleus Sel dengan Pewarnaan Azure-A.

Pengamatan dengan Mikroskop Elektron (ME)

Pengamatan dengan ME dimaksudkan untuk mendapatkan partikel virus krupuk tembakau di dalam jaringan tanaman yang terinfeksi. Pengamatan tersebut dilakukan melalui beberapa metode yaitu metode celup, irisan halus, dan *Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)*. Pengamatan dengan menggunakan pembesaran 20 000-30 000 kali.

Metode Celup. Preparat ME dibuat dengan menggunakan lempeng grid ($\emptyset = 3$ mm) yang telah dilapisi Carbon. Untuk keperluan tersebut

permukaan bidang irisan jaringan tanaman yang terinfeksi virus dice-
lupkan beberapa kali pada tetesan zat warna PTA 0.1% atau UA 2% pada
grid, atau dengan menggunakan larutan virus (dari cairan perasan ta-
naman yang terinfeksi atau suspensi virus "murni-sebagian") yang di-
teteskan pada grid dan pada tetesan tersebut ditambahkan tetesan PTA
atau UA. Setelah tetesan kering grid diamati.

Metode Irisan Halus. Pembuatan preparat untuk pengamatan ME de-
ngan metode irisan halus dilakukan melalui proses fisaksi, dehidrasi,
embedding, pengirisan, pewarnaan, dan pengamatan (Juniper, Cox, Gi-
khrist, dan Williams, 1970; Milne, 1972). Fiksasi jaringan tanaman
yang terinfeksi virus krupuk tembakau dengan larutan glutaraldehid 3%
dan osmium tetraoksida pada suhu 4°C berturut-turut masing-masing se-
lama 1 dan 2 jam. Pencucian jaringan setelah fisaksi menggunakan
0.1 M penyangga fosfat. Dehidrasi menggunakan seri aseton 30, 50, 70,
85, 95, dan 100% masing-masing selama 10 menit serta selama 30 menit
dalam aseton 100%.

Embedding dilakukan dengan perendaman jaringan dalam campuran
aseton dan epon 3:1, 1:1, dan 1:3 secara berturut-turut dengan dikocok
selama 30, 60, dan 90 menit untuk setiap tahap perendaman. Kemudian
dikocok lagi selama satu malam dengan menggunakan epon yang baru, dan
hari berikutnya diganti lagi dengan epon baru serta disimpan dalam ek-
sikator pada suhu 4°C selama 24 jam. Kemudian dibuat cetakan epon dan
disimpan dalam inkubator berturut-turut selama 24 jam pada suhu 40°C
dan selama 48 jam pada suhu 60°C. Setelah cetakan ditrim, dengan meng-
gunakan ultra mikrotom dibuat irisan halus dan irisan ditempelkan pada
permukaan grid untuk dilakukan pewarnaan. Pewarnaan irisan jaringan

menggunakan UA 2% dan timbal sitrat masing-masing selama 20-30 detik. Kemudian setelah grid dicuci dengan campuran air destilata dan NaOH, preparat irisan diamati.

Metode ISEM. Preparat ME disiapkan melalui beberapa tahap yaitu tahap pelapisan grid, pencucian I, pengikatan partikel virus, pencucian II, pemberian dekorasi, pencucian III, pewarnaan, dan pengamatan dengan ME (Lange, 1984). Untuk keperluan tersebut disediakan AS virus (a) pada konsentrasi 1:8, 1:40, dan 1:400 dalam 0.1 M penyangga fosfat dengan pH. 7.0. Larutan virus yang diperiksa (dari cairan perasan tanaman yang terinfeksi virus krupuk tembakau atau suspensi virus "murni-sebagian" dibuat pada konsentrasi 1:10 dalam penyangga yang sama.

Pada pelapisan setiap grid yang digunakan diapungkan pada tetesan AS (1:400) selama 5 menit, dan pencucian I dilakukan dengan meneteskan penyangga fosfat sebanyak 20 kali tetesan pada bagian grid yang telah dilapisi AS. Setelah pelapisan setiap grid diapungkan pada tetesan larutan virus selama 15 menit untuk pengikatan partikel virus, kemudian dilakukan pencucian II dengan cara yang sama seperti pencucian I.

Pemberian dekorasi dengan menggunakan AS (1:8) atau AS (1:40). Sebagian grid diapungkan pada tetesan AS (1:8) dan sebagian yang lain pada tetesan AS (1:40) selama 15 menit. Setelah itu dilakukan pencucian III seperti pada pencucian I tetapi dengan menggunakan air destilata. Kemudian pewarnaan dilakukan dengan mengapungkan grid pada tetesan UA 2% selama $\frac{1}{2}$ -1 menit, dan setelah kering diamati.

Tabel 11. Beda Harga Rataan Panjang dan Lebar Nukleus Sel Jaringan Floem Tanaman Tembakau yang Terinfeksi Virus Krupuk Tembakau dan yang Sehat.

Panjang (μm)	Nilai Rataan ¹⁾						
	Y_3	Y_1	Y_2	Lebar (μm)	Y_3	Y_2	Y_1
	7.0720	13.6000	15.7680		5.9920	7.0480	7.2320
$Y_2 = 15.7680$	8.6960*	2.1680*	-	$Y_1 = 7.2320$	1.2400*	0.1840	-
$Y_1 = 13.6000$	6.5280*	-		$Y_2 = 7.0480$	1.0560	-	
$Y_3 = 7.0720$	-			$Y_3 = 5.9920$	-		

1) Dari 50 ulangan untuk setiap perlakuan.

*) Berbeda nyata pada taraf uji 5% ($\text{BNJ}_{0.05} = 1.6531$ untuk panjang nukleus dan $\text{BNJ}_{0.05} = 1.0640$ untuk lebar nukleus); Y_1 . Terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-1; Y_2 . Terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-2; Y_3 . Sehat.

virus mungkin baru dimulai apabila genom virus mencapai nukleus. Kejadian paling awal ditandai dengan meningkatnya sintesis asam nukleat di dalam nukleolus, yang segera diikuti dengan penyebaran asam nukleat ke dalam sitoplasma di sekeliling nukleus. Menurut Bos (1983) proses replikasi asam nukleat virus tergantung pada virus tertentu dapat terjadi dalam nukleus atau sitoplasma.

