

IDENTIFIKASI MOLEKULER *CUCUMBER MOSAIC VIRUS* (CMV) ASAL TANAMAN NILAM (*Pogostemon cablin*) *Molecular Identification of Cucumber Mosaic Virus Infecting Patchouli (Pogostemon cablin)*

MIFTAKHUROHMAH¹⁾, I DEWA NYOMAN NYANA²⁾, TRI ASMIRA DAMAYANTI³⁾ dan RITA NOVERIZA¹⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111

²⁾Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Kampus Bukit Jimbaran, Denpasar 80361

³⁾Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus Dramaga Bogor 16680

email: Miftah_tia05@yahoo.co.id

Diterima: 30-09-2016; Direvisi: 14-02-2017; Disetujui: 24-03-2017

ABSTRAK

Penyakit mosaik pada tanaman nilam di Indonesia berasosiasi dengan infeksi *Telosma mosaic virus* (TeMV), *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2), *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) dan *Cucumber mosaic virus* (CMV). TeMV, BBWV2 dan CymMV sudah diidentifikasi secara molekuler, sedangkan CMV baru terdeteksi secara serologi. Karakterisasi molekuler setiap virus diperlukan sebagai salah satu dasar pengambilan tindakan pengendalian. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi CMV asal tanaman nilam secara molekuler berdasarkan sekuen nukleotida gen CP. Tiga sampel daun nilam bergejala terinfeksi virus diambil dari koleksi tanaman nilam di rumah kaca Balitro. Sampel daun diekstraksi asam nukleat totalnya (RNA+DNA). Asam nukleat total diamplifikasi dengan teknik *one step reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) menggunakan primer spesifik gen *coat protein* (CP) CMV. Produk PCR berukuran 650 pb (pasang basa) dirunut sekuen nukleotidanya serta dianalisis homologi dan hubungan filogenetiknya dengan sekuen isolat-isolat CMV yang ada di *GenBank*. Sekuen nukleotida dan asam amino gen CP CMV asal nilam menunjukkan persentase kemiripan terbesar (97,1 dan 97,7%) dengan isolat um-Jepang. Analisis filogeni menunjukkan bahwa CMV asal nilam berkerabat sangat dekat dengan CMV isolat um-Jepang dengan nilai *bootstrap* 100%, dan berada dalam satu kelompok dengan isolat-isolat CMV subgrup IB. Keberadaan CMV subgrup IB pada tanaman nilam perlu diwaspadai karena subgrup I lebih virulen dibandingkan subgrup II. Penelitian ini merupakan laporan pertama karakterisasi molekuler CMV nilam, baik di Indonesia maupun di luar negeri, yang dapat digunakan sebagai salah satu dasar pengambilan tindakan pengendalian.

Kata kunci: analisis homologi, pohon filogeni, nukleotida, asam amino

ABSTRACT

Mosaic disease on Indonesian patchouli is associated with infection of TeMV, BBWV2, CymMV and CMV. TeMV, BBWV2 and CymMV has been identified molecularly, while CMV just was detected serologically. The objective of this study is to identify CMV from patchouli by molecular approach based on CP gene nucleotide sequence. Leaf samples was collected from three mosaic symptomatic patchouli plants in greenhouse of Balitro. Leaf samples were extracted for the total nucleic acids (RNA + DNA). Nucleic acids were amplified using specific primer for CP gene of CMV by one step RT-PCR technique. The DNA of PCR product with the size of ~ 650 bp was directly sequenced and analyzed for its homology with sequences of CMV isolates extracted from Gene Bank. CMV CP gene from patchouli showed the highest of nucleotide and amino acid sequence similarities, 97,1 and 97,7% with um-

Japanese isolates. Phylogenetic tree analysis revealed that CMV from patchouli was closely related with um-Japanese isolate with 100% bootstrap value, and clustered with another CMV isolates in subgroup IB. Since the CMV subgroup I more virulent than subgroup II, is necessary to increase the awareness of the CMV occurrence in another plant.

Key words : homology analysis, phylogeny tree, nucleotides, amino acid

PENDAHULUAN

Penyakit mosaik akibat virus pada nilam di Indonesia telah dilaporkan sejak tahun 1996. Ada empat jenis virus yang telah terdeteksi berasosiasi dengan penyakit mosaik nilam di Indonesia, yaitu *Telosma mosaic virus* (TeMV) dari genus *Potyvirus*, *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) dari genus *Potexvirus*, *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) dari genus *Fabavirus*, dan *Cucumber mosaic virus* (CMV) dari genus *Cucumovirus* (Sukanto et al., 2007; Noveriza et al., 2012b; Miftakhurohmah et al., 2015). Infeksi virus pada tanaman nilam menyebabkan penurunan produksi mencapai 30 – 40% dan penurunan kadar *patchouli alcohol* hingga 5%, baik pada terna basah maupun terna kering (Noveriza et al., 2012a).

