

**PEMBUATAN ANTISERUM DAN KAJIAN SEROLOGI
VIRUS PENYEBAB PENYAKIT DAUN KERITING KUNING CABAI**

***ANTISERUM PRODUCTION AND SEROLOGICAL ASSAY OF
PEPPER YELLOW LEAF CURL VIRUS***

Sri Sulandari

*Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Rusmilah Suseno, Sri Hendrastuti Hidayat, dan Soemartono Sosromarsono
Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jumanto Harjosudarmo
Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman (Balitbio), Bogor*

ABSTRACT

Virus identification based on the serological assay has been widely applied as a tool for plant virus detection. The aims of this research is to produce antiserum of the Pepper yellow leaf curl virus by rabbit immunization using purified geminivirus of Segunung isolate. Identification of the virus was done by using modified I-ELISA and DIBA methods and also by using western blott.

I-ELISA and DIBA methods were able to detect the geminivirus in the infected samples. The reactivity of antiserum was found to be similar among pepper isolates from different location (Segunung, Yogyakarta, Cugenang, and Lembang) and those from different hosts (pepper, tobacco, tomato and Ageratum conyzoides)

The antiserum could also be used for detection and identification of the Pepper yellow leaf curl virus in its vector. A single insect vector is sufficient for the detection of virus properly. The detection of geminivirus in its vector is very useful because it can be used to study the epidemic of the disease in the field.

The I-ELISA and DIBA methods are very useful as tools for detecting the geminivirus. The methods are very easy to be carried out, fastly, and need only a minimum cost on operation. Geminivirus could also be identified by western blott analysis.

Key words: antiserum, detection, Pepper yellow leaf curl virus, serology

INTISARI

Identifikasi suatu virus dengan memanfaatkan reaksi antara antigen dan antibodi melalui uji serologi telah banyak diaplikasikan sebagai alat deteksi keberadaan virus pada tanaman. Penelitian ini bertujuan untuk membuat antiserum penyebab penyakit daun keriting kuning cabai isolat Segunung dengan melakukan imunisasi kelinci menggunakan virus murni. Identifikasi virus dilakukan dengan metode *Indirect enzyme-linked immunosorbent assay* (I-ELISA) dan *Dot immunobinding assay* (DIBA) yang dimodifikasi serta secara *western blott*.

Antiserum yang dihasilkan dapat digunakan untuk mendeteksi geminivirus yang berasal dari sampel tanaman sakit menggunakan metode I-ELISA dan DIBA. Reaktivitas antiserum tersebut sama terhadap antigen isolat cabai dari berbagai lokasi (Segunung, Yogyakarta, Cugenang dan Lembang) maupun antigen dari berbagai inang (cabai, tembakau, tomat dan babadotan). Antiserum juga dapat digunakan untuk deteksi virus penyebab penyakit daun keriting kuning pada serangga vektornya. Menggunakan satu ekor serangga sudah dapat dideteksi keberadaan virusnya dengan baik. Deteksi geminivirus melalui serangga vektor sangat menguntungkan karena dapat dimanfaatkan untuk kajian epidemi penyakit di lapangan.

Teknik serologi I-ELISA dan DIBA sangat potensial untuk digunakan sebagai alat deteksi geminivirus karena dapat dilakukan dengan mudah, memberikan hasil dalam waktu singkat dan

biaya pelaksanaannya relatif murah. Identifikasi geminivirus juga dapat dilakukan melalui analisis western-blott.

Kata kunci: antiserum, deteksi, serologi, virus daun keriting kuning cabai

PENGANTAR

Serodiagnosis merupakan cara deteksi virus yang memanfaatkan reaksi antara antigen dan antibodi (Torrance *et al.*, 1992). Salah satu bahan dasar yang diperlukan untuk pengujian ini adalah tersedianya antibodi. Cara ini mempunyai banyak keuntungan antara lain cepat, akurat dan mudah (Clarck & Adams, 1977; Koenig, 1981; Van Regenmortel, 1982), dan telah banyak digunakan untuk berbagai deteksi dan identifikasi virus tumbuhan baik menggunakan sampel berupa tanaman ataupun serangga vektornya. Terdapat banyak cara yang digunakan untuk deteksi secara serologi, antara lain presipitasi dalam tabung, agglutinasi kloroplas, difusi agar ganda, flokulasi lateks (Ball *et al.*, 1990), *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) (Clarck & Adams, 1977; Koenig, 1981), *dot immunobinding assay* (DIBA) (Banttari & Goodwin, 1985) dan *immunoblotting* atau *western blotting* (Harlow & Lane, 1999).

Walaupun identifikasi secara serologi sudah umum diaplikasikan untuk berbagai virus tumbuhan, akan tetapi cara tersebut masih jarang dilakukan dan terbatas untuk beberapa anggota geminivirus. Morales *et al.*, (1990) melakukan deteksi *Bean golden mosaic virus* (BGMV) menggunakan metode difusi agar ganda untuk mengetahui kekerabatannya dengan anggota geminivirus lain. Deteksi geminivirus secara ELISA telah dilakukan pada *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV) (Trisusilowati, 1989), dan *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (McGrath & Harrison, 1995). Identifikasi *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) pada tomat di Jepang dilakukan secara *western blotting* (Kato *et al.*, 1998).