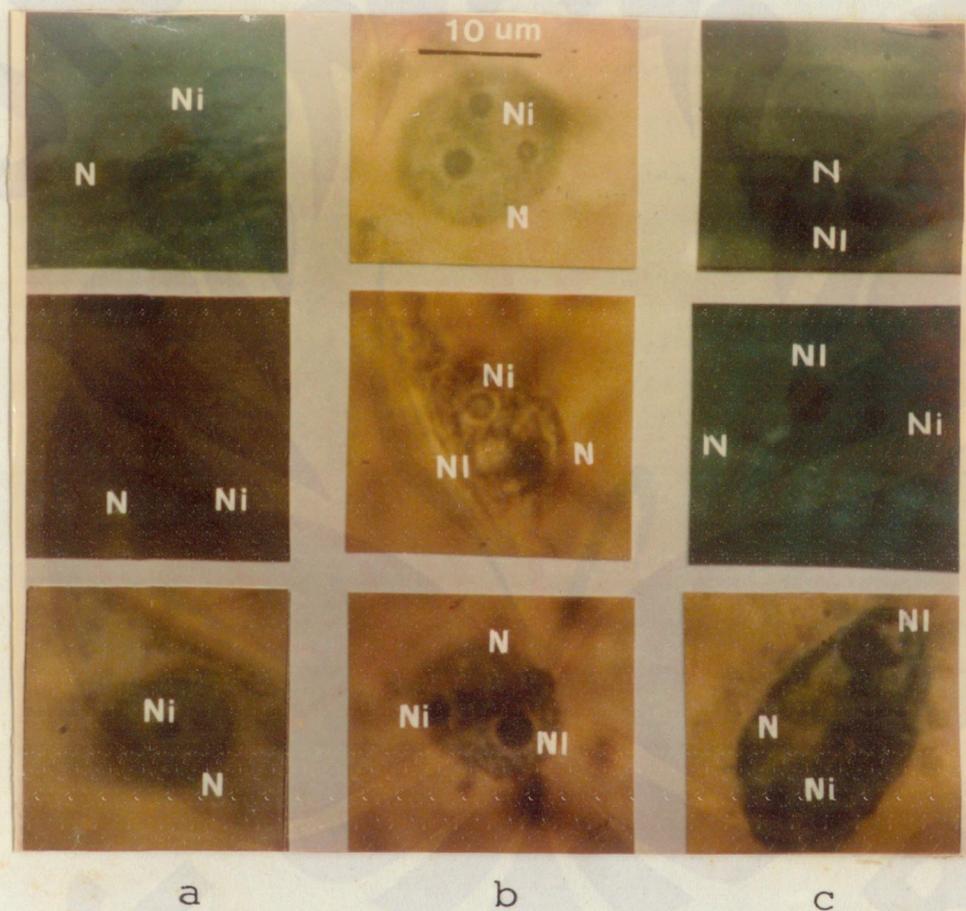
Goodman (1981) dan Bos (1983) mengemukakan bahwa pada semua kasus virus gemini, infeksi virus tampak ada hubungannya dengan nukleus sel yang terinfeksi. Partikel seperti virus terakumulasi dalam nukleus, dan perubahan sitopatologi yang ada hubungannya dengan infeksi virus gemini terjadi mula-mula pada struktur *nuclear* dan *nucleolar*. Kim, Shock, dan Goodman (1978) telah melaporkan adanya perubahan struktur nukleolar yaitu terjadinya hipertrofi pada nukleoli dan segregasi bahan nukleolar menjadi bagian berbentuk fibril atau granular, pada sel jaringan tanaman yang terinfeksi *bean golden mosaic virus* (BGMV), dan *euphorbia mosaic virus* (EMV) yang keduanya tergolong virus gemini. Menurut Goodman (1981), Thongmeearkom, Honda, Saito, dan Syamananda (1981), serta Christie *et al.* (1986) perubahan nukleus seperti segregasi nukleoli, terdapatnya badan berbentuk fibril, dan terakumulasinya partikel virus dalam sel jaringan pembuluh merupakan efek sitopatotik yang senantiasa berasosiasi dengan struktur ultra dari infeksi virus gemini. Namun Osaki dan Inouye (1978) tidak mendapatkan perubahan struktur nukleolar seperti tersebut pada sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau, tetapi kristal-kristal badan inklusi berbentuk batang yang diduga merupakan agregat partikel virus didapatkan terakumulasi di dalam nukleus.

Pengamatan badan inklusi melalui pewarnaan jaringan dengan Azure-A, tidak memberikan hasil yang diharapkan. Menurut Christie dan Ed-wardson (1986) pewarnaan dengan Azure-A pada jaringan yang terinfeksi virus menyebabkan nukleus berwarna biru, badan inklusi yang mengandung DNA ungu-biru, dan badan inklusi yang mengandung RNA ungu-merah sedang pada sel jaringan sehat nukleus berwarna biru dan nukleolus ungu-merah. Christie *et al.* (1986) melalui pewarnaan jaringan dengan Azure-A mendapatkan adanya badan inklusi berukuran besar dengan warna ungu-biru dan badan berbentuk fibril di dalam nukleus jaringan floem beberapa ta-naman yang terinfeksi oleh BGMV, EMV, lima bean golden mosaic virus (LBGMV), malvaceous chlorosis virus (MCV), dan rhynchosia mosaic virus (RMV) yang diduga tergolong virus gemini. Sebagian besar nukleus yang mengandung badan inklusi tersebut tampak mengalami hipertrofi, dan ter-bentuknya badan inklusi di dalam nukleus yang berasosiasi dengan ja-ringan pembuluh mencirikan infeksi dari semua virus gemini.

Tsao (1963) melaporkan adanya badan inklusi berbentuk amorf hampir *spherical* di dalam nuklei dengan diameter antara 2-10 mikron, pada ta-naman kapas yang terinfeksi *leaf crumple virus*. Nuklei yang mengandung badan inklusi dapat mencapai 2-4 kali lebih besar daripada yang normal, dan badan inklusi lebih besar dibandingkan dengan nukleoli. Jumlah ba-dan inklusi bervariasi dari satu sampai beberapa untuk setiap nukleus dalam keadaan terpecah atau berkelompok membentuk suatu agregat. Ba-dan inklusi tidak terdapat di dalam sitoplasma maupun nukleoli.

Pewarnaan dengan Azure-A pada pengujian ini untuk jaringan yang terinfeksi tidak berbeda dengan yang sehat yaitu nukleus terwarnai bi-ru dan nukleolus ungu-biru. Akan tetapi didapatkan bahwa sebagian

besar nukleus sel jaringan yang terinfeksi mengandung sejumlah nukleoli dengan ukuran yang bervariasi (Gambar 22). Beberapa nukleoli tampak mengalami hipertrofi dengan ukuran lebih besar daripada normal. Diameter rata-rata nukleolus yang mengalami hipertrofi mencapai sekitar 2.6 kali dari yang normal. Pada nukleus dengan beberapa nukleoli di dalamnya didapatkan hanya satu atau dua nukleoli saja yang mempunyai ukuran lebih besar daripada normal, sedang yang lain lebih kecil. Nukleolus yang lebih kecil daripada yang normal, diduga dihasilkan dari



Gambar 22. Bentuk Nuklei (N) dengan Beberapa Nukleoli (Ni) dari Sel Jaringan Floem Tanaman Tembakau.
 a. Sel jaringan sehat; b. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-1; c. Sel jaringan yang terinfeksi virus krupuk tembakau isolat-2; NI. Nukleolus yang berukuran lebih besar daripada yang normal.

segregasi nukleolus yang sebelumnya telah mengalami hipertrofi. Perubahan struktur nuklei sel jaringan floem seperti hipertrofi pada nukleus dan nukleolus, terdapatnya nukleolus dengan ukuran lebih kecil daripada normal yang diduga hasil segregasi nukleolus tampak mirip dengan yang dilaporkan pada infeksi yang disebabkan oleh virus dari golongan gemini yaitu BGMV pada buncis, EMV pada *E. prunifolia*, dan *leaf crumple virus* pada kapas.