Karakterisasi molekuler TeMV sudah dilakukan oleh Noveriza et al. (2012b), demikian juga CymMV dan BBWV2 oleh Miftakhurohmah et al. (2015). CMV terdeteksi secara serologi pada beberapa pertanaman nilam di Indonesia, yaitu di Kebun Percobaan (KP) Cicurug dan Manoko, serta di lahan petani di Cijeruk (Miftakhurohmah et al., 2013), namun belum dilaporkan karakterisasi molekuler.

Karakterisasi molekuler virus diperlukan dengan beberapa tujuan, antara lain untuk mendapatkan data yang lebih akurat. Deteksi secara serologi kurang akurat karena tidak dapat membedakan virus yang sekerabat (Boonham et al., 2014), sehingga identifikasi virus lebih tepat dilakukan secara molekuler. Ketepatan identitas virus akan menentukan ketepatan langkah pengendalian atau langkah

karantina yang diambil untuk meminimalkan kehilangan hasil akibat virus (Khan et al., 2011a). Karakterisasi molekuler virus juga untuk mengetahui sejarah evolusinya (asal dan penyebarannya), sehingga dapat dilakukan pencegahan penyebarannya. Strategi pengendalian CMV yang efektif juga dapat dilakukan dengan merakit varietas tahan. Perakitan varietas tahan berkaitan dengan karakterisasi molekuler virus (Kim et al., 2014).

CMV memiliki kisaran inang luas dan telah dilaporkan menginfeksi lebih dari 1.300 spesies tanaman yang tergolong ke dalam lebih dari 500 genus dan 100 famili (Duarte et al., 2013). Virus ini menular melalui bahan tanaman, biji dan serangga vektor. Lebih dari 80 spesies Aphid mampu menularkan CMV secara non persisten (Zitter and Murphy, 2009). Genom CMV terdiri dari tiga utas RNA yang memiliki 5 *Open Reading Frame* (ORF). CMV diklasifikasikan menjadi dua subgrup utama berdasarkan serologi, yaitu subgrup I dan II. Analisis lebih lanjut berdasarkan homologi nukleotida dan filogeni, subgrup I terbagi menjadi IA dan IB (Roonssinck et al., 1999).

Gen yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi CMV adalah 1a, 2a, 2b, *movement protein* (MP) dan *coat protein* (CP). Gen 1a, 2a dan 2b lebih cepat mengalami evolusi, sehingga variasinya antar isolat lebih tinggi dibandingkan dengan gen CP dan MP (Nematollahi et al., 2012; Kim et al., 2014). Identifikasi CMV secara molekuler umumnya menggunakan gen CP. Menurut El-Din et al. (2013), gen CP merupakan bagian genom CMV yang cukup sederhana namun dapat dipercaya untuk deteksi dan identifikasi strain-strain CMV. Khan (2015) mengatakan bahwa gen CP CMV lebih sensitif dibandingkan gen *movement protein* (MP) untuk deteksi CMV secara RT-PCR.

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi CMV asal tanaman nilam secara molekuler berdasarkan sekuen nukleotida gen CP.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium penyakit, kelti Proteksi, Balitro, dari bulan Juli sampai dengan September 2016. Tahapan penelitian yang dilakukan meliputi : pengambilan sampel, ekstraksi asam nukleat (RNA+DNA) total, *one step* RT-PCR, sekuensing dan analisis sekuen.

Pengambilan Sampel

Sampel daun diambil dari tiga tanaman nilam bergejala mosaik di rumah kaca Kelti Proteksi, Balitro. Setiap tanaman diambil satu helai daun bagian pucuk menggunakan gunting yang telah disemprot alkohol. Daun dimasukkan dalam plastik, kemudian dibawa ke laboratorium. Setiap daun ditimbang sebanyak 0,1 gram, dimasukkan dalam plastik tebal, disimpan dalam freezer -20°C, sampai digunakan.

Ekstraksi Asam Nukleat (RNA+DNA) Total dan *One Step* RT-PCR

Ekstraksi asam nukleat total (RNA+DNA) sampel daun nilam bergejala mosaik dilakukan menggunakan bufer ekstraksi [(*guanidium thiocyanate* 4M, *sodium citrate* 25 mM (pH7.0), *sodium N-Lauryl sarcosine* 0,5% (g/ml), β -mercaptoethanol 0,1% (ml/ml) dan *sodium sulphite* 0,5% (g/ml)] sesuai dengan protokol yang dikembangkan oleh Bhat and Siju (2007).