Oleh karena di Indonesia sejak tahun 2000 sampai saat ini terjadi epidemi penyakit daun keriting kuning cabai dan menimbulkan masalah besar maka perlu usaha pencegahan maupun pengendalian yang efektif. Salah satu cara yang banyak dilakukan adalah melalui deteksi secara serologi. Untuk mencapai tujuan ini maka perlu dibuat antiserum yang selanjutnya digunakan untuk berbagai uji serologi sehingga diperoleh cara untuk mendeteksi virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai secara cepat dan akurat.

Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan antiserum yang selanjutnya dapat digunakan sebagai alat deteksi dan identifikasi virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai pada tanaman maupun pada serangga vektornya (*Bemisia tabaci* Genn.).

METODE PENELITIAN

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian UGM, dan Laboratorium Virologi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian IPB dari bulan Mei sampai Nopember 2002.

Pembuatan Antiserum. Antiserum diproduksi dengan melakukan imunisasi kelinci jantan berumur sekitar 4 – 6 bulan. Imunisasi kelinci dengan dosis 220 ug dengan 4 kali injeksi dan interval waktu 2 minggu, melalui otot paha (*intramuscular*) dan vena telinga (*intravenous*). Pada injeksi pertama, virus murni dicampur *complete adjuvant*, sedangkan injeksi kedua dan ketiga, virus murni dicampur *incomplete*

adjuvant dengan perbandingan yang sama ($v/v = 1:1$). Setelah injeksi ketiga, lima hari sebelum antiserum dipanen dilakukan *booster* dengan menginjeksikan 50 ug virus murni tanpa ditambah dengan adjuvan ke dalam tubuh kelinci melalui otot paha. Antiserum yang dihasilkan langsung digunakan untuk pengujian, selain itu untuk meningkatkan kualitas juga dilakukan penyerapan menggunakan cairan perasan tanaman *Physalis floridana*, L sehat serta dimurnikan gamma-globulinnya secara parsial menggunakan sulfat amonium menggunakan metode Clarck & Adams (1977).

Kajian Serologi. Untuk melihat reaktivitas antibodi yang dihasilkan dilakukan berbagai kajian serologi yaitu secara I-ELISA (Koenig, 1981) dan DIBA (Banttari & Goodwin, 1985), maupun dengan cara immunoblotting atau western blotting (Harlow & Lane, 1999) menggunakan metode semidry blotting (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio Rad)

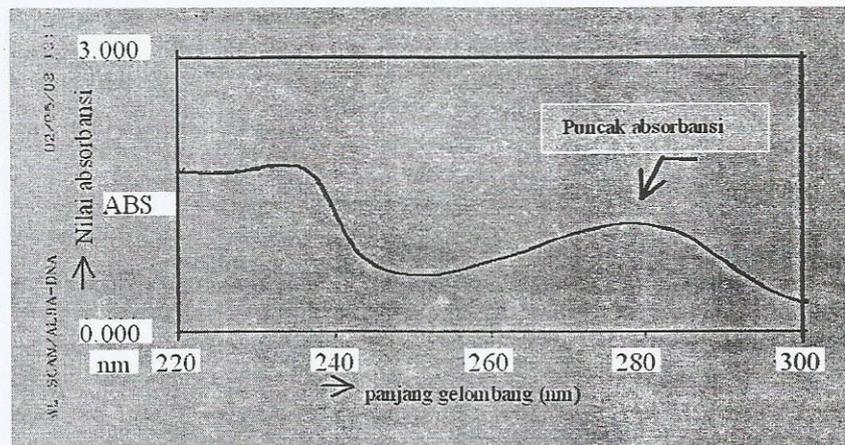
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kualitas Antiserum Yang Dihasilkan. Kelinci yang diimunisasi dengan geminivirus murni yang menyebabkan penyakit daun kering