Pengamatan dengan Mikroskop Elektron

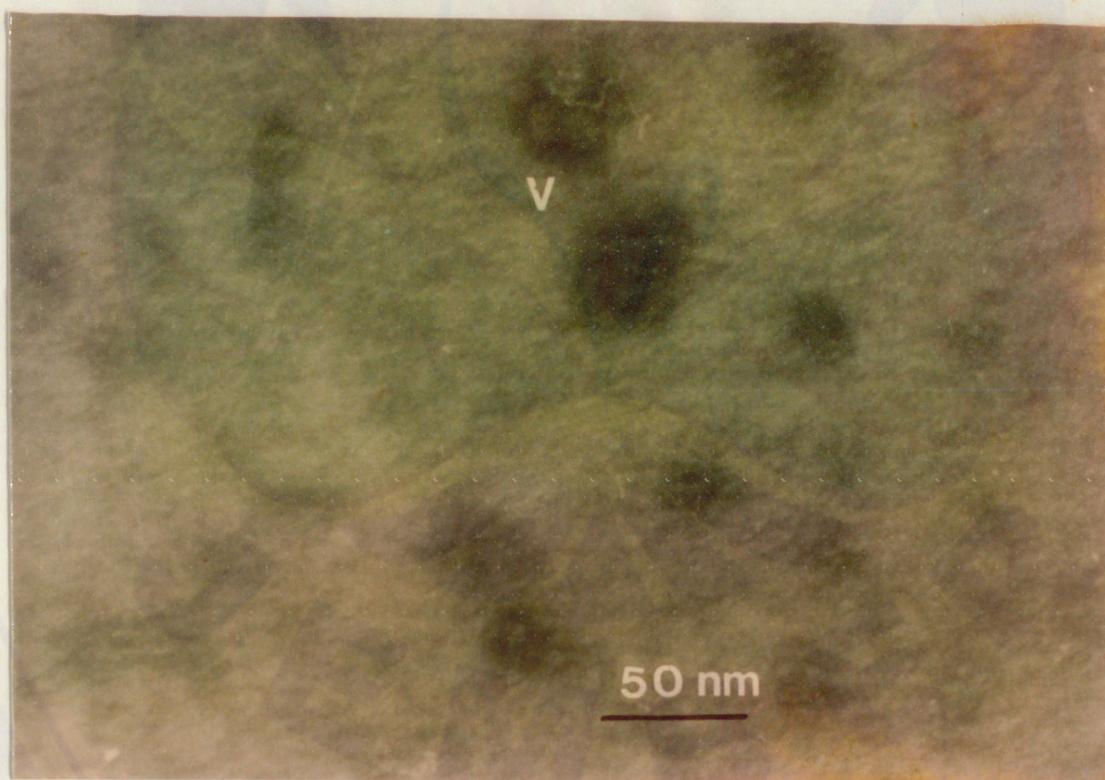
Pengamatan partikel virus dengan ME hanya berhasil melalui metode ISEM. Bentuk yang diduga partikel virus, tampak berbentuk isometrik ganda dengan ukuran 17 X 29 nm yang menunjukkan bentuk morfologi partikel dari kelompok virus gemini (Gambar 23).

Virus gemini merupakan golongan virus tumbuhan dengan morfologi partikel yang berbeda dengan golongan virus tumbuhan lainnya yang telah umum dikenal, dan baru sekitar tujuh tahun yang terakhir ini dilaporkan. Nama virus gemini berasal dari karakteristik partikel virus yaitu isometrik ganda, yang dalam keadaan tunggal umumnya mempunyai diameter berkisar 18-20 nm dan sebagian besar senantiasa terdapat dalam keadaan berpasangan dengan ukuran 20 X 30 nm (istilah gemini dari bahasa Latin yang berarti kembar). Morfologi partikel virus gemini tersebut sebenarnya telah diketahui sejak tahun 1974 (Bock, 1982).

Virus gemini merupakan kelompok tersendiri dari golongan virus tumbuhan, dan belum dilaporkan bahwa ada virus dengan partikel berbentuk gemini pada binatang atau organisme prokaryot (Goodman, 1981). Menurut Goodman (1981) dan Bock (1982) virus gemini dapat dibedakan dengan golongan virus tumbuhan lainnya dari bentuk kandungan asam

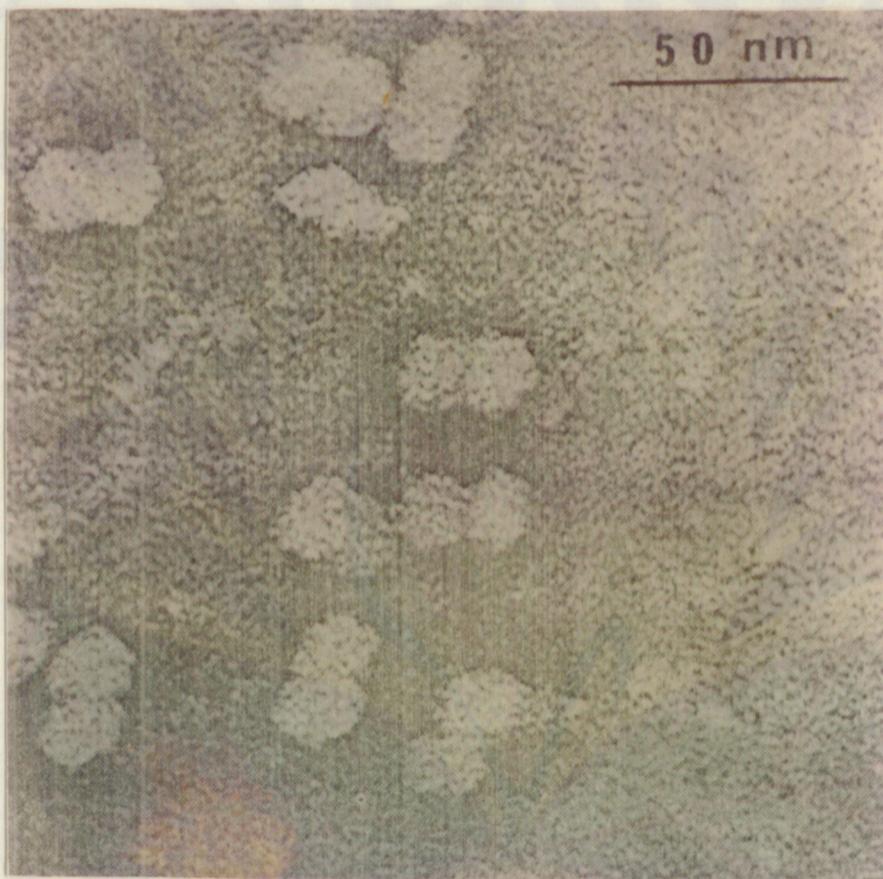
nukleatnya. Sebagian besar virus tumbuhan diketahui mengandung asam nukleat dalam bentuk asam ribonukleat (RNA), sedang virus gemini asam nukleatnya adalah DNA dalam bentuk *single-stranded* DNA (ssDNA).

