

DETEKSI MOLEKULER PENYEBAB PENYAKIT KUNING (*Tomato chlorosis virus* DAN *Tomato infectious chlorosis virus*) PADA TANAMAN TOMAT

MOLECULAR DETECTION CAUSED YELLOWING DISEASE (*Tomato chlorosis virus* AND *Tomato infectious chlorosis virus*) ON TOMATOES

Resti Fajarfika^{1)*}, Sedyo Hartono²⁾, Sri Sulandari²⁾, & Susanto Somowiyarjo²⁾

¹⁾Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Garut
Jln. Raya Samarang No. 52A, Garut, Jawa Barat 44151

²⁾Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jln. Flora 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta 55281

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: fajarfikaresti@gmail.com

ABSTRACT

This research was aimed to detect the ToCV and TICV caused yellowing disease on tomatoes by molecular detection. Leaf samples of symptomatic plants were taken from Ketep (Magelang), then the leaves were identified by reverse transcription-polymerase chain reactions (RT-PCR) using specific primer ToCV-CF/ToCV-CR (360 bp) and TICV-CF/TICV-CR (416 bp). The result of nucleotide sequence analysis, amino acid and PCR product phylogenetic sequences were verified as TICV, it showed that TICV from Magelang belongs to the same group with TICV from Japan, North America and Europe, France, Italy, and USA.

Keywords: molecular detection, ToCV, TICV

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan ToCV dan TICV penyebab penyakit kuning pada tanaman tomat. Daun bergejala diambil dari Desa Ketep (Magelang), selanjutnya diuji dengan *reverse transcription-polymerase chain reactions* (RT-PCR) menggunakan primer spesifik ToCV-CF/ToCV-CR (360 bp) dan TICV-CF/TICV-CR (416 bp). Hasil analisis sekuen nukleotida, asam amino, dan filogenetik produk PCR teridentifikasi sebagai TICV yang menunjukkan bahwa TICV isolat Magelang berada dalam satu kelompok dengan isolat TICV asal Jepang, Amerika Utara dan Eropa, Perancis, Italia, dan USA.

Kata kunci: deteksi molekuler, ToCV, TICV

PENGANTAR

Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) merupakan komoditas unggulan hortikultura yang mempunyai nilai ekonomis penting di Indonesia (Anonim, 2013). Di dalam upaya peningkatan produksinya sering mengalami kendala yang disebabkan penyakit, salah satunya penyakit kuning yang disebabkan oleh *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV; Duffus *et al.*, 1996) dan *Tomato chlorosis virus* (ToCV; Wisler *et al.*, 1998b) anggota dari genus *Crinivirus*, famili *Closteroviridae* yang ditularkan kutu kebul (Wintermantel, 2004). ToCV telah menyebabkan epidemik di Eropa dan *outbreak* pada tanaman tomat di Provinsi Malaga dan Almeria, Spanyol bagian selatan dengan kejadian infeksi lebih dari 30% (Navas-Castillo *et al.*, 2000). TICV telah menyebabkan kehilangan hasil mencapai 2 juta USD di California, Amerika Serikat (Wisler *et al.*, 1997). Kedua virus ini juga telah dilaporkan menyerang tanaman tomat di Yunani (Dovas *et al.*, 2002) dan Jepang (Hirota *et al.*, 2010), ToCV dilaporkan di Portugal (Louro *et al.*, 2000) dan Italia

(Accoto *et al.*, 2001). Di Indonesia, ToCV dan TICV termasuk virus baru dan sudah mulai menyebar luas di berbagai daerah penghasil tomat (Hartono & Wijonarko, 2007).

Gejala ToCV dan TICV sulit dibedakan pada tanaman tomat dan gejalanya hampir sama dengan gejala kekurangan unsur hara, yaitu daun kuning di sekitar tulang daun, hitam nekrotik, menebal, dan daun bagian bawah keriting (Jacquemon *et al.*, 2009). Kehilangan hasil terutama karena berkurangnya daerah fotosintesis, meskipun gejala tidak jelas pada buah, namun, produksi buah berkurang dengan ukuran dan jumlah buah menurun (Wisler *et al.*, 1998a).