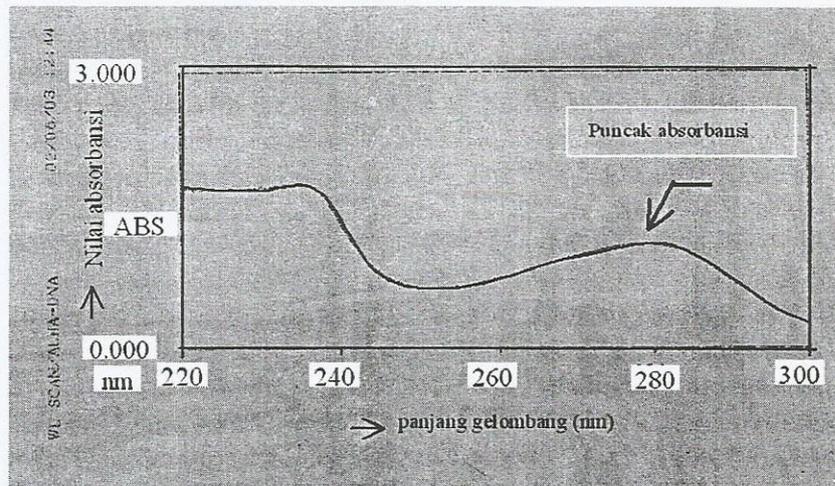
kuning cabai menghasilkan antiserum sekitar 9 ml. Nilai absorbansi dari antiserum kasar, antiserum yang sudah diserap menggunakan cairan perasan *P. floridana* sehat serta *gamma globulin* yang berasal dari pemurnian antiserum secara parsial menggunakan sulfat amonium, dapat dilihat pada Gambar 1, 2, dan 3.

Berdasarkan nilai absorbansi yang tercatat pada pengamatan menggunakan spektrofotometer, ketiganya menunjukkan suatu protein yaitu puncak absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Antiserum tersebut, setelah masing-masing diencerkan 10 kali, untuk antiserum kasar mempunyai nilai $A_{280} = 0,7$. Antiserum yang diserap mempunyai nilai $A_{280} = 0,6$ dan A_{280} untuk *gamma globulin* = 0,45. Konsentrasi protein diketahui berdasarkan pengukuran nilai $A_{280} = 1,4$ adalah setara dengan 1 mg/ml (Clarck & Adams, 1977). Untuk masing-masing perlakuan konsentrasinya pada antiserum kasar = 5000 ug/ml, antiserum yang diserap = 4300 ug/ml, dan antiserum yang telah dimurnikan sebagian = 3200 ug/ml.

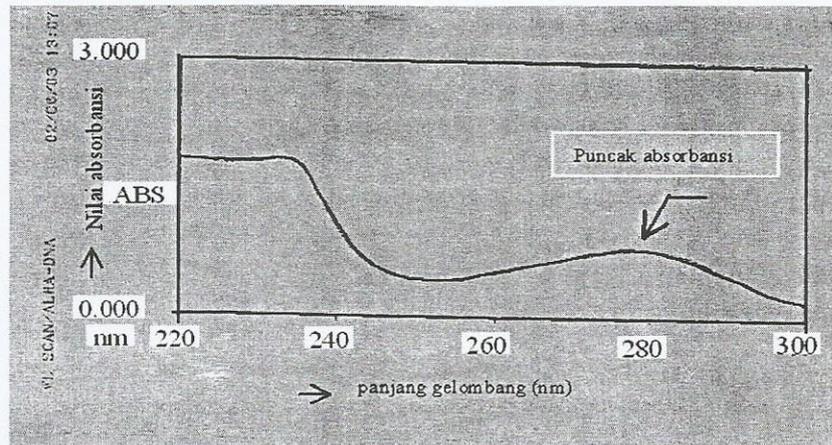
Gamma globulin yang berasal dari antiserum yang dipresipitasi menggunakan sulfat amonium konsentrasi proteinnya lebih kecil dibandingkan dengan antiserum yang tidak



Gambar 1. Absorbansi antiserum tidak diserap (antiserum diencerkan 10 kali).



Gambar 2. Absorbansi antiserum yang diserap menggunakan cairan perasan *P. floridana* sehat (antiserum diencerkan 10 kali).



Gambar 3. Absorbansi antiserum setelah dipresipitasi menggunakan sulfat amonium (antiserum diencerkan 10 kali).

diserap maupun yang diserap. Namun demikian, reaktivitasnya terhadap antigen paling tinggi dibandingkan dengan antiserum lainnya.

Menggunakan gamma globulin yang sudah dipisahkan dari protein lain yang terdapat dalam suatu antiserum dapat meningkatkan akurasi dan spesifitasnya dalam uji serologi. Gamma globulin murni juga dapat dilabel (konjugasi) dengan enzim tertentu untuk pengujian secara DAS-ELISA, atau dilabel dengan unsur radioaktif untuk pengujian dengan *radio immuno assay* (RIA).

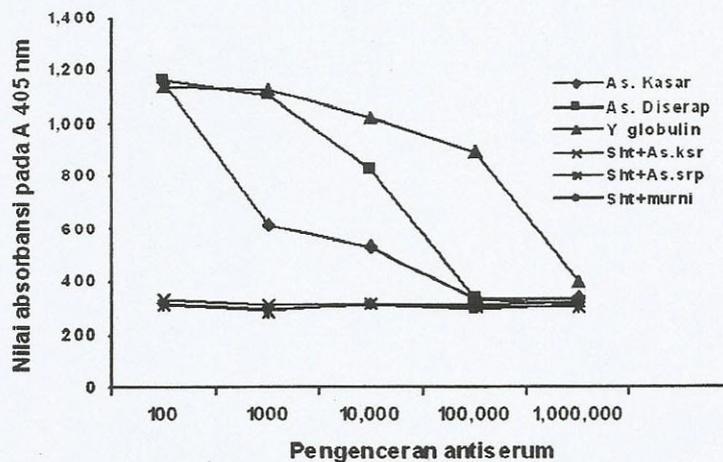
Kajian Serologi Geminivirus Titer antiserum. Antiserum yang tidak diserap maupun yang diserap mempunyai titer 1/10.000, sedangkan gamma globulin mempunyai titer 1/100.000 (Gambar 4). Titer antiserum geminivirus yang diuji secara ELISA pada penelitian ini masih rendah dibandingkan dengan kelompok virus lain. Banyak faktor yang berpengaruh terhadap titer antiserum. Faktor tersebut antara lain: jenis virus, dosis imunisasi, cara imunisasi, dan faktor yang