Sebagian dari virus gemini dilaporkan terutama ditularkan oleh *B. tabaci*, tetapi ada beberapa di antaranya yang ditularkan oleh wereng daun (Goodman, 1981). Beberapa virus gemini yang telah diketahui ditularkan oleh *B. tabaci* ialah BGMV, EMV, *tomato golden mosaic virus*, *tomato yellow dwarf virus*, *mungbean yellow mosaic virus*, dan virus krupuk tembakau, sedang yang ditularkan oleh wereng daun ialah *maize streak virus*, *chloris striate mosaic virus*, *curly top virus*, *tobacco yellow dwarf virus*, dan *bean summer death virus*.



Gambar 23. Partikel Virus Krupuk Tembakau Isolat-1.
V. Partikel ganda dengan ukuran 17 X 29 nm
(Pembesaran 240 000 kali).

Partikel virus gemini ternyata mempunyai ukuran yang bervariasi. Osaki dan Inouye (1978) mendapatkan bahwa partikel virus krupuk tembakau di Jepang yang diduga sebagai virus gemini, dalam keadaan berpasangan mempunyai ukuran berkisar antara 15-20 X 25-30 nm. Bentuk partikel virus krupuk tembakau yang dilaporkan oleh Osaki dan Inouye (1978) tersebut terlihat pada Gambar 24.



Gambar 24. Partikel Virus Krupuk Tembakau, Suatu Virus Gemini dengan Bentuk Isometrik Ganda. Ukuran partikel 15-20 X 25-30 nm. Gambar direproduksi dari Osaki dan Inouye (1978).

KESIMPULAN

Berdasarkan perbedaan gejala pada tanaman yang terinfeksi dari hasil inokulasi buatan, dibedakan dua isolat virus krupuk tembakau yaitu isolat-1 dan isolat-2. Kedua isolat tersebut dapat ditularkan dengan penyambungan dan melalui vektor kutu Aleyrodidae asal tembakau *Bemisia* sp., dan masa inkubasi virus dalam tanaman tembakau berkisar 9-46 hari. *B. tabaci* asal tanaman kedelai dan *M. persicae* ternyata tidak menularkan virus krupuk tembakau.

Penularan virus krupuk tembakau dengan penyambungan lebih mudah dilakukan daripada melalui *Bemisia* sp., dan dengan melalui vektor tersebut penularan juga lebih mudah dilakukan untuk isolat-2 daripada isolat-1. Virus krupuk tembakau isolat-1 dapat menginfeksi tanaman tomat, *S. khasianum*, *N. glutinosa*, dan *A. conyzoides* dengan gejala sistemik perubahan bentuk daun. Di antara tanaman-tanaman tersebut tomat tampak merupakan tanaman inang yang sesuai untuk perkembangan virus krupuk tembakau, oleh karena itu dapat menjadi sumber inokulum yang potensial untuk penyebaran virus di lapang. Dengan satu ekor *Bemisia* sp. per tanaman virus krupuk tembakau dapat ditularkan dari tomat maupun *A. conyzoides* sakit ke tembakau sehat, sedang untuk penularan virus dari tembakau sakit ke tembakau sehat diperlukan minimum tiga ekor per tanaman.

Virus krupuk tembakau isolat-1 "murni-sebagian" ternyata bersifat antigenik dan menyebabkan pembentukan antiserum dengan titer 1/128, dan 1/12 masing-masing dihasilkan melalui metode uji *micro-precipitin* dan Ouchterlony, serta sampai titer 1/4096 dengan metode I-ELISA reaksinya

masih positif. Spektrum absorpsi-UV virus krupuk tembakau isolat-1 tersebut menunjukkan bentuk spektrum absorpsi nukleoprotein, dengan maksimum dan minimum masing-masing pada panjang gelombang 260 nm dan 245 nm serta ratio $A_{280}/A_{260} = 0,69$.

Bentukan yang diduga partikel virus berbentuk isometrik ganda dengan ukuran 17 X 29 nm pada pengamatan dengan EM, didapatkan dalam preparat virus krupuk tembakau isolat-1 "murni-sebagian" tersebut. Selain itu kedua isolat virus krupuk tembakau tersebut dapat menyebabkan terjadinya hipertrofi pada nukleus dan nukleolus sel jaringan floem tanaman yang terinfeksi. Berdasarkan sifat-sifat virus tersebut maka tampak ada kecenderungan bahwa virus krupuk tembakau isolat-1 merupakan salah satu virus dari golongan virus gemini yang ditularkan oleh *Bemisia* sp.

SARAN

1. Hubungan antar tipe antara kedua isolat virus krupuk tembakau yang didapatkan perlu diteliti kembali.
2. Interaksi antara kedua isolat virus krupuk tembakau tersebut di dalam tanaman tembakau maupun tumbuhan inang gulma, cara penularan virus melalui serangga, dan kisaran inangnya perlu diteliti lebih lanjut.
3. Sebagai salah satu usaha pengendalian penyakit krupuk tembakau disarankan agar tidak menanam tomat di dekat atau di sekitar pertanaman tembakau, dan mengadakan sanitasi dengan memusnahkan tanaman inang virus krupuk tembakau antara lain *A. conyzoides*, *S. khasianum*, serta berbagai jenis gulma lainnya yang telah dilaporkan sebagai inang virus krupuk tembakau.
4. Diagnose penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh virus dengan mengamati badan inklusi menggunakan mikroskop cahaya perlu dikembangkan, mengingat metode pengamatan dengan mikroskop cahaya lebih mudah dan biayanya lebih murah.
5. Penggunaan antiserum virus tumbuhan dalam pengujian-pengujian telah semakin meluas. Oleh karena itu usaha untuk memproduksi antiserum di dalam negeri perlu mendapatkan perhatian untuk segera dilaksanakan karena ketergantungan untuk bahan tersebut dari luar negeri akan memerlukan biaya yang sangat tinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Badri, I. B. 1983. Identification of the aleyrodid on soybean from two locations in West Java and some bionomics of *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae) on three soybean varieties. Biotrop. SEAMEO, Regional Center for Tropical Biology. Indonesia. 62 p.
- Beck, S. D. 1965. Resistance of plants to insects. Ann. Rev. Entomol. 10: 207-232.
- Bird, J. 1957. A whitefly transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. Tech. Pap. Agric. Exp. Sta. 22: 1-35.
- _____ dan J. Sanchez. 1971. Whitefly-transmitted viruses in Puerto Rico. J. Agric. Univ. P. Rico. 55: 461-467.
- Bock, K. R. 1982. Geminivirus diseases. Plt. Disease 66 (3): 266-270.
- Bos, L. 1983. Introduction To Plant Virology. Longman, London and New York. 159 p.
- Capoor, S. P. 1949. Feeding methods of the whitefly. Current Sci. 18: 82-83.
- Christie, R. G. dan J. R. Edwardson. 1986. Light microscopic techniques for detection of plant virus inclusions. Plt. Disease 70 (4): 273-279.
- _____, N. J. Ko, B. W. Falk, E. Hielbert, R. Lastra, J. Bird, dan K. S. Kim. 1986. Light microscopy of geminivirus-induced nuclear inclusion bodies. Phytopathol. 76: 124-126.
- Clark, M. F. dan A. M. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475-483.
- Cohen, S. dan I. Harpaz. 1964. Periodic, rather than continual acquisition of a new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). Ent. exp. and appl. 7: 155-166.
- _____ dan F. E. Nitzany. 1966. Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. Phytopathol. 56: 1127-1131.
- Costa, A. S. 1955. Studies on Abutilon mosaic in Brazil. Phytopathol. Z. 24: 97-112.
- _____. 1969. Whiteflies as virus vectors. pp: 95-119. in K. Marasmorosch (ed.). Viruses, Vectors, and Vegetation. John

