

IDENTIFIKASI SPESIES *POTYVIRUS* PENYEBAB PENYAKIT MOSAIK PADA TANAMAN CABAI (*Capsicum frutescens* L.) MELALUI SIKUEN NUKLEOTIDA GEN *Coat Protein*

I Gede Rian Pramarta¹, I Gede Rai Maya Temaja^{1*}), I Dewa Nyoman Nyana¹, dan Gede Suastika²

¹Program Magister Bioteknologi Pertanian, Program Pascasarjana Universitas Udayana

²Laboratorium Virologi Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor Bogor

*) Corresponding author at : Jl. PB. Sudirman Denpasar Bali Indonesia
E-mail: tderai@yahoo.com

Abstract

Chili peppers (*Capsicum frutescens* L.) is one of the important vegetable in the world and one of the leading horticultural commodities in Indonesia. Pepper plants grown in all provinces in Indonesia and got priority for development because it has great potential economic value. These researches was conducted in order to determine the type of infecting *Potyvirus* on chili and know the proximity nucleotide sequence of *Potyvirus* infecting chili crop in Kerta village, Payangan, Gianyar, Bali, with the kind of *Potyvirus* in other areas. This study use RT-PCR technique to detect plant viruses and continued with tracing sequence *coat protein* gene nucleotide to its proximity to some of the isolates analyzed from *GeneBank*. The results showed that the infecting *Potyvirus* chili crop is *Chili veininal motle virus* species (ChiVMV) with size of approximately 900 bp DNA band, and based on phylogenetic analysis of *coat protein* gene nucleotide sequence, PayanganIndo isolate had high similarity (93%) and small genetic distance (0.041) with isolate of origin Thailand state.

Keywords: Chili pepper, mosaic, *Potyvirus*, *coat protein*.

1. Pendahuluan

Cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.) merupakan salah satu sayuran penting di dunia dan salah satu komoditas unggulan hortikultura di Indonesia. Tanaman cabai ditanam di seluruh provinsi di Indonesia dan mendapat prioritas untuk dikembangkan karena memiliki nilai ekonomi yang sangat potensial (Sulandari, 2004). Infeksi *Potyvirus* di daerah sentra tanaman cabai di Indonesia dilaporkan cukup tinggi. Infeksi *Potyvirus* pada tanaman cabai dapat menurunkan hasil tanaman secara signifikan. Survei yang dilakukan pada tahun 2005 melaporkan kejadian penyakit *Potyvirus* di lapangan dapat mencapai 100% (Opriana, 2009). Tanaman cabai yang terinfeksi pada daunnya akan memperlihatkan gejala belang-belang hijau gelap, bercak-bercak hijau gelap, dan

kadang-kadang pola-pola tersebut menyatu ke tulang daun di dekatnya, *leaf cupping* dan nekrosis (Sulyo *et al.*, 1995).

Gejala yang disebabkan oleh *Potyvirus* bervariasi karena gejala yang muncul pada tanaman dipengaruhi oleh inang, strain virus, waktu infeksi dan kondisi lingkungan. Berkaitan dengan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi penyakit *Potyvirus* pada tanaman cabai. Identifikasi virus secara molekuler dengan menganalisis sikuen nukleotida serta mencari kedekatan dari sikuen nukleotida virus tersebut dengan sikuen nukleotida homolognya di *GeneBank* diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk tindakan pengendalian penyebaran virus selanjutnya. Berkaitan dengan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian untuk dapat mengidentifikasi penyakit *Potyvirus* pada tanaman cabai. Identifikasi virus secara molekuler dengan analisis sikuen nukleotida serta mencari kedekatan dari sikuen nukleotida virus tersebut dengan sikuen nukleotida dari beberapa daerah lain diharapkan dapat digunakan sebagai acuan untuk tindakan pengendalian penyebaran virus.