terdapat dalam hewan percobaan yang digunakan antara lain jenis kelamin, umur, kesehatan, dan nutrisi makanan (Ball *et al.*, 1990). Rendahnya titer yang dihasilkan dalam penelitian ini mungkin disebabkan oleh dosisnya yang kurang tepat karena belum ada laporan tentang dosis optimalnya, cara imunisasinya ataupun oleh sifat geminivirus tersebut. Geminivirus merupakan salah satu kelompok virus yang sulit dimurnikan, konsentrasi virus dalam tanaman sangat rendah, dan daya imunogeniknya rendah (*cit. Rojas et al.*, 1993; Van Regenmortel *et al.*, 2000). Di lain pihak kelompok Tobamovirus, misalnya Tobacco mosaic virus (TMV) sering dijadikan model dalam pengujian serologi karena daya imunogeniknya sangat tinggi (Van Regenmortel, 1982; Van Regenmortel *et al.*, 2000).

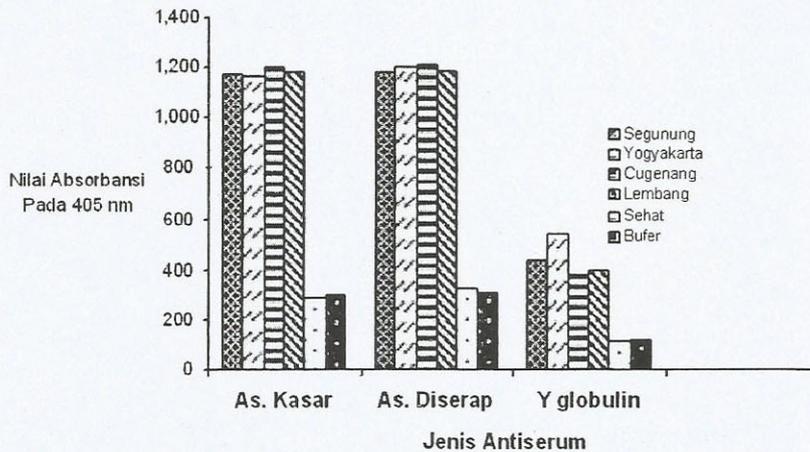
Uji serologi secara I-ELISA. Untuk melihat reaktivitas antiserum pada pengujian secara I-ELISA dan DIBA dibuat pengenceran antiserum 1000 kali, sedangkan untuk sampelnya (tanaman ataupun serangga) diencerkan 100 kali. Hasil pengujian secara I-

ELISA menggunakan sampel tanaman dapat dilihat pada Gambar 5, dan 6.

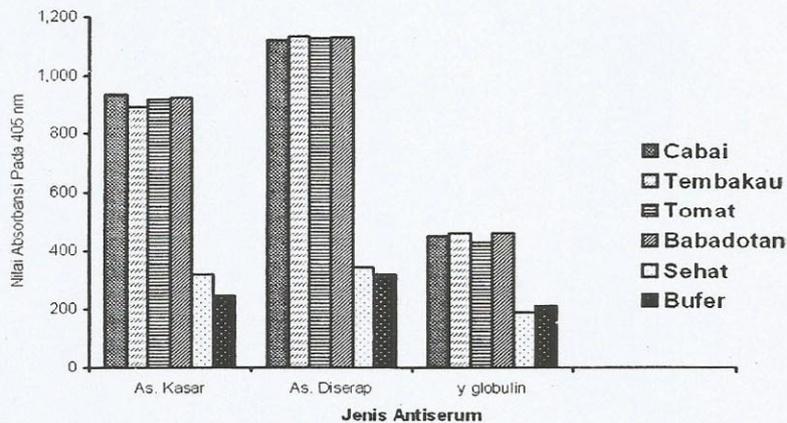
Reaktivitas antiserum terhadap antigen yang homolog (isolat cabai Segunung) sangat kuat dan dapat dibedakan dengan jelas antara sampel tanaman sakit dengan tanaman yang sehat. Sampel tanaman sakit (daun keriting kuning) yang berasal dari lokasi yang berbeda misalnya isolat Yogyakarta, Cugenang dan Lembang juga dapat dideteksi dengan baik menggunakan tiga macam antiserum seperti halnya isolat dari Segunung. Menggunakan tiga macam antiserum yang dihasilkan, melalui uji secara I-ELISA selain dapat mendeteksi geminivirus yang menyerang cabai juga dapat mendeteksi geminivirus yang menyerang tanaman lain yaitu tembakau, tomat dan babadotan. Pada Gambar 5 dan 6 tampak bahwa pada antiserum yang sudah dimurnikan sebagian walaupun nilai absorbansinya paling rendah akan tetapi reaktivitasnya paling baik dibandingkan dengan antiserum kasar ataupun yang sudah diserap menggunakan sap tanaman sehat. Hal tersebut tampak dari nisbah absorbansi antara sampel yang sakit dibandingkan dengan sampel sehat maupun