Amplifikasi DNA dilakukan secara *one step* RT-PCR dengan primer CMV-F (5'-ATGGACAAATCTGAATCAAC-3') dan CMV-R (5'-TCAAACCTGGGAGCACCC-3') (Bhat and Siju, 2007). Amplifikasi dilakukan pada reaksi campuran dengan total volume 25 μ l yang terdiri dari: KAPA taq PCR kit 12,5 μ l, Rnase inhibitor 0,125 μ l, 50 mM DTT 2,5 μ l, revert aid 0,05 μ l, CMV-F 10 μ M, CMV-R 10 μ M, masing-masing 1,0 μ l, asam nukleat template 2 μ l, dan air bebas nuklease sampai volume mencapai 25 μ l. Program RT-PCR mengacu pada Bhat and Siju (2007) yang telah dimodifikasi, setelah dilakukan optimasi suhu *annealing* pada 50, 55, 58 dan 60°C. RT-PCR dilakukan dalam mesin PCR gradient (Labcycler, SensQuest), diawali dengan sintesis cDNA pada suhu 42°C selama 45 menit, amplifikasi DNA dengan denaturasi awal pada suhu 95°C selama 1 menit, dilanjutkan dengan 40 siklus yang terdiri dari: denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu optimum selama 1 menit, ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, diakhiri dengan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 10 menit. Kegiatan *one step* RT-PCR menggunakan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menggunakan CMV asal tanaman karuk (*Piper sarmentosum*) (Miftakhurohmah et al., 2017), sedangkan kontrol negatif menggunakan air bebas nuklease.

DNA hasil amplifikasi PCR divisualisasi pada gel agarosa 1,5% yang telah ditambah *FluoroVueTM nucleic acid gel stain* (1 μ l/10 ml 1x TAE). Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa, kemudian dielektroforesis pada 50 Volt selama 60 menit. Hasil visualisasi dilihat dan didokumentasi dengan *geldoc fire reader V4 (Uvitec Cambridge)*.

Perunutan dan Analisis Sekuen Nukleotida

Produk RT-PCR dikirimkan ke PT Genetika Science Indonesia untuk dilakukan perunutan nukleotida dua arah. Runutan nukleotida hasil amplifikasi dengan primer *reverse* diubah menjadi *reverse complement* menggunakan software *Complementor* (www.justbio.com/complementor). Runutan nukleotida hasil amplifikasi primer *reverse* dan *forward* diedit menggunakan program *BioEdit Sequence Alignment Editor*, dibandingkan dengan sekuen nukleotida sejenis yang diambil dari *GenBank*, kemudian dilakukan penggabungan. Hasil penggabungan kedua runutan nukleotida tersebut dicek hasil *translate* proteinnya menggunakan software *Translate* (www.expasy.org/tools).

Hasil runutan nukleotida dan asam amino gen CP CMV nilam dibandingkan tingkat homologinya dengan sekuen CMV, baik subgrup IA, IB dan II asal negara lain yang diambil dari database *GenBank*. Pensejajaran dilakukan dengan *Clustal W alignment*. Matriks identitas nukleotida diperoleh menggunakan *software BioEdit Sequence Alignment Editor*. Pohon filogenetika dikonstruksi dengan *software MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis software)* (Tamura et al., 2013), menggunakan metode *neighbour-joining* dengan *bootstrap* 1000 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