Keberadaan penyakit selalu berasosiasi dengan populasi tinggi dari serangga vektornya, TICV hanya ditularkan oleh *Trialeurodes vaporariorum* secara semipersisten (Li *et al.*, 1998). ToCV tidak dapat ditularkan secara mekanik (Dovas *et al.*, 2002), sehingga tergantung pada penyebaran *whitefly* dari tanaman ke tanaman (Wintermantel & Wisler, 2006). ToCV dapat ditularkan oleh dua genus yaitu *Trialeurodes*

(*T. vaporarium* dan *T. abutilonea*) dan *Bemisia* (*Bemisia tabaci* biotipe A dan B) (Costa & Brown, 1991).

Penelitian ini bertujuan untuk deteksi keberadaan ToCV dan TICV, penyebab penyakit kuning pada tanaman tomat.

BAHAN DAN METODE

Survei dan Pengamatan Lapangan

Survei penyakit kuning dilakukan di desa Kopeng dan Ketep, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah. Pengamatan lapangan dilakukan dengan cara mengambil dokumentasi variasi gejala visual di lokasi pertanaman tomat dan pengambilan sampel.

Deteksi Molekuler dengan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Tahapan RT-PCR yang dilakukan adalah isolasi RNA total, sintesis *complementary*-DNA (cDNA), PCR, dan visualisasi. Isolasi RNA total dilakukan dengan mengekstrak sampel daun menggunakan *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) dengan mengikuti cara kerja protokol kit tersebut. RNA total yang telah diperoleh, selanjutnya ditranskripsi balik (RT-PCR) menggunakan kit Fermentas untuk mendapatkan cDNA. Hasil cDNA kemudian diamplifikasi menggunakan PCR kit (Promega) dengan primer spesifik (Tabel 1). Reaksi PCR terdiri atas 30 siklus dengan tahapan predenaturasi pada suhu 95°C selama dua menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 52°C selama 30 detik, dan *elongation* pada suhu 72°C selama satu menit, serta *time extention* pada suhu 72°C selama lima menit. Hasil PCR kemudian divisualisasi pada agarose gel dan dielektroforesis di dalam buffer tris-boric acide-EDTA (TBE). Hasil elektroforesis kemudian dicat dengan pengecatan etidium bromide.

Analisis Sekuen

Fragmen DNA hasil amplifikasi digunakan untuk sekuen DNA untuk mengetahui susunan DNA dari isolat yang ditemukan. Sekuensing DNA dilakukan First Base, Malaysia menggunakan pasangan primer TICV-CF dan TICV-CR (Tabel 1). Analisis homologi sekuen basa nukleotida dan asam amino gen CPd TICV menggunakan *Blast* (Basic Local Alignment

Search Tool) yang terdapat dalam situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sekuen nukleotida semua isolat terpilih dikoreksi dengan *software* Bioedit dan Genetyx V.5 sebelum dianalisis filogenetik. Pembentukan pohon filogenetik dengan *software* Clustal W dan program Mega V.6 berdasarkan pendekatan *Neighbor Joining* (NJ). Homologi sekuen nukleotida dan asam amino dianalisis melalui *multiple sequence alignment* dengan program Clustal W dari *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>). Persentase kesamaan basa nukleotida dan asam amino dianalisis melalui program BioEdit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Survei dan Pengamatan Lapangan