Wiley and Sons (Interscience), New York. 659 p.

- Departemen Pertanian. 1983. Pedoman Penyakit Tanaman Tebu dan Tembakau. Direktorat Jendral Perkebunan, Direktorat Perlindungan Tanaman Perkebunan.
- Dhan Raj, K. S. dan M. L. Seth. 1968. Enations in *Capsicum annuum* (Chili) caused by a new strain of leaf curl virus. *Indian J. Hort.* 25: 70-71.
- Gameel, O. J. 1977. *Bemisia tabaci* (Genn.). pp: 320-322. in J. Kranz, H. Schmutterer, dan W. Koch (eds.). Diseases, Pests, and Weed in Tropical Corps. John Wiley and Sons. New York. 666 p.
- Goodman, R. M. 1981. Geminiviruses. pp: 880-910. in E. Kurstak (ed.). Handbook of Plant Virus Infection and Comparative Diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. 943 p.
- Hollings, M. dan A. A. Brunt. 1981. Potyviruses. in E. Kurstak (ed.). Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. 943 p.
- Hopkins, J. C. F. 1932. Leaf curl of tobacco in Southern Rhodesia. *Rhodesia Agric. J.* 29: 680-686.
- Husain, M. A. dan K. N. Trehan. 1933. Observations on the life-history, bionomics, and control of the whitefly of cotton (*Bemisia gossypiperda* M. dan L.). *Indian J. Agric. Sci.* 3: 701-753.
- Joseph, M. bar. dan S. M. Garnsey. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Principles and applications for diagnosis of plant viruses. pp; 35-57. in K. Marasmorosch dan K. F. Harris (eds.). Plant Diseases and Vectors: Ecology and Epidemiology. Academic Press, New York. 368 p.
- Juniper, B. E., G. C. Cox, A. J. Gikhrist, dan P. R. Williams. 1970. Techniques For Plant Electron Microscopy. Blackwell Scientific Publication. Oxford and Edinburgh. 107 p.
- Kalshoven, L. G. E. 1981. Pests of Crops in Indonesia. Revised and translated by P. A. van der Laan with the assistance of G. H. L. Rothschild. P. T. Ikhtiar Baru Van Hoeve. Jakarta, Indonesia. 701 p.
- Kerling, L. C. P. 1933. The anatomy of the "kroepoek diseased" leaf of *Nicotiana tabacum* and *Zinnia elegans*. *Phytopathol.* 23: 175-190.
- Kim, K. S., T. L. Shock, dan R. M. Goodman. 1978. Infection of *Phaseolus vulgaris* by bean golden mosaic virus: Ultrastructural aspects. *Virology* 89: 22-33.

- Kirkpatrick, T. W. 1931. Further studies on leaf curl of cotton in the Sudan. *Bull. Entomol. Res.* 22: 323-363.
- Lange, L. 1984. The use of immunosorbent electron microscopy (ISEM) for the detection of barley stripe mosaic virus directly from the dry seed. *Virology laboratory exercise notes*, No. 10. pp: 31-35. in L. Lange. *Laboratory Exercises in Seed Health Testing for Virus Diseases*. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 66 p.
- Lommel, S. A., A. H. McCain, dan T. J. Morris. 1982. Evaluation of indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Phytopathol.* 72: 1018-1022.
- Lucas, G. B. 1975. *Diseases of tobacco*. Biological Consulting Associates Raleigh. North Caroline.
- Matthews, R. E. F. 1957. *Plant Virus Serology*. Cambridge at The University Press. 128 p.
- McClellan, A. P. D. 1940. Some leaf curl diseases in South Africa. I. Leaf curl disease of tobacco. II. A new *Pentunia* strain of leaf curl and note on the occurrence of a leaf curl disease of hollyhock. *Sci. Bull. Dept. Agr. So. Africa* 225. 75 p.
- Milne, R. G. 1972. Electron microscopy of viruses. pp: 76-128. in C. I. Kado dan H. O. Agrawal (eds.). *Principles and Techniques in Plant Virology*. Van Nostrand Reinhold Company. New York.
- Muniyappa, V. 1980. Whiteflies. pp: 39-85. in K. F. Harris dan K. Marasmorosch (eds.). *Vectors of Plant Pathogen*. Academic Press. New York.
- Nariani, T. K. 1956. Leaf curl of papaya. *Indian Phytopathol.* 9: 151-155.
- _____. 1960. Yellow mosaic of mungbean (*Phaseolus aurens* L.). *Indian Phytopathol.* 13: 24-29.
- _____. 1968. Enation leaf curl of tomato. *Plt. Dis. Reprtr.* 52: 595-596.
- Noordam, D. 1973. *Identification of Plant Viruses, Methods and Experiments*, Pudoc Wageningen. 207 p.
- Osaki, T dan T. Inouye. 1978. Resemblance in morphology and intranuclear appearance of viruses isolated from yellow dwarf diseased tomato and leaf curl diseased tobacco. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 44: 167-178.
- _____. 1981. Tobacco leaf curl virus. *CMI/AAB*,