2. Bahan dan Metode

2.1 Deteksi virus dengan RT-PCR

Tahapan RT-PCR terdiri dari ekstraksi RNA total, sintesis *complementary* (c) DNA, amplifikasi DNA virus target, dan visualisasi hasil amplifikasi. Total RNA diekstraksi dari jaringan daun tanaman cabai menggunakan *Thermo scientific GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit*. RNA total yang diperoleh selanjutnya ditranskripsikan menjadi DNA komplemen (cDNA) dengan menggunakan teknik *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) pada mesin PCR. Komposisi reagen RT adalah sebagai berikut: 3,7 µl H₂O, 2 µl Buffer RT 10x, 0,5µl DTT (*dithiothreitol*) 50 mM, 0,35 µl dNTP (*deoksiribonukleotida triphosphate*) 10 mM, 0,35 µl MMuLV (*Moloney Murine Leukimia Virus*), 0,35 µl RNase Inhibitor, 0,75 µl Oligo d(T) 10 µM, 0,75 µl Random heksamer, 2 µl template RNA. Reaksi RT dilakukan dalam sebuah *Automated Thermal Cycler (Gene Amp PCR System 9700 thermocycler; perkin-Elmercorp.*, Norwalk, CT) diprogram untuk satu siklus pada suhu 25^oC selama 5 menit, 42^oC selama 60 menit, dan 70^oC selama 15 menit.

Tahapan dilanjutkan dengan amplifikasi cDNA dilakukan dengan teknik PCR dengan pasangan primer yaitu: ChiVMV F Ind (5'- AACCTGAG CGTATAGTTTCA-3') dan ChiVMV R Ind (5'- TACGCTTCAGCAAG ATTGCT-3'). Kedua primer tersebut merupakan primer yang dapat mengamplifikasi bagian *coat protein* (CP) virus yang berukuran sekitar 900 bp. Amplifikasi dengan PCR dilakukan sebanyak 35 kali dengan tahapan sebagai berikut : predenaturasi pada suhu 94^oC selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94^oC selama 1 menit, *annealing* pada suhu 50^oC selama 1 menit, sintesis DNA

pada suhu 72°C selama 2 menit, pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 5 menit dan suhu 4 °C untuk suhu penyimpanan (Jan *et al.*, 2000).

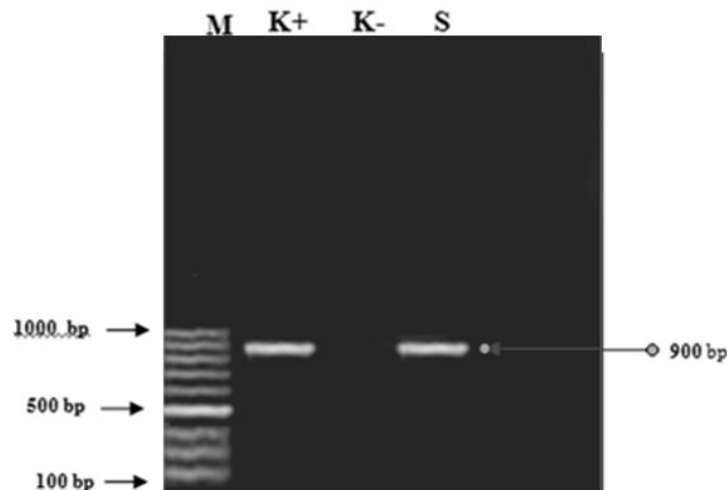
2.2 Sikuen Nukleotida dan Analisis Filogenetika

Peruntukan DNA CP- *Potyvirus* dari hasil amplifikasi PCR dilakukan di PT. Genetika Sience Indonesia. Sikuen gen *coat protein* (CP) dianalisis untuk mengetahui tingkat homologi dengan sikuen yang telah dideposit pada *GeneBank* menggunakan *software* BLAST (*Basic Local Alignment Search Tools*) (NCBI 2014). Data sikuen nukleotida yang terpilih kemudian dimodifikasi dan analisis spesifisitas nukleotida dilakukan dengan program *multiple alignment*, ClustalW dengan *software* Bioedit V. 7.0.5. *Alignment* dilakukan dengan membandingkan homologi isolat *Potyvirus* sampel dengan 11 isolat *Potyvirus* dari beberapa daerah atau negara dan 1 isolat CMV sebagai pembanding diluar grup (*outgroup*). Pohon filogenetika dikonstruksi menggunakan program MEGA 5.05 berdasarkan pendekatan *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA).

3. Hasil dan Pembahasan

3.1 Deteksi dengan RT-PCR

Sampel dengan gejala *Potyvirus* diambil di kawasan Desa Kerta, Payangan (isolat PayanganIndo), yang kemudian dideteksi dengan RT-PCR menggunakan primer spesifik ChiVMV dengan produk PCR sekitar 900 bp. Pada penelitian ini dengan menggunakan teknik RT-PCR berhasil mengamplifikasi sampel tanaman dari Desa Kerta, Payangan, Gianyar, Bali, dengan produk PCR sekitar 900 bp sesuai dengan analisis primer yang digunakan (Tsai *et al.*, 2008 ; Manzila *et al.*, 2011). (Gambar 1).