One Step RT-PCR

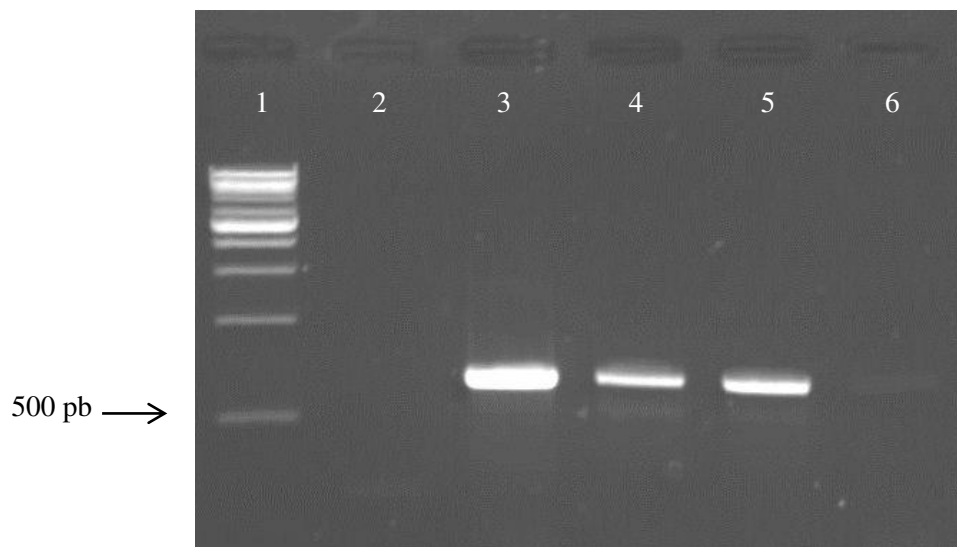
Amplifikasi DNA pada suhu annealing 60°C membentuk pita DNA berukuran kurang lebih 650 pb (pasang basa) sesuai prediksi desain primer dan berukuran sama dengan kontrol positif, tanpa ada pita DNA lain (Gambar 1). Siju et al. (2007) mengidentifikasi CMV dari tanaman *Indian long pepper (P. longum L.)* dan lada (*P. nigrum*) menggunakan primer yang sama. Hal ini

menunjukkan bahwa teknik tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi CMV pada beberapa tanaman.

Perunutan Nukleotida dan Analisis Sekuen

Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen nukleotida asal tanaman nilam yang dirunut merupakan gen CP CMV dengan jumlah 657 nukleotida, yang ditranslasikan menjadi 218 asam amino. Ukuran gen CP CMV nilam yang diperoleh, sama dengan ukuran gen CP CMV dari beberapa tanaman asal beberapa negara yang telah didaftarkan di *GenBank*.

Homologi sekuen nukleotida gen CP CMV asal nilam terlihat paling tinggi, yaitu sebesar 97,1%, dengan isolat CMV asal um-Jepang, sedangkan dengan isolat CMV subgrup IB lainnya sebesar 94,9 – 95,5%. Homologi dengan subgrup IA dan subgrup II lebih rendah, berturut-turut 93,7 – 94,2% dan 74,7 – 76,1%. Homologi asam amino gen CP CMV asal nilam dengan asam amino subgrup IB terlihat lebih tinggi (97,7 – 98,6%) dibandingkan dengan subgrup IA (95,8 – 97,2%) dan subgrup II (77,9 – 81,6%) (Tabel 1).



Gambar 1. Amplifikasi *one step RT-PCR* gen CP CMV pada gel agarose 1,5 %. 1. Marker 1 Kb, 2. Kontrol negatif, 3. Kontrol positif, 4 - 6. CMV dari sampel nilam.

Figure 1. Amplification of *one step RT-PCR* of CMV CP gene on a 1.5% agarose gel. 1. Marker 1 Kb, 2. Negative control, 3. positive control, 4 - 6. CMV from patchouli sample.

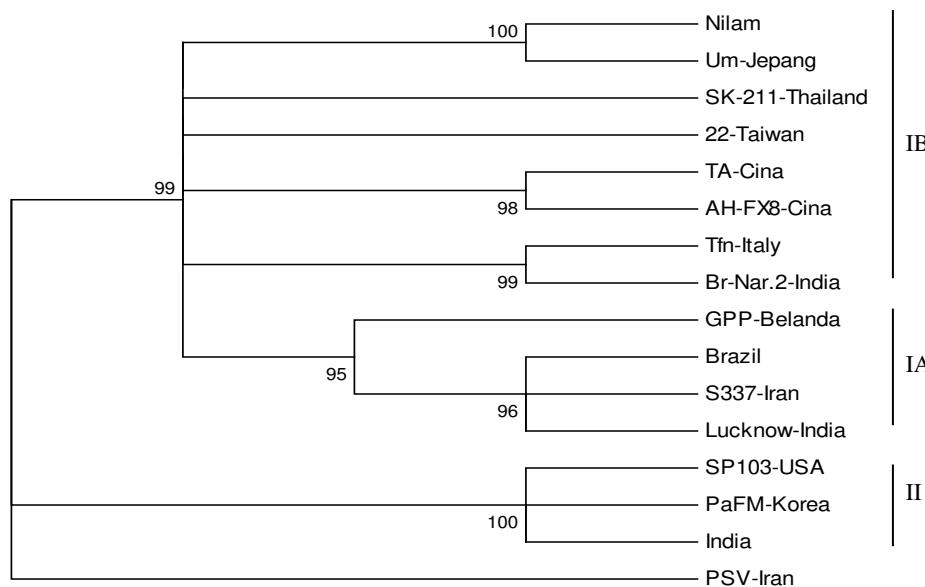
Tabel 1. Persentase homologi sekuen nukleotida dan asam amino gen CP CMV asal nilam dengan isolat CMV lain
 Table 1. The homology percentage of nucleotide and amino acid sequences of CP genes of CMV from patchouli with other CMV isolates