- Descriptions of Plant Viruses. 232. The Holywell Press Ltd. Oxford.
- Pal, B. P. dan R. K. Tandon. 1937. Types of tobacco leaf curl in Northern India. *Ind. J. Agric. Sci.* 7: 363-393.
- Pathak, M. D. 1975. Utilization of insect-plant interaction in pest control. pp: 121-148. *in* D. Pimentel (ed.). *Insects, Science, and Society*. Academic Press, Inc. New York.
- Poerbokoescemo, M. 1984. Penanggulangan penyakit virus krupuk pada tanaman tembakau musim tanam tahun 1984/1985 di kabupaten Bojonegoro. Paper pada seminar Fitopatologi Regional I, PFI Komisarariat Jawa Timur. 8 p.
- Pollard, D. G. 1955. Feeding habits of the cotton whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Appl. Biol.* 43 (4): 664-671.
- Pruthi, H. S. dan C. K. Samuel. 1939. Entomological investigations on the leaf curl disease of tobacco in Northren India. III. The transmission of leaf curl by whitefly *Bemisia gossypiperda* to tobacco, sann hemp, and a new alternate host of the leaf curl virus. *Indian J. Agric. Sci.* 9: 223-275.
- _____. 1942. Entomological investigations on the leaf curl disease of tobacco in Northren India. V. Biology and population of the whitefly vector *Bemisia tabaci* Genn., in relation to the incidence of the disease. *Indian J. Agric. Sci.* 12: 37-57.
- Reuterma, M. L., G. O. Pableo, dan W. C. Price. 1971. Preliminary study of the transmission of Philippine tomato leaf curl virus by *Bemisia tabaci*. *Philippine Phytopathol.* 7: 29-34.
- Russell, L. M. 1957. Synonyms of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). Reprinted from Bulletin of The Brooklyn Entomological Society, vol. III. (5): 122-123.
- Schlegel, D. E. dan S. H. Smith. 1966. Sites of virus synthesis in plant cells. pp: 54-65. *in* A. B. R. Beemster dan J. Dijkstra (eds.). *Viruses of Plants*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Semangoen, H. 1971. Penyakit-penyakit Tanaman Pertanian di Indonesia. Yayasan Pembina Fakultas Pertanian Universitas Gajah Mada, Yogyakarta. 463 p.
- Sharp, D. G. dan F. A. Wolf. 1949. The virus of tobacco leaf curl. *Phytopathol.* 39: 225-230.

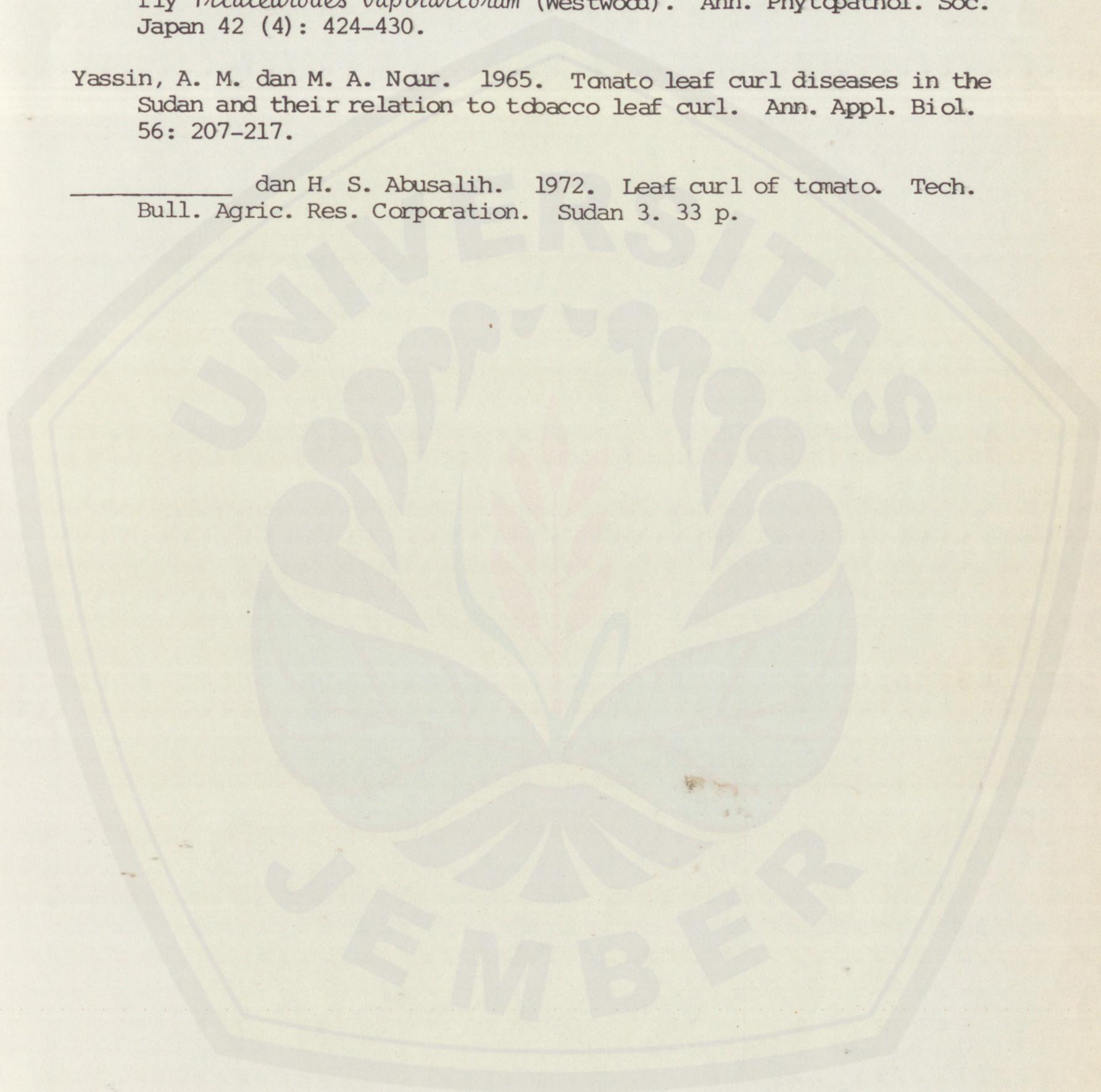
- Sharp, D. G. dan F. A. Wolf. 1951. The virus of tobacco leaf curl. II. *Phytopathol.* 41: 94-98.
- Silberschmidt, K., E. Flores, dan C. R. Tommasi. 1957. Further studies on the experimental transmission of infectious chlorosis of Malvaceae. *Phytopathol. Z.* 30: 387-414.
- Singh, K. 1931. A Contribution Toward Our Knowledge of The Aleyrodiidae (whitefly) of India. *Memoirs of the Department of Agriculture in India. Imperial Institute of Agricultural Research. Pusa. Vol. XII. (1).* 100 p.
- Storey, H. H. 1931. A new virus disease of the tobacco plant. *Nature* 128: 187-188.
- _____. 1935. Virus diseases in East Africa plants. II. Leaf curl disease of tobacco. *E. Afr. Agr. J.* 1: 148-153.
- Thongmeekorn, P., Y. Honda, Y. Saito, dan R. Syamananda. 1981. Nuclear ultrastructural changes and aggregates of virus like particle in mungbean cells infected with mungbean yellow mosaic disease. *Phytopathol.* 71: 41-44.
- Thung, T. H. 1932. De Krul-en krupuk-ziekte van tabak en de oorzaken van hare verbreiding. *Med. Proefstat. Vorst. Tabak.* 72. 54 P.
- _____. 1934. Vestrijding der krul-en koepoek-ziekten van tabak. *Proefstat. Vorst. Tabak Meded.* 78. 18 p.
- _____. dan T. Hadiwidjaja. 1953. De krupuk-ziekten van *Crotalaria* en *Arachis hypogaea*. *Landbouw. Djakarta, Java.* XXV. Nos. 1-6: 149-160.
- Tsao, P. W. 1963. Intranuclear inclusion bodies in the leaves of cotton plants infected with leaf crumple virus. *Phytopathol.* 53: 243-244.
- Varma, P. M. 1963. Transmission of plant viruses by whiteflies. *Nat. Inst. Sci. India Bull.* 24: 11-33.
- Vasudeva, R. S. dan J. San Raj. 1948. A leaf curl disease of tomato. *Phytopathol.* 38: 364-369.
- Voller, A., D. E. Bidwell, dan A. Bartlett. 1979. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Dynatech Laboratories, Alexandria.* Va. 67 p.
- Whittaker, R. H. dan P. P. Feeny. 1971. Allelochemicals: Chemical interactions between species. *Science.* 171: 757-770.
- Wolf, F. A., W. H. Whitcomb, dan W. C. Mooney. 1949. Leaf curl of