Gambar 4. Titer antiserum terhadap geminivirus isolat cabai yang masih kasar, diserap menggunakan sap tanaman sehat, dan gamma globulin berdasarkan pengujian secara I-ELISA.



Gambar 5. Reaktivitas antiserum terhadap geminivirus isolat kuning cabai pada isolat-isolat dari berbagai lokasi (Segunung, Yogyakarta, Cugenang dan Lembang) dalam I-ELISA.

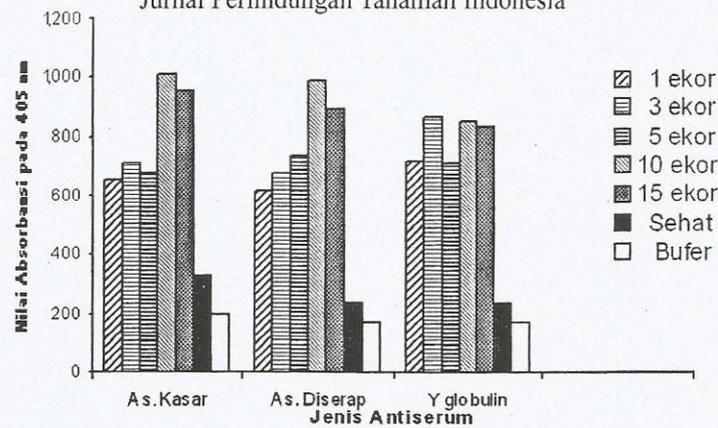


Gambar 6. Reaktivitas antiserum terhadap geminivirus isolat cabai pada berbagai inang (cabai, tembakau, tomat dan babadotan) dalam I-ELISA.

bufernya pada antiserum yang dimurnikan sebagian nilainya lebih tinggi dibandingkan dengan antiserum kasar maupun yang diserap. Spesifitas dan akurasi uji serologi sangat dipengaruhi oleh tingkat kemurnian antiserum yang digunakan. Gamma-globulin merupakan protein spesifik yang sudah dipisahkan dari protein lain yang terdapat dalam suatu antiserum. Protein tersebut akan bereaksi dengan antigen tertentu sehingga spesifitas dan akurasinya lebih tinggi dibandingkan antiserum kasar ataupun yang sudah diserap yang disebabkan keduanya masih tercampur dengan protein lain.

Selain menggunakan sampel berasal dari tanaman, juga dilakukan pengujian I-ELISA menggunakan sampel asal serangga vektornya yaitu kutukebul tembakau yang viruliferus. Hasil pengujiannya dapat dilihat pada Gambar 7.

Uji serologi secara DIBA. Pada Gambar 8 dan 9 dapat dilihat hasil pengujian reaktivitas antiserum melalui pengujian DIBA terhadap berbagai sampel tanaman sakit yang berasal dari lokasi dan inang yang berbeda. Gambar 10 menunjukkan reaktivitas antiserum terhadap sampel yang berasal dari serangga



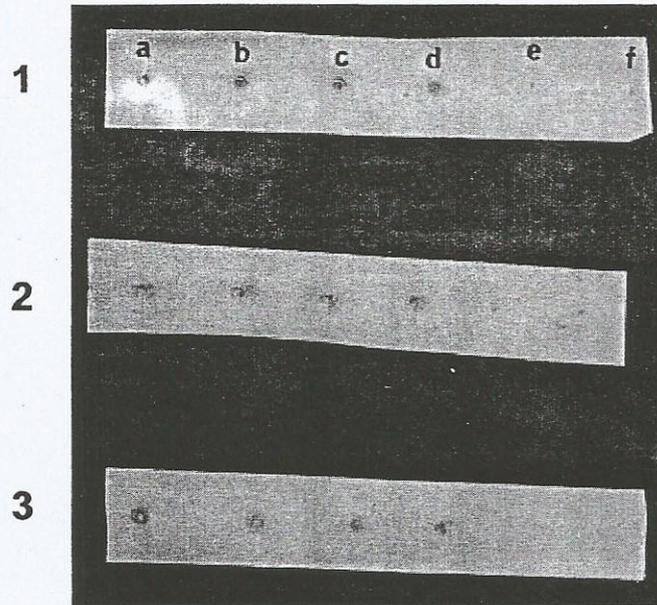
Gambar 7. Reaktivitas antiserum terhadap geminivirus isolat cabai pada *B. tabaci* viruliferus dalam I-ELISA.

vektornya yaitu kutukebul tembakau yang viruliferus.