Gambar 1. Gambar hasil elektroforesis produk RT-PCR isolat PayanganIndo dengan menggunakan primer ChiVMV F Ind dan ChiVMV R Ind. M: 100 bp DNA ladder. K-: control negatif. K+: Kontrol positif (ChiVMV isolate bogor). S: Sampel PayanganIndo.

3.2 Analisis Homologi Sikuen Gen Coat Protein Potyvirus

Isolat ChiVMV PayanganIndo kemudian dibandingkan dengan 11 isolat virus ChiVMV yang berasal dari beberapa negara maupun daerah di Indonesia serta satu isolat virus CMV sebagai pembanding *outgroup*. Untuk tingkat kesamaan antara isolat ChiVMV PayanganIndo dengan isolat ChiVMV dari daerah maupun negara lain dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengujian tingkat homologi antar isolat menunjukkan bahwa ChiVMV PayanganIndo mempunyai kesamaan sebesar 99% dengan isolat ChiVMV PatarumanIndo serta mempunyai kesamaan sebesar 93% dengan isolat ChiVMV Thailand. Hasil analisis tersebut membuktikan bahwa isolat-isolat tersebut merupakan kelompok virus yang sama (Frankel *et al.*, 1989). Suatu virus memiliki tingkat kesamaan nukleotida kurang dari 79,4%, virus tersebut termasuk kedalam kelompok *Potyvirus* lainnya (Tsai *et al.*, 2008).

Tabel 1. Tingkat kesamaan isolat ChiVMV dari beberapa negara.

No	Isolat/nomor aksesi	Tingkat Kesamaan (%)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	PayanganIndo	-											
2	PatarumanIndo/ DQ854961.1	99	-										
3	CikabayanIndo/ DQ854960.1	97	97	-									
4	BellaryIndia/ EF213685.1	94	93	94	-								
5	Thailand/ DQ925442.1	93	94	95	93	-							
6	Vietnam/ DQ925442.1	92	92	93	94	93	-						
7	China1/ DQ854950.1	89	89	90	92	92	90	-					
8	China2/ KF738253.1	77	77	77	78	78	77	77	-				
9	china3/ HQ317867	77	77	78	78	79	77	77	99	-			
10	China4/ KC693766.1	77	77	78	78	78	77	77	99	99	-		
11	Taiwan/ DQ854946.1	89	89	90	92	92	90	99	77	77	77	-	
12	Jepang/ AB012221.1	89	89	90	92	90	90	93	77	78	78	93	-

Analisis sikuen nukleotida dengan *ClustalW* menunjukkan bahwa isolat PayanganIndo memiliki homologi yang tinggi dengan isolat-isolat ChiVMV berasal dari negara lain seperti India, Vietnam dan Thailand. Hasil analisis penyejajaran sikuen juga memperkuat hal tersebut, dengan nilai similaritas berkisar 92-94% yang mengindikasikan kemiripan sikuen nukleotida antar isolat yang sangat tinggi (Tabel 1). Hasil analisis similaritas menunjukkan bahwa isolat PayanganIndo adalah strain yang sama dengan ChiVMV dari India, Vietnam dan Thailand yang secara geografis berada di Asia Tenggara dan Asia Selatan. Isolat dari Thailand memiliki similaritas paling tinggi dengan isolat yang berasal dari Indonesia.