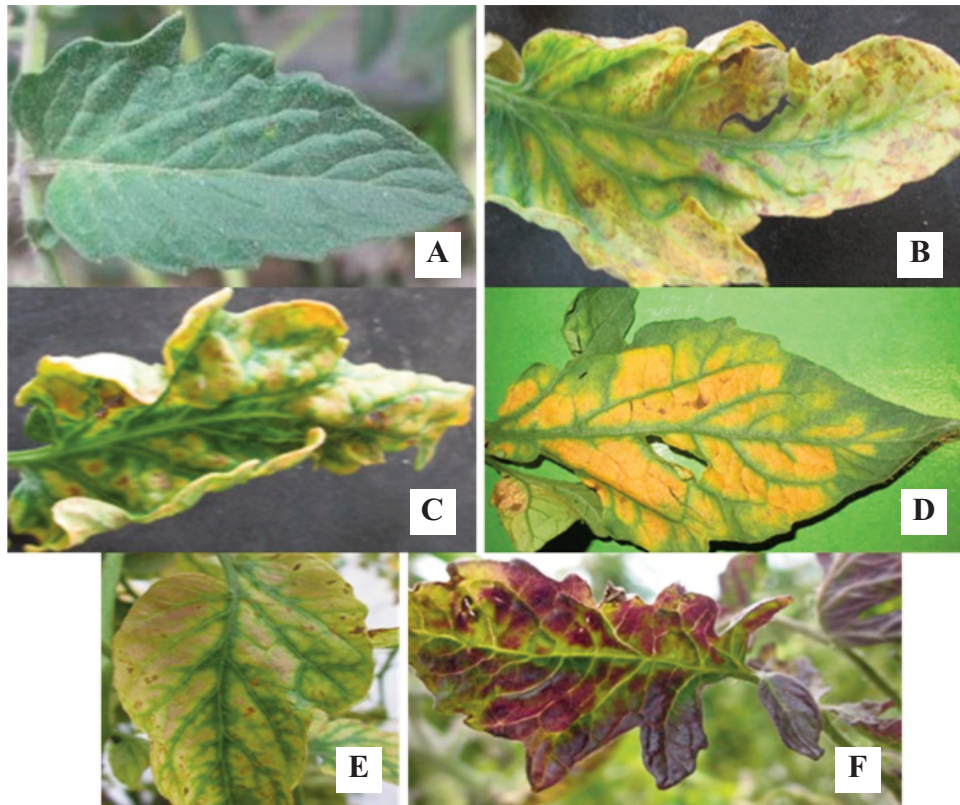
Hasil survei dan pengamatan lapangan yang dilakukan di desa Kopeng dan Ketep, Kabupaten Magelang, Jawa Tengah, ditemukan adanya gejala penyakit kuning. Tanaman tomat yang terinfeksi virus kuning memiliki gejala yang sangat khas, yaitu terjadi klorosis mulai dari daun bagian bawah dan berkembang ke bagian atas tanaman. Gejala awal yang muncul pada daun menunjukkan klorosis ringan antar tulang daun (*chlorosis interveinal*). Selanjutnya gejala berkembang pada luasan daun, daun tebal, dan daun menjadi kuning kecuali tulang daunnya tetap hijau. Apabila gejala sudah lanjut, seluruh permukaan tanaman menjadi klorosis dan rapuh, terkadang daun menjadi nekrotik dan keungunan. Gejala ini mirip seperti yang dilaporkan pada tanaman tomat yang terinfeksi TICV dan ToCV yang keduanya ditularkan oleh kutu kebul (Duffus *et al.*, 1996; Wisler *et al.*, 1998b).

Gejala penyakit kuning-ungu mirip dengan gejala yang disebabkan kekurangan unsur hara namun dapat dibedakan, untuk mengetahui gejala yang disebabkan penyakit biasanya terdapat spot-spot tidak merata di seluruh lahan dan penyakit menular (Hartono & Wijonarko, 2007).

Di lapangan juga ditemukan gejala penyakit kuning yang beraneka ragam pada bentuk daun, perbedaan warna kuning dan ungu pada daun (Gambar 1), yaitu klorosis antar tulang daun, terdapat flek cokelat dan tepi daun melengkung ke atas; klorosis antar tulang

Tabel 1. Primer spesifik yang digunakan dalam PCR

Jenis primer	Urutan basa	Amplifikasi	Referensi
ToCV-CF ToCV-CR	5'-GTGTCAGGCCATTGTAAACCAAG-3' 5'-CACAAAGCGTTTCTTTTCATAAGCAGG-3'	360 bp	Hirota <i>et al.</i> , 2010
TICV-CF TICV-CR	5'-AATCGGTAGTGACACGAGTAGCATC-3' 5'-CTTCAAACATCCTCCATCTGCC-3'	416 bp	Hartono <i>et al.</i> , 2003



Gambar 1. Variasi gejala penyakit kuning: daun sehat (A); klorosis antar tulang daun, terdapat flek coklat dan tepi daun melengkung ke atas (B); klorosis antar tulang daun, daun keriting, tebal, dan nekrotik (C); klorosis antar tulang daun, warna kuning menyala dan tepi daun rata (D); klorosis antar tulang daun dengan warna kuning dan ungu pucat (E); klorosis ungu tua antar tulang daun (F)



Gambar 2. Malformasi buah tomat: tomat sehat (A); malformasi pada buah tomat muda (B); malformasi pada buah tomat masak (C)

daun, daun keriting, tebal, dan nekrotik; klorosis antar tulang daun, warna kuning menyala dan tepi daun rata; klorosis antar tulang daun dengan warna kuning dan ungu pucat; klorosis ungu tua antar tulang daun. Gejala daun keunguan tersebut diduga karena terjadinya peningkatan pigmen antosianin (Hartono & Wijonarko, 2007). Variasi gejala pada suatu tanaman dapat dipengaruhi oleh faktor tanaman seperti umur tanaman, kultivar, dan genotip tanaman serta faktor lingkungan seperti tingkat kesuburan tanaman, tanah, dan iklim di sekitar tanaman (Mathews, 1992), serta

dapat juga disebabkan oleh virus yang sama tetapi strain berbeda.