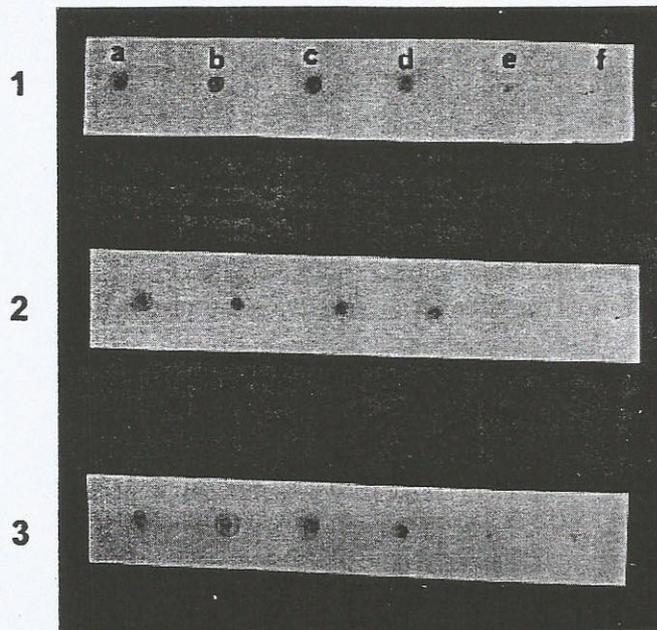
Melalui uji I-ELISA dan DIBA diketahui bahwa antiserum yang dihasilkan dapat mengidentifikasi geminivirus yang menyerang cabai dari berbagai lokasi (Segunung, Yogyakarta, Cugenang dan Lembang). Antiserum juga dapat digunakan untuk mendeteksi geminivirus yang menyerang tanaman inang yang berbeda (cabai, tomat, tembakau dan babadotan). Reaktivitas antiserum ternyata sama terhadap sampel yang berasal dari tanaman cabai dari berbagai lokasi maupun inang yang berbeda.

Reaktivitas yang sama pada isolat yang berbeda tersebut disebabkan karena sifat antiserum yang digunakan dalam pengujian masih poliklonal sehingga mampu mengenali berbagai epitop dari protein selubung virus. Jenis epitop yang ada sangat dipengaruhi oleh jenis protein yang tersusun dari beberapa macam asam amino. Gen penyandi protein selubung dari genus *Begomovirus* diketahui mempunyai runutan susunan DNA dengan derajat kesamaan yang sangat tinggi (*conserved*) antar anggotanya (Rojas *et al.*, 1993, Wyatt & Brown, 1996). Hal ini memungkinkan terbentuknya epitop yang sama

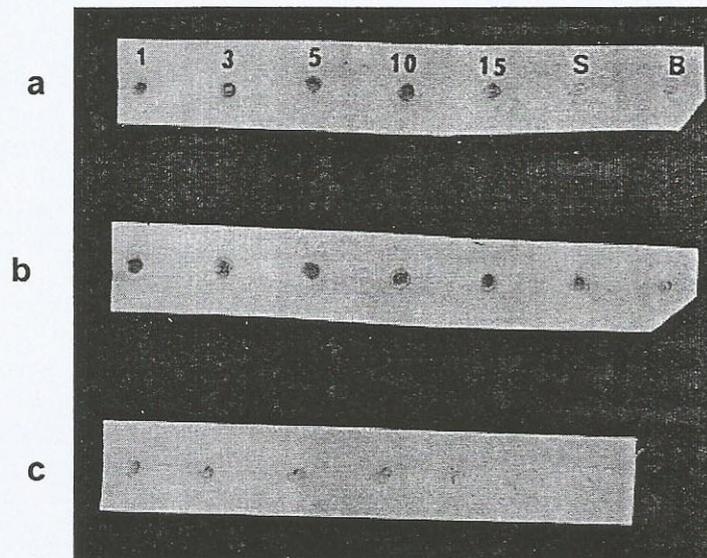
di antara anggota genus geminivirus tersebut sehingga reaktivitas yang terjadi antar anggotanya tidak dapat dibedakan. McGrath & Harrison (1995) melaporkan bahwa geminivirus yang ditularkan *B. tabaci* pada berbagai inang di daerah tropik maupun subtropik mempunyai reaktivitas serologi yang sama terhadap antiserum poliklonal yang dibentuk oleh salah satu jenis anggotanya. Sebaliknya apabila menggunakan antibodi monoklonal dapat dikenali adanya perbedaan strain geminivirus tersebut. Pada umumnya deteksi geminivirus secara serologi, apabila menggunakan antiserum poliklonal akan terjadi reaksi silang dengan antigen heterolog, dan hal ini sering menjadi kendala dalam proses pengujiannya (Rojas *et al.*, 1993, Van Regenmortel *et al.*, 2000). Hal ini terjadi antara lain, antiserum poliklonal *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) bereaksi positif dengan BGMV dan *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) (Onuki *et al.*, 2000). Morales *et al.* (1990) juga melaporkan bahwa antiserum poliklonal *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) bereaksi dengan *African cassava mosaic* (ACMV), BGMV, MYMV dan *Tomato golden mosaic virus* (TGMV). Di lain pihak