No aksesasi <i>No Accession</i>	Isolat <i>Isolate</i>	Negara <i>Country</i>	Inang <i>Host</i>	Subgrup <i>Sub-group</i>	Persentase Homologi <i>Homology percentage</i>	
					nt <i>nt</i>	aa <i>aa</i>
AB070622	Um	Jepang	<i>Prunus mume</i>	IB	97,1	97,7
HQ829825	TA	Cina	<i>Nicotiana sp.</i>	IB	95,5	98,1
KU17564	AH-FX8	Cina	<i>Cucumis sativus</i> Linn	IB	95,2	98,1
FM999064	SK-211	Thailand	<i>Cucumis sativas</i>	IB	95,2	98,1
EU329010	22	Taiwan	<i>Musa sp</i>	IB	95,1	98,1
Y10886	Tfn	Italy	<i>Lycopersicum esculentum</i>	IB	94,9	98,6
GQ844888	Br-Nar.2	India	<i>Solanum sp.</i>	IB	94,8	98,6
AJ131623	GPP	Belanda	<i>Gladiolus sp</i>	IA	94,2	97,2
AY380533	-	Brazil	<i>Crysanthemum sp</i>	IA	92,3	95,8
AY871069	S337	Iran	<i>Cucurbita sp</i>	IA	93,7	96,7
DQ295914	Lucknow	India	<i>Gladiolus sp</i>	IA	93,7	97,2
U10923	SP103	USA	<i>Spinacea oleracea</i>	II	75,3	80,2
AB109908	PaFM	Korea	<i>Capsicum annum</i>	II	76,1	81,6
AJ585086	Indian	India	<i>Lilium sp</i>	II	74,7	77,9
KF800742	PSV	Iran	Alfalfa	outgrup	55,8	47,7

Keterangan: nt : nukleotida, aa : asam amino
 Note: nt : nucleotide, aa : amino acid

Analisis pohon filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen CP menghasilkan dua subgrup utama yaitu subgrup I dan II. Subgrup I terbagi menjadi subgrup IA dan IB. Nilai pada titik percabangan merupakan nilai *bootstrap*, yang menunjukkan pengujian terhadap kestabilan pengelompokan pada pohon filogenetik. Kekerbatan suatu kelompok semakin kuat dengan semakin tingginya nilai *bootstrap*. Isolat CMV nilam berkerabat sangat dekat dengan isolat um-Jepang, yang diperkuat dengan nilai

bootstrap 100%, dan mengelompok dengan isolat CMV subgrup IB lain (Gambar 2). Homologi tinggi serta kekerabatan dekat dengan isolat asal negara lain dan inang yang berbeda juga diperoleh pada identifikasi molekuler CMV pisang dari Mesir yang memiliki homologi asam amino tertinggi (100%) dan berkerabat dekat dengan isolat CMV asal *Cucurbita pepo* dari Amerika Serikat (El-Din et al., 2013).



Gambar 2. Pohon filogeni gen CP CMV nilam dengan sekuen CMV asal negara lain yang diambil dari GenBank. Pohon filogeni direkonstruksi menggunakan software MEGA 6.0 dengan metode *neighbour joining* dan *bootstrap* 1000 kali. *Peanut stunt virus* (PSV) asal Iran digunakan sebagai *outgrup*.

Figure 2. Phylogeny tree of CP gene of CMV from patchouli with CMV sequences from other countries extracted from GenBank. Phylogeny tree were reconstructed by using MEGA 6.0 software with neighbor joining methods with 1000 times bootstrap. Peanut stunt virus (PSV) from Iran was used as outgrup.

Homologi sekuen baik nukleotida maupun asam amino gen CP CMV nilam dengan isolat *Peanut stunt virus* (PSV) sebagai *outgroup* terlihat rendah, hanya 55,8% dan 47,7% (Tabel 1). Pada pembentukan pohon filogeni juga terlihat jika PSV membentuk kelompok sendiri, terpisah dari isolat CMV lain (Gambar 2). Dalam pembentukan pohon filogeni, sangat diperlukan *outgroup*, yaitu isolat yang memiliki perbedaan yang nyata dengan sekuen-sekuen lain, namun masih memiliki kedekatan. Pemilihan *outgroup* yang terlalu jauh akan menyebabkan terjadinya kesalahan pembuatan pohon filogeni (Dharmayanti, 2011). PSV merupakan salah satu spesies yang tergolong ke dalam genus yang sama dengan CMV dengan ciri-ciri serologi yang sama (Zitter and Murphy, 2009).