Di daerah pengamatan ditemukan buah menjadi malformasi, terdapat benjolan dan buah mengeras baik pada buah muda maupun sudah masak (Gambar 2), sehingga tidak laku dijual walaupun gejala tersebut mungkin terdapat bersama-sama dengan virus lain. Hasil ini mirip dengan yang dilaporkan Hartono dan Wijonarko (2007) bahwa penyakit kuning-ungu menyebabkan tanaman menjadi kerdil, buah kecil mengeras apabila serangan terjadi pada fase vegetatif.

Di lapangan, umumnya gejala *Crinivirus* muncul pada tanaman fase generatif walaupun secara alami dapat menginfeksi fase vegetatif. Hal ini diduga terkait dengan masa inkubasi TICV sekitar 2–4 minggu (Amir, 2009) dan ToCV mempunyai masa inkubasi antara 2–3 minggu, serta tergantung jumlah populasi kutu kebul (Wintermantel & Wisler, 2006). Munculnya gejala ini seiring dengan meningkatnya populasi kutu kebul. Amir (2009) melaporkan bahwa populasi tertinggi *T. vaporarium* teramati pada 6 MST (minggu setelah tanam) atau tanaman memasuki fase berbunga dan menurun seiring bertambahnya umur tanaman sekitar 12 MST.

Di Koping, pada tanaman tomat yang terinfeksi *Crinivirus* juga ditemukan gejala yang mirip dengan Begomovirus, yaitu daun menguning dan kecil-kecil, beberapa tanaman kerdil dan tepi daun melengkung ke atas (*cupping*). Tanaman tomat yang terinfeksi *Crinivirus* mudah dibedakan dengan Begomovirus. Gejala *Crinivirus* yaitu klorosis antar tulang daun dengan warna klorosis bervariasi, daun tetap tumbuh luas, gejala mulai dari daun bagian bawah dan berkembang ke daun bagian atas, sedangkan gejala Begomovirus sangat khas yaitu daun berwarna kuning cerah, penebalan tulang daun, tepi daun menggulung ke atas dan daun muda yang tumbuh berikutnya kecil-kecil sehingga berdasarkan pengamatan gejala dapat digunakan untuk membantu diagnosis (Sulandari, 2004).

RT-PCR

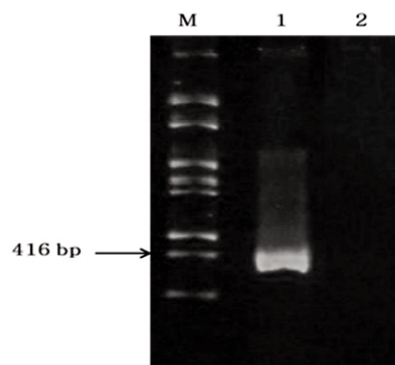
Deteksi RT-PCR menggunakan primer spesifik TICV (TICV-CF dan TICV-CR) mampu mengamplifikasi cDNA dari mRNA pada virus. Primer yang digunakan adalah bagian dari gen yang disebut *divergen coat protein* (CPd) atau *coat protein minor* (CPm) dari TICV. Gen CPd merupakan ciri khas dari virus anggota Famili *Closteroviridae* yang tidak dimiliki

oleh virus kelompok lain (Martelli *et al.*, 2002). Produk RT-PCR dari satu koleksi sampel desa Ketep di Magelang berhasil terdeteksi yang ditunjukkan adanya pita DNA berukuran 416 bp (Gambar 3), sedangkan sampel daun sehat (kontrol negatif) tidak diperoleh pita DNA. Hal ini menunjukkan bahwa primer yang digunakan bersifat spesifik.

Produk DNA TICV dengan ukuran 416 bp selanjutnya diseku dan dianalisis. Primer forward digunakan di dalam analisis sekuen DNA. Sekitar 410 basa nukleotida yang terbaca di dalam analisis sekuen DNA. Hasil analisis BLAST menunjukkan bahwa sekuen tersebut merupakan bagian dari sekuen TICV. Setelah sekuen nukleotida dikoreksi, dihasilkan 376 basa nukleotida dan 124 asam amino (Gambar 4 dan 5).