Gambar 8. Reaktivitas antiserum terhadap virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai dari berbagai lokasi (Segunung, Yogyakarta, Cugenang dan Lembang) dalam DIBA. Keterangan: (1) antiserum kasar, (2) antiserum yang diserap dan (3) gamma globulin (a) isolat Segunung, (b) isolat Yogyakarta, (c) isolat Cugenang, (d) isolat Lembang, (e) tanaman sehat, (f) bufer.



Gambar 9. Reaktivitas antiserum terhadap virus penyebab penyakit daun keriting kuning dari berbagai inang (cabai, tembakau, tomat dan babadotan) dalam DIBA. Keterangan: (1) antiserum kasar, (2) antiserum yang diserap dan (3) gamma globulin (a) isolat cabai, (b) isolat tembakau, (c) isolat tomat, (d) isolat babadotan, (e) tanaman sehat, (f) bufer.



Gambar 10. Reaktivitas antiserum terhadap ekstrak *B. tabaci* viruliferus secara DIBA. Keterangan: (a) antiserum kasar, (b) antiserum yang diserap dan (c) gamma globulin 1,3, 5, 10 dan 15 : jumlah serangga yang diuji, (S) tanaman sehat, (B) bufer

menggunakan antibodi monoklonal dapat membedakan strain ACMV yang menyerang ketela pohon di Afrika (*cit.* Brown, 1997).

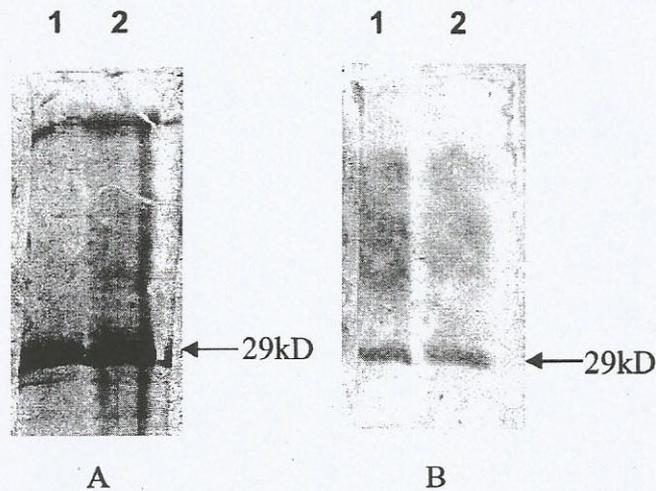
Antiserum yang dihasilkan dalam penelitian ini selain dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan geminivirus pada sampel tanaman sakit juga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan virus tersebut pada serangga vektornya melalui pengujian secara I-ELISA maupun DIBA. Menggunakan satu ekor *B. tabaci* sudah dapat terdeteksi keberadaan virusnya. Hal ini sangat bermanfaat sebagai alat deteksi dini untuk mencegah timbulnya epidemi penyakit tersebut yang ditularkan oleh serangga vektor.

Uji serologi secara DIBA lebih menguntungkan dibandingkan dengan teknik ELISA. Metode DIBA lebih mudah dan cepat, biayanya lebih murah karena hanya diperlukan reagen yang lebih sedikit. Metode pengujian tersebut dapat dilakukan di laboratorium yang kondisinya terbatas dan sangat cocok diaplikasikan di lapangan.

Analisis western blotting. Pada penelitian ini, antiserum yang dihasilkan setelah diencerkan 1000 kali, baik yang masih kasar ataupun yang sudah diserap dengan cairan perasan *P. floridana* sehat, dapat digunakan mendeteksi adanya pita (*band*) yang berukuran sekitar 29 kDa. Hasil analisis protein selubung virus secara western blotting dapat dilihat pada Gambar 11.

Ukuran pita tersebut sesuai dengan berat molekul protein selubung geminivirus yang digunakan untuk imunisasi pada hewan percobaan. Hal ini dapat membuktikan bahwa antiserum yang dihasilkan berasal dari virus murni yang digunakan sebagai imunogen dan bukan dari antigen lain. Cara ini selain dapat digunakan untuk mengidentifikasi suatu virus juga dapat digunakan untuk mengetahui kemurnian suatu antigen yang digunakan untuk pembuatan antiserum.