Hasil analisis homologi dan pohon filogenetika menunjukkan data yang saling mendukung. CMV asal nilam berkerabat sangat dekat dengan isolat um-Jepang. Ini didukung dengan nilai homologi nukleotida dan asam amino paling tinggi (di atas 97%). Pengelompokan CMV nilam dengan isolat CMV subgrup IB lain juga termasuk berkerabat sangat dekat yang ditunjukkan dengan nilai homologi nukleotida dan asam amino yang tinggi di atas 94%. Hal ini menunjukkan bahwa CMV asal nilam Cimanggu tergolong ke dalam subgrup IB, dan diduga nenek moyangnya adalah isolat um-Jepang. Hasil ini didukung oleh pernyataan Duarte et al. (2013) yang menyatakan bahwa CMV subgrup IB lebih banyak ditemukan di wilayah Asia, dengan nenek moyang berasal dari wilayah Asia Tenggara.

Persamaan homologi yang tinggi menunjukkan banyaknya persamaan ciri dari suatu isolat, serta menunjukkan berasal dari nenek moyang yang sama. Hidayat dan Pancoro (2008) mengatakan bahwa sebuah kelompok dalam pohon filogenetika diperkirakan berasal dari nenek moyang yang sama dan memiliki banyak kesamaan karakter atau ciri dan dianggap memiliki hubungan yang sangat dekat. Anggota-anggota dalam satu kelompok tersebut bersama dengan nenek moyangnya akan membentuk kelompok monofiletik.

Pohon filogeni dapat digunakan untuk mengidentifikasi spesies dan mengelompokkan isolat virus patogen tanaman hingga level subgrup. Hasil penelitian Sulistyowati et al. (2004) juga mengungkapkan jika pengelompokan 6 isolat CMV Australia pada pohon filogeni berkorelasi dengan identifikasi secara analisis homologi sekuen, serologi dan berdasarkan gejala. Identifikasi molekuler isolat baru CMV dari *basil* (*Ocimum sanctum*) di India menggunakan metode *neighbour joining* berdasarkan gen CP, berhasil mengidentifikasi isolat tersebut sebagai isolat baru CMV subgrup II (Khan et al., 2011a).

Kesamaan CMV nilam dengan isolat um-Jepang membuktikan adanya kejadian yang menyebabkan terjadinya perpindahan jarak jauh (*gene flow*) antar negara (Davino et al., 2012). Perpindahan isolat antar negara kemungkinan juga terjadi di Malaysia. Berdasarkan hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa CMV asal tapak dara

Malaysia memiliki homologi tertinggi (100%) dengan CMV asal tapak dara India (Mazidah et al., 2012).

CMV pada tanaman nilam baru ditemukan di Indonesia. Di luar negeri, virus yang menginfeksi tanaman nilam adalah dari genus *Potyvirus* (Natsuaki et al., 1994; Singh et al., 2009; Zaim et al., 2013), *Fabavirus* (Natsuaki et al., 1994) dan *Potexvirus* (Filho et al., 2002). Hasil penelitian ini merupakan laporan pertama karakterisasi molekuler CMV asal nilam, baik di Indonesia maupun di luar negeri.

Keberadaan CMV subgrup IB pada tanaman nilam perlu diwaspadai mengingat CMV subgrup I lebih virulen dibanding subgrup II (Zhang et al., 1994). Pencegahan penyebaran virus ini dapat dilakukan dengan melakukan pengendalian serangga vektor dan penggunaan bahan tanaman sehat. Di Itali, CMV subgrup II dan IA telah ditemukan menginfeksi 10% dari 150 tanaman hias, rempah dan aromatik yang dideteksi (Davino et al., 2012). Karantina tanaman perlu diperketat untuk mencegah terinfeksinya tanaman rempah, obat dan aromatik dengan CMV subgrup lain.