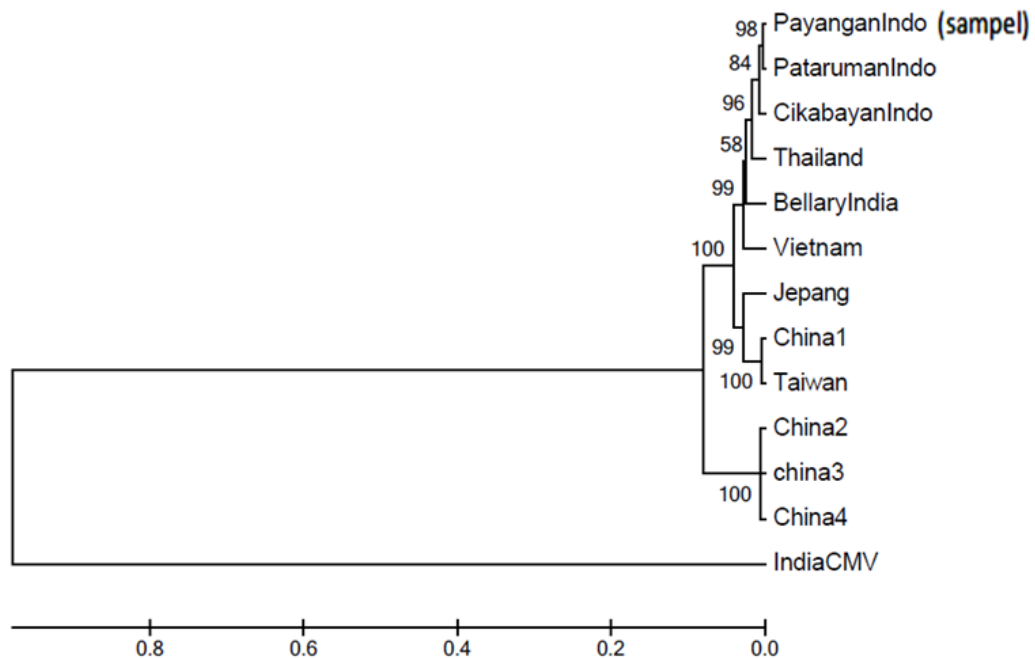
Jarak genetik merupakan tingkat perbedaan gen diantara populasi atau spesies (NEI, 1987). Jarak genetik antar isolat ChiVMV berkisar antara 0,007-

1,762 (Tabel 2). Jarak genetik menunjukkan dekat atau tidaknya hubungan kekerabatan antara sikuen nukleotida yang diamati. Jarak genetik antar isolat ChiVMV yang menginfeksi tanaman cabai dapat dilihat pada Tabel 2. Isolat-isolat tersebut berasal dari beberapa daerah di Indonesia serta berasal dari beberapa negara yang secara geografis berada di benua Asia.

Tabel 2. Matrik jarak genetik isolat ChiVMV yang berasal dari daerah dan negara berbeda berdasarkan runutan gen *coat* protein.

No. Isolat	Jarak Genetik												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. PayanganIndo													
2. PatarumanIndo	0.007												
3. CikabayanIndo	0.028	0.02											
4. BellaryIndia	0.053	0.058	0.059										
5. Thailand	0.041	0.033	0.03	0.05									
6. Vietnam	0.069	0.069	0.064	0.058	0.055								
7. China1	0.09	0.09	0.09	0.078	0.081	0.091							
8. China2	0.152	0.148	0.141	0.145	0.138	0.153	0.156						
9. China3	0.144	0.14	0.133	0.137	0.13	0.146	0.153	0.011					
10. China4	0.146	0.141	0.135	0.139	0.132	0.147	0.155	0.007	0.006				
11. Taiwan	0.093	0.093	0.092	0.077	0.081	0.088	0.012	0.16	0.156	0.158			
12. Jepang	0.099	0.099	0.097	0.08	0.092	0.101	0.056	0.149	0.147	0.146	0.054		
13. IndiaCMV	1.762	1.753	1.772	1.81	1.782	1.792	1.739	1.79	1.779	1.782	1.749	1.719	

Berdasarkan Tabel 2, isolat PayanganIndo mempunyai jarak genetik terkecil (0,007) dengan isolat ChiVMV PatarumanIndo dan mempunyai jarak genetik 0,041 dengan isolat dari Thailand. Analisis filogenetika menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan isolat tersebut terbagi menjadi beberapa kelompok (Gambar 2).



Gambar 2. Hubungan kekerabatan 13 isolat virus hasil analisis kelompok berdasarkan pola pita DNA dengan metode UPGMA. Skala menunjukkan panjang cabang. Angka pada garpu merupakan persentase tingkat kepercayaan pengelompokan.

Isolat PayanganIndo dan PatarumanIndo berada satu kelompok. Isolat asal Indonesia mempunyai similaritas tinggi dengan isolat yang berasal dari Asia Tenggara dan Asia Selatan yaitu isolat Thailand, BellaryIndia dan Vietnam. Isolat yang berasal dari negara China yaitu isolat China 1, 2, 3 dan 4 mempunyai similaritas tinggi dengan isolat Jepang dan Taiwan. Berdasarkan letak geografis kelompok tersebut termasuk dalam wilayah Asia Timur. Isolat IndiaCMV berada diluar kelompok isolat ChiVMV.