Hasil sekuen nukleotida selanjutnya dianalisis menggunakan Program BLAST yang terhubung dengan data base NCBI berdasarkan *coat protein divergen* (CPd). Hasil BLAST menunjukkan bahwa isolat Magelang cenderung menyerupai isolat Jepang (AB085603), Italia (EU881362), Perancis (DQ355217), Spanyol (FJ542306), USA (FJ815441), Amerika Utara dan Eropa (NAE; FJ542305). Berdasarkan analisis BLAST sekuen terkoreksi dari TICV sesuai dengan bagian dari sekuen *Open reading frame* (ORF) 7 pada sekuen utuh sejumlah isolat TICV. ORF 7 dari genom TICV mengkode gen CPd. Hal tersebut membuktikan bahwa sekuen DNA hasil PCR merupakan target amplifikasi dari primer spesifik TICV.

Hasil analisis sekuen menunjukkan adanya sejumlah basa nukleotida yang berbeda posisi tertentu pada sekuen TICV. Setelah hasil sekuen DNA TICV isolat Magelang dibandingkan dengan sekuen isolat asal luar negeri, terdapat tiga posisi yang menunjukkan perbedaan basa nukleotida. Perbedaan tersebut menunjukkan terjadinya substitusi basa nukleotida pada isolat (Gambar 4).



Gambar 3. Hasil deteksi RT-PCR: 100 bp DNA ladder (M); daun tomat sehat (1); daun bergejala kuning isolat Magelang (2)

```

TICV-Yogya      ATGTGTTAATAGAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGCTGTTGAAGATC 60
TICV-France    ATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGCTGTTGAAGATC 60
TICV-Japan     ATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGCTGTTGAAGATC 60
TICV-NAE       ATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGCTGTTGAAGATC 60
TICV-Italy     ATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGATGTTGAAGATC 60
TICV-USA       ATGTGTTAATAGAAAAATAAAAAACCTTTGAAGATATCCTGGTCGCAGATGTTGAAGATC 60
*****

TICV-Yogya      ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
TICV-France    ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
TICV-Japan     ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
TICV-NAE       ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
TICV-Italy     ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
TICV-USA       ATAAAGACATAGAGGAAGATAGATCAAAATATGAACTACCTGACGTAACGTCTGAATTC 120
*****

TICV-Yogya      AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
TICV-France    AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
TICV-Japan     AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
TICV-NAE       AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
TICV-Italy     AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
TICV-USA       AACAGGAAGATAAGATAAAAACAAGTGAGGTTGTATGACGTGTTGGATTGTGGTGGCAAAT 180
*****

TICV-Yogya      CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
TICV-France    CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
TICV-Japan     CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
TICV-NAE       CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
TICV-Italy     CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
TICV-USA       CTTTCTCCACTTTAACCATTAACGCAAAATTTAAGCCTTTCAAATTTGTAGATATGGTTA 240
*****

TICV-Yogya      ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
TICV-France    ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
TICV-Japan     ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
TICV-NAE       ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
TICV-Italy     ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
TICV-USA       ACTTATTGCAGTTGTGGTATGGAGACTCAAAATCTAACAATTTAGAGCTGTTGATACGTT 300
*****

TICV-Yogya      ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
TICV-France    ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
TICV-Japan     ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
TICV-NAE       ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
TICV-Italy     ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
TICV-USA       ATGATGAATCACAACGAGATAGATTGACACTTCAACTCATGTATACTAAAAACGGCAGAT 360
*****

TICV-Yogya      GGAGGATGTTGAAGA 376
TICV-France    GGAGGATGTTGAAGA 376
TICV-Japan     GGAGGATGTTGAAGA 376
TICV-NAE       GGAGGATGTTGAAGA 376
TICV-Italy     GGAGGATGTTGAAGA 376
TICV-USA       GGAGGATGTTGAAGA 376
*****

```

Gambar 4. Homologi nukleotida dari CPd (ORF 7) pada isolat Magelang (TICV-Yogya) dengan beberapa isolat dari luar negeri, melalui analisis *multiple sequence alignment* dengan program Clustal W dari *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>); * = nukleotida identik pada semua isolat

Jenis asam amino yang terbentuk ditentukan oleh variasi sekuen basa nukleotida. Berdasarkan sekuen asam amino yang terbentuk dari sekuen nukleotida pada setiap isolat terlihat bahwa tidak semua substitusi basa nukleotida pada kodon tertentu menyebabkan perbedaan asam amino. Substitusi basa nukleotida yang terjadi pada TICV isolat Magelang dan semua isolat luar negeri tidak membedakan asam amino yang terbentuk, yaitu kodon TAA dari isolat Magelang terdapat dan terletak pada urutan yang sama dengan kodon AAA dari semua isolat luar negeri membentuk asam amino yang sama yaitu I (Isoleusin). Namun demikian, adanya kesamaan substitusi basa nukleotida pada kodon tertentu menyebabkan perbedaan asam amino antara isolat Magelang dan semua isolat luar negeri, seperti kodon yang sama yaitu AAA pada isolat Magelang dan semua isolat luar negeri membentuk asam amino yang berbeda yaitu I pada isolat Magelang dan asam amino lysin (K) pada semua isolat luar negeri (Gambar 4 dan 5).