tobacco in Venezuela. J. Elisha Mitchell Sci. Soc. 65: 38-47.

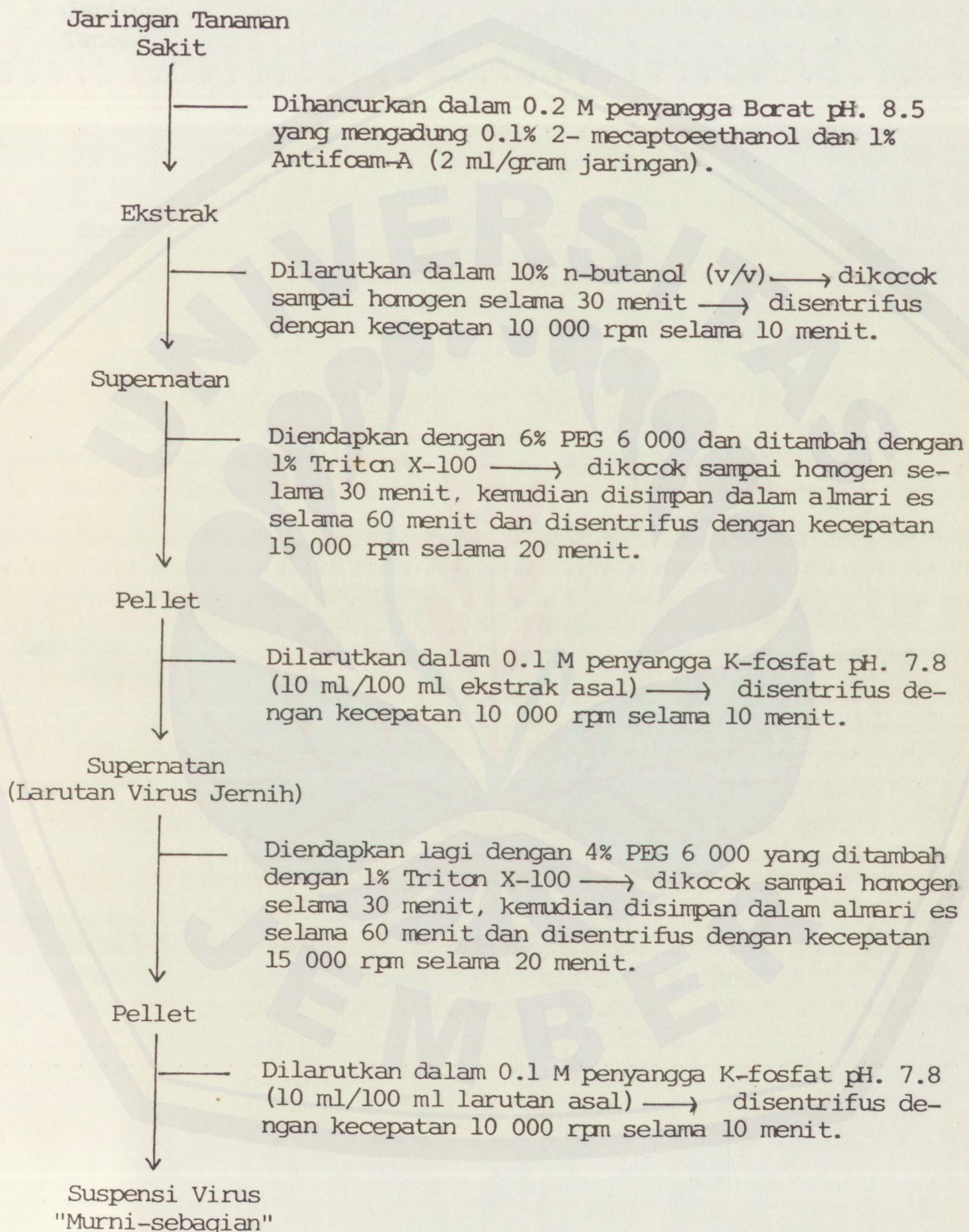
Yamauchi, A., M. Imoto, T. Hibi, dan Y. Komuro. 1976. Evidence that tobacco leaf curl virus is not transmitted by greenhouse whitefly *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood). Ann. Phytopathol. Soc. Japan 42 (4): 424-430.

Yassin, A. M. dan M. A. Nur. 1965. Tomato leaf curl diseases in the Sudan and their relation to tobacco leaf curl. Ann. Appl. Biol. 56: 207-217.