ChiVMV ditularkan melalui vektor secara non persisten dan mekanis, namun melihat hasil analisis filogenetika, dimana similaritas yang tinggi antara isolat PayanganIndo dengan negara lain menunjukkan adanya kemungkinan penularan melalui benih karena adanya penyebaran benih lintas negara. Spesies ChiVMV belum ada laporan yang menyatakan penularan melalui benih. Tindak lanjut yang dapat diambil berdasarkan analisis filogenetika tersebut yaitu dengan lebih mewaspadaai impor benih pertanian dari negara yang dianggap menjadi asal dari virus tanaman. Beberapa spesies dari golongan *Potyvirus* dilaporkan dapat ditularkan melalui benih yaitu *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV), *bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Soybean mosaic virus* (SMV), *Soybean stunt virus* (SSV) dan *bean common mosaic virus* (BCMV) (Provvidenti and Gonsalves, 1984; Roechan, 1992; Iwaki and Auzay, 1977).

Protein yang terdapat pada CP-ChiVMV berkaitan dengan infektivitas dan penyebaran virus dari sel ke sel serta ke seluruh jaringan tanaman. Kajian yang mendalam tentang peranan CP-ChiVMV perlu dilakukan untuk menentukan strategi pengendalian ChiVMV yang efektif (Manzila *et al.*, 2011).

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan di atas maka dapat disimpulkan, jenis *Potyvirus* yang menginfeksi pertanaman cabai di daerah Kerta, Payangan, Gianyar, Bali adalah *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV). Isolat *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) PayanganIndo mempunyai kedekatan dengan isolat ChiVMV yang berasal negara Thailand.

Ucapan Terima kasih

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

Daftar Pustaka

- Frankel M.J., C.W. Ward, D.D. Shukla. 1989. The use of 3' Non Coding Nucleotide Sequences in Taxonomy of Potyviruses: Application to Watermelon Mosaic Virus2 and Soybean Mosaic Virus-N. J. Gen. Virol. 70:2775-2783.
- Iwaki, M. and H. Auzay. 1977. Virus Diseases of Mungbean in Indonesia. Proc the Ist International Mungbean Symposium. AVRDC. p. 169-172.
- Jan, F.J., C. Fagoaga, S.Z. Pang, and D., Gonsalves. 2000. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology dependent gen silencing. J. Gen. Virol. 81: 2103-2109.
- Manzila, I., S.R. Hidayat, I. Mariska, S. Sujiprihati. 2011. Virulensi Empat Isolat *Chilli Veinal Mottle Potyvirus* Pada Tanaman Cabai (*Capsicum Annuum* L.) . J. HPT Tropika. 11 (2) : 122-129.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetic*. Columbia University Press. USA.
- Opriana, E. 2009. "Metode Deteksi untuk Pengujian Respon Ketahanan Beberapa Genotipe Cabai terhadap Infeksi *Chilli Veinal Mottle Potyvirus* (ChiVMV)" (*tesis*). Departemen Proteksi Tanaman IPB.
- Provvidenti, R. and Gonsalves, D. 1984. "Occurrence of Zucchini Yellow Mosaic Virus in Cucurbits from Connecticut, New York, Florida, and California". Plant Disease 68 (5): 443-446.
- Roechan, M. 1992. Virus-virus pada kedelai (*Glycinemax* (L) Merr.) di Jawa dan Lampung: identifikasi, penyebaran, dan kemungkinan pengendaliannya. Disertasi. Universitas Padjadjaran Bandung. 325 p.
- Sulandari, S. 2004. Karakterisasi Biologi, Serologi dan Analisis Sidik Jari DNA Virus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning Cabai. Disertasi SPs IPB. Bogor.

- Sulyo, Y., S. Duriat, N. Gunaeni, E. Korlina. 1995. *Determination of CMV and CVMV strains in Indonesia*. Proceeding of the AVNET II Midterm Workshop Philippines 21-25 Februari 1995. AVRDC.
- Tsai, W.S., Y.C. Huang, D.Y. Zhang, K. Reddy, S.H. Hidayat, W. Srithongchai, S.K. Green, F.J. Jan. 2008. Molekular characterization of the CP gene and 3'UTR of Chilli veinal mottle virus from South and Southeast Asia. *Plant Pathology* 57: 408-416.