Isolat Magelang memiliki satu asam amino (I) yang membedakan dengan isolat NAE dan Jepang (K) dan dua asam amino yang membedakan dengan isolat Italia dan USA (I→K dan A→D yaitu alanin→asam aspartat), serta Perancis (I→K dan G→D yaitu glicsin→asam aspartat). Adanya sejumlah asam amino yang berbeda di antara isolat TICV akan menghasilkan ekspresi protein yang berbeda. Hal

tersebut mengindikasikan adanya interaksi spesifik antara TICV dengan tanaman dan TICV dengan vektor baik dalam proses infeksi maupun penularan.

Hasil analisis homologi sekuen pada isolat Magelang dengan isolat negara lain yang dibandingkan terdapat beberapa distribusi perbedaan dalam susunan nukleotida (Gambar 4). Sekuen isolat Magelang dengan sekuen semua isolat negara lain menunjukkan homologi yang tinggi baik berdasarkan sekuen nukleotida maupun asam aminonya (Tabel 2), sampel tanaman tomat sakit isolat Magelang menunjukkan satu nukleotida tergantikan (Homologi DNA 99,7%; Homologi asam amino 98,3%) jika dibandingkan dengan TICV isolat Jepang (Hartono *et al.*, 2002) dan isolat dari Amerika Utara dan Eropa (NAE; TICV SP5131; Orilio & Navas-Castillo, 2009) dan tidak ada perubahan pada sekuen asam aminonya, sedangkan jika dibandingkan dengan TICV isolat Perancis (Dalmon *et al.*, 2005), isolat Italia (Barone *et al.*, 2009), dan isolat USA (Wintermantel *et al.*, 2009) terdapat dua nukleotida tergantikan (Homologi DNA 99,4%; Homologi asam amino 97,5%) yang menyebabkan perubahan satu sekuen asam aminonya.

Analisis homologi sekuen juga dibandingkan antara isolat TICV Magelang dengan isolat *Tomato chlorosis virus* (ToCV) Beijing asal China, isolat *Lettuce chlorosis virus* (LCV) asal USA, dan *Citrus tristeza virus* (CTV) Qaha asal Mesir menunjukkan

```

TICV-Japan      V L I E K I K T F E D I L V A A V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G G K S   60
TICV-NAE       V L I E K I K T F E D I L V A A V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G G K S   60
TICV-Italy     V L I E K I K T F E D I L V A D V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G G K S   60
TICV-USA       V L I E K I K T F E D I L V A D V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G G K S   60
TICV-France    V L I E K I K T F E D I L V A A V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G D K S   60
TICV-Yogya     M L I E I I K T F E D I L V A A V E D H K D I E E D R S K Y E L P D V T S E F Q Q E D K I K Q V R L Y D V L D C G G K S   60
                :*** *****
                *****

TICV-Japan      F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
TICV-NAE       F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
TICV-Italy     F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
TICV-USA       F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
TICV-France    F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
TICV-Yogya     F S T L T I N A K F K P F K F V D M V N L L Q L W Y G D S K S N N L E L L I R Y D E S Q R D R L T L Q L M Y T K N G R W   120
                *****

TICV-Japan      R M F E   124
TICV-NAE       R M F E   124
TICV-Italy     R M F E   124
TICV-USA       R M F E   124
TICV-France    R M F E   124
TICV-Yogya     R M F E   124
                ****

```

Gambar 5. Homologi asam amino dari CPd (ORF 7) pada isolat Magelang (TICV-Yogya) dengan beberapa isolat dari luar negeri, melalui analisis *multiple sequence alignment* dengan program CLUSTAL W dari *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/>); * = asam amino identik pada semua isolat

Tabel 2. Persentase kesamaan basa nukleotida dan asam amino dari sebagian gen CPd pada TICV isolat Magelang dengan virus anggota genus *