KESIMPULAN DAN SARAN

Teknik *one step* RT-PCR dengan primer CMV-F dan CMV-R berhasil mendapatkan pita DNA sampel nilam berukuran kurang lebih 650 pb, yang berukuran sama dengan kontrol positif. Hasil perunut nukleotida diperoleh gen CP CMV berukuran 657 nukleotida, yang ditranslasikan menjadi 218 asam amino. Isolat CMV asal nilam memiliki homologi nukleotida dan asam amino tertinggi (97,1 dan 97,7%) dengan isolat um-Jepang. Pohon filogeni isolat CMV nilam berkerabat dekat dengan isolat um-Jepang (nilai *bootstrap* 100%) dan berada pada satu kelompok dengan isolat-isolat CMV subgrup IB lainnya, sehingga CMV isolat nilam tergolong ke dalam subgrup IB. Isolat CMV subgrup I lebih virulen dari subgrup II, oleh karena itu keberadaan CMV subgrup IB pada tanaman nilam perlu diwaspadai dengan mencegah penyebarannya ke tanaman lain.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Ibu Ekwasita Rini Pribadi, M.Sc. yang telah membantu dalam analisa statistik data penelitian, serta Bapak Dr. Gede Suastika atas bimbingannya dalam deteksi molekuler CMV.

DAFTAR PUSTAKA

Bhat, A.I. & Siju, S. (2007) Development of a single-tube multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of *Cucumber mosaic virus* and *Piper yellow mottle virus*

- associated with stunt disease of black pepper. *Current Sci.* 93 (7), 973–976.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J. & Mumford, R. (2014) Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*. [Online] 186, Elsevier B.V., 20–31. Available from: doi:10.1016/j.virusres.2013.12.007.
- Davino, S., Panno, S., Rangel, E.A., Davino, M., Bellardi, M.G. & Rubio, L. (2012) Population genetics of *Cucumber mosaic virus* infecting medicinal, aromatic and ornamental plants from northern Italy. *Archives of Virology*. [Online] 157 (4), 739–745. Available from: doi:10.1007/s00705-011-1216-4.
- Dharmayanti, N.L.P.I. (2011) Filogenetika molekuler : metode taksonomi organisme. *Wartazoa*. 21 (30), 1–10.
- Duarte, L.M.L., Rivas, E.B., Harakava, R., Veauvy, M.C.D. & Alexandre, M.A.V. (2013) Genealogy of *Cucumber mosaic virus* isolated from ornamental species. *American Journal of Plant Sciences*. [Online] 4 (5), 1081–1087. Available from: doi:10.4236/ajps.2013.45134.
- El-Din, H.A.N., Salem, R. & Abdalla, K.S. (2013) Cloning and characterization of *Cucumber mosaic virus* coat protein gene from infected banana. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*. 42 (August), 151–161.
- Filho, P.E.M., Resende, R.O., Lima, M.I. & Kitajima, E.W. (2002) *Patchouli virus X*, a new *Potexvirus* from *Pogostemon cablin*. *Ann Appl Biol*. [Online] 141 (March), 267–274. Available from: doi:10.1111/j.1744-7348.2002.tb00218.x.
- Hidayat, T. & Pancoro, A. (2008) Kajian filogenetika molekuler dan peranannya dalam menyediakan informasi dasar untuk meningkatkan kualitas sumber genetik anggrek. *Jurnal AgroBiogen*. 4 (1), 35–40.
- Khan, A.A., Sharma, R., Afreen, B., Naqvi, Q.A., Kumar, S., Snehi, S.K. & Raj, S.K. (2011a) Molecular identification of a new isolate of *Cucumber mosaic virus* subgroup II from basil (*Ocimum sanctum*) in India. *Phytoparasitica*. [Online] 39 (2), 199–203. Available from: doi:10.1007/s12600-011-0146-8.
- Khan, S. (2015) Partial characterization and development of sensitive and reliable diagnostic for the detection of *Cucumber mosaic virus*. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. [Online] 39 (3), 421–428. Available from: doi:10.3906/tar-1405-143.
- Khan, S., Jan, A.T., Aquil, B. & Haq, Q.M.R. (2011b) Coat protein gene based characterization of *Cucumber mosaic virus* isolates infecting banana in India. *Journal of Phytology*. 3 (2), 94–101.
- Kim, M.-K., Seo, J.-K., Kwak, H.-R., Kim, J.-S., Kim, K.-H., Cha, B.-J. & Choi, H.-S. (2014) Molecular genetic analysis of *Cucumber mosaic virus* populations infecting pepper suggests unique patterns of evolution in Korea. *Phytopathology*. [Online] 104 (9), 993–1000. Available from: doi:10.1094/PHYTO-10-13-0275-R.
- Mazidah, M., Yusoff, K., Habibuddin, H., Tan, Y.H. & Lau, W.H. (2012) Characterization of *Cucumber mosaic virus* (CMV) causing mosaic symptom on *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in Malaysia. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 35 (1), 41–53.
- Miftakhurohmah, Mariana, M. & Wahyuno, D. (2017) Molecular characterization of *Cucumber mosaic virus* infecting wild betel (*Piper sarmentosum*). *Current Science*. 112(12), 2369–2372.
- Miftakhurohmah, Suastika, G. & Damayanti, T.A. (2013) Deteksi secara serologi dan molekuler beberapa jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit mosaik tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *Jurnal Littri*. 19 (3), 130–138.
- Miftakhurohmah, Suastika, G., Damayanti, T.A. & Noveriza, R. (2015) Identifikasi molekuler *Broad bean wilt virus 2* (BBWV2) dan *Cymbidium mosaic virus* (CymMV) asal tanaman nilam (*Pogostemon cablin* BENTH.). *JHPT Tropika*. 15 (2), 188–199.
- Natsuaki, K.T., Tomaru, K., Ushiku, S., Ichikawa, Y., Sugimura, Y., Natsuaki, T., Okuda, S. & Teranaka, M. (1994) Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Disease*. 78, 1094–1097.
- Nematollahi, S., Sokhandan-Bashir, N., Rakhshandehroo, F. & Zamanizadeh, H.R. (2012) Phylogenetic analysis of new isolates of *Cucumber mosaic virus* from Iran on the basis of different genomic regions. *Plant Pathology Journal*. [Online] 28 (4), 381–389. Available from: doi:10.5423/PPJ.OA.06.2012.0077.
- Noveriza, R., Suastika, G., Hidayat, S.H. & Kartosuwondo, U. (2012a) Pengaruh infeksi virus mosaik terhadap produksi dan kadar minyak tiga varietas nilam. *Buletin Litro*. 23 (1), 93–101.
- Noveriza, R., Suastika, G., Hidayat, S.H. & Kartosuwondo, U. (2012b) *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) plants in Indonesia. *J. ISSAAS*. 18 (1), 131–146.
- Roossinck, M.J., Zhang, L. & Hellwald, K.H. (1999) Rearrangements in the 5' nontranslated region and phylogenetic analyses of *Cucumber mosaic virus* RNA 3 indicate radial evolution of three subgroups. *Journal of virology*. [Online] 73 (8), 6752–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=112760&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Siju, S., Madhubala, R. & Bhat, A.I. (2007) Sodium sulphite enhances RNA isolation and sensitivity of *Cucumber mosaic virus* detection by RT-PCR in black pepper. *Journal of Virological Methods*. [Online] 141