Anggota geminivirus lain yang berhasil dideteksi secara western blotting antara lain TYLCV pada tomat (Kato *et al.*, 1998)



Gambar 11. Hasil analisis secara *western blotting* protein selubung geminivirus.
Keterangan: (A) antiserum kasar,
(B) antiserum yang sudah diserap dengan sap tanaman sehat
(1 dan 2) sampel berupa virus hasil pemurnian

menggunakan antiserum dari TYLCV dan SPLCV pada ubi jalar menggunakan antiserum dari BGMV dan MYMV (Onuki *et al.*, 2000). Identifikasi geminivirus menggunakan metode ini, selain sampel berupa virus murni, juga dapat digunakan sampel berupa cairan perasan yang sudah dipresipitasi menggunakan sulfat amonium ataupun yang sudah dimurnikan sebagian secara sentrifugasi.

KESIMPULAN

Antiserum yang dihasilkan dapat digunakan untuk mendeteksi geminivirus pada tanaman maupun pada serangga vektornya. Menggunakan satu ekor serangga vektor sudah dapat dideteksi keberadaan geminivirus dengan baik. Terdeteksinya virus penyebab penyakit melalui serangga vektornya sangat berguna karena dapat dimanfaatkan untuk kajian epidemi penyakit di lapangan.

Teknik I- ELISA dan DIBA sangat potensial untuk digunakan sebagai alat deteksi geminivirus karena dapat dilakukan dengan mudah, memberikan hasil dalam waktu singkat dan biaya pelaksanaannya relatif murah. Selain itu teknik serologi tersebut cukup peka untuk mendeteksi virus dalam bahan tanaman maupun serangga vektornya. Uji serologi secara DIBA lebih cepat, mudah dan ekonomis dibandingkan dengan ELISA.

Analisis western blotting selain bermanfaat untuk mengetahui tingkat kemurnian suatu antigen juga dapat digunakan untuk deteksi keberadaan geminivirus pada tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

Ball, E. M., R.O. Hampton, S.H. de Boer, & N.W. Schaad. 1990. Polyclonal antibodies. p. 33 – 54. In R.O. Hampton, E.M. Ball, & S.H. De Boer (eds.), *Serological methods*. APS Press, Minnesota.

- Banttari, E. E. & P.H. Goodwin. 1985. Detection of *Potato virus S, X and Y* by enzyme-linked immuno- sorbent assay on nitrocellulose membranes (Dot ELISA). *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 69: 202 – 205.
- Brown, J.K. 1997. The biology and molecular epidemiology of geminivirus subgroup III. P. 125 – 195. Di dalam: Stacey G., N.T. Keen (Eds.), *Plant Microbe Interactions*. Vol.2. Int. Thomson Publ.
- Brown, J. F. & H. J Ogle. 1997. *Plant Pathogens and Plant Diseases*. Rockvale Publ. Australia. 556 p.
- Clarck, M. F. & A.N. Adams. 1977. Characteristics of microplate methods of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. gen. Virol.* 34: 475 – 483.
- Harlow, E. & D. Lane. 1999. *Using antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab., New York. 358 p.
- Kato, K., M. Onuki, S. Fuji, & K. Hanada. 1998. The first occurrence of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Japan. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 64: 552 – 559.
- Koenig R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. gen. Virol* 55:53-62.
- Matthews, R. E. F. 1992. *Foundamentals of plant virology*. Acad. Press, Inc., California. 403 p.
- McGrath, P. F. & B.D. Harrison. 1995. Transmission of *Tomato leaf curl geminiviruses* by *Bemisia tabaci*: effects of virus isolate and vector biotype. *Ann. Appl. Biol.* 1995 (126) : 307-316.
- Morales, F., A. Niessen, B. Ramirez, & M. Castano. 1990. Isolation and partial characterization of a geminivirus causing Bean dwarf mosaic. *Phytopath.* 80: 96 – 101.
- Onuki, M., Y. Honda, & K. Hanada. 2000. Geminate particle morphology of *Sweet potato leaf curl virus* in partially purified preparation and its serological relationship to two Begomoviruses by western blotting. *J. Gen. Plant Path.* 66: 182 – 184.
- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell, & D.P. Maxwell. 1997. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminivirus. *Plant Dis.* 77: 340 – 347.
- Torrance L. 1992. Serological methods to detect plant viruses: Production and use of monoclonal antibodies. p. 7 – 45. In J.M. Duncan, L. Torrance. editor. *Technique for the rapid detection of plant pathogens*. Balckwell Scientific Publications.
- Trisusilowati, E. B. 1989. Studi sifat virus penyebab penyakit kerupuk pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L.). *Disertasi S3*. Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.
- Van Regenmortel, M. V. H. 1982. *Serology and immunochemistry of plant viruses*. Acad. Press, New York. 302 p.
- Van Regenmortel M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carsthis, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. Mc Geoch, C.R. Pringle, & R.B. Wickner. 2000. *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh report of the ICTV. Acad. Press. 1162 p.
- Wyatt, S. D. & J.K. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminiviruses isolates in leaf extract by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopath.* 86: 1288 – 1293.