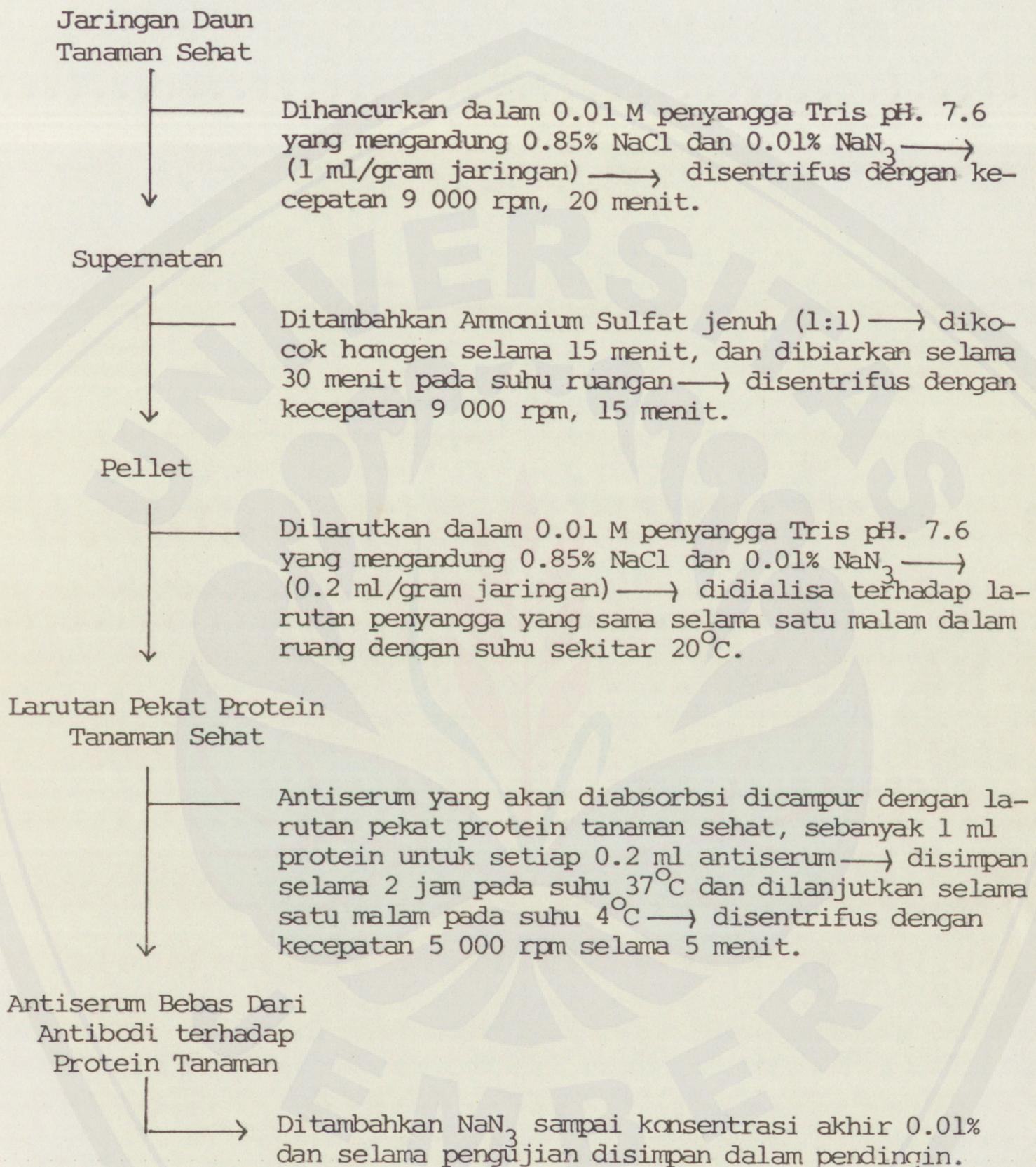
_____ dan H. S. Abusalih. 1972. Leaf curl of tomato. Tech. Bull. Agric. Res. Corporation. Sudan 3. 33 p.



Lampiran 1. Skema Pemurnian Virus Krupuk Tembakau
(Osaki dan Inouye, 1978).

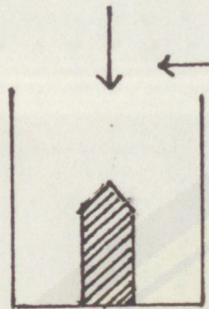


Lampiran 2. Skema Absorpsi Antiserum (AS) oleh Protein Normal Tanaman Sehat (Lammel *et al.*, 1982).

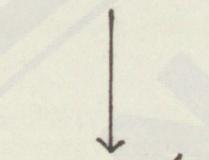


Lampiran 3. Prinsip Metode *Indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (I-ELISA)* (Clark dan Adams, 1977; Voller *et al.*, 1979).

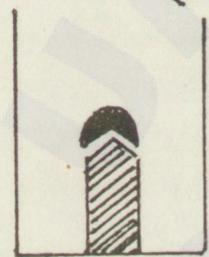
Lubang Plat Mikrotiter



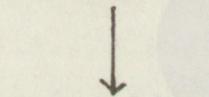
1. Pengikatan antigen (virus) pada plat: antigen + *coating buffer* (1:10) diisikan ke dalam lubang plat mikrotiter (200 ul/lubang) dan disimpan selama 3 jam pada suhu 37°C.



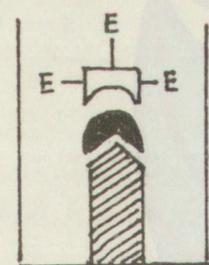
2. Pencucian plat: plat dikosongkan dan dicuci dengan mengisikan PBST-20 selama 3 menit dan diulang tiga kali berturut-turut.



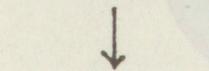
3. Penambahan antiserum: antiserum + *enzyme buffer* diisikan ke dalam lubang plat sebanyak 200 ul/lubang untuk setiap pengenceran yang diuji, dan disimpan selama satu malam pada suhu 6°C.



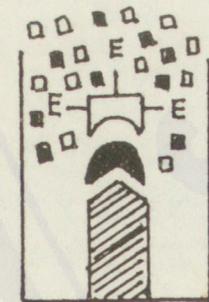
4. Pencucian plat: sebanyak tiga kali secara sama seperti pada nomer 2.



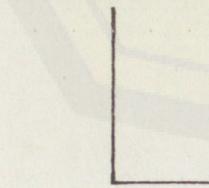
5. Penambahan *conjugate*: *conjugate Goat anti-Rabbit IgG. alkaline phosphatase* + *enzyme buffer* (1:1 000) diisikan ke dalam setiap lubang plat (200 ul/lubang), dan disimpan selama 3 jam pada suhu 37°C.



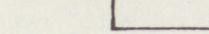
6. Pencucian plat: secara sama seperti pada nomer 2.



7. Penambahan substrat: *P-nitrophenyl phosphate* + *substrate buffer* (1 mg/ml) diisikan ke dalam lubang plat (200 ul/lubang), dan disimpan selama 20-60 menit pada suhu ruangan.



8. Setelah sekitar 30 menit dan terjadi perubahan warna larutan, reaksi dihentikan dengan menambahkan 3 M NaOH (50 ul/lubang).



9. Pengamatan: secara visual dengan mengamati intensitas warna larutan atau dengan pembacaan nilai absorbansi larutan pada $\lambda = 405 \text{ nm}$ menggunakan *Elia reader*.

Lampiran 4. Absorbansi Larutan Virus Krupuk Tembakau Isolat-1 "murni-sebagian" (1:10) pada Kisaran Panjang Gelombang 230-325 nm.

Panjang Gelombang (nm)	Absorbansi
230	0.899
235	0.828
240	0.766
245	0.704
250	0.748
255	0.822
260	0.858
265	0.827
270	0.759
280	0.592
300	0.416
325	0.311