- (1), 107–110. Available from: doi:10.1016/j.jviromet.2006.11.032.
- Singh, M.K., Chandel, V., Hallan, V., Ram, R. & Zaidi, A.A. (2009) Occurrence of *Peanut stripe virus* on patchouli and raising of virus-free patchouli plants by meristem tip culture. *Journal of Plant Diseases and Protection*. [Online] 116 (1), 2–6. Available from: doi:10.1007/BF03356278.
- Sukanto, Indriati, G., Karyani, N. & Supriadi (2007) *Deteksi Cucumber mosaic virus pada tanaman lada (Piper nigrum L.)*. In: *Prosiding Seminar Nasional Rempah*. pp.148–155.
- Sulistyowati, E., Mitter, N., Bastiaan-Net, S., Roossinck, M.J. & Dietzgen, R.G. (2004) Host range, symptom expression and RNA 3 sequence analyses of six Australian strains of *Cucumber mosaic virus*. *Australasian Plant Pathology*. [Online] 33 (4), 505–512. Available from: doi:10.1071/AP04054.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A. & Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. [Online] 30 (12), 2725–2729. Available from: doi:10.1093/molbev/mst197.
- Zaim, M., Ali, A., Joseph, J. & Khan, F. (2013) Serological and molecular studies of a novel virus isolate causing yellow mosaic of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth]. *PLoS ONE*. [Online] 8 (12). Available from: doi:10.1371/journal.pone.0083790.
- Zhang, L., Hanada, K. & Palukaitis, P. (1994) Mapping local and systemic symptom determinants of *Cucumber mosaic cucumovirus* in tobacco. *Journal of General Virology*. [Online] 75 (11), 3185–3191. Available from: doi:10.1099/0022-1317-75-11-3185.
- Zitter, T.A. & Murphy, J.F. (2009) The plant health instructor: *Cucumber mosaic virus*. *American Phytopathological Society*. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/pages/cucumbermosaic.aspx>. Diakses tanggal 2 Agustus 2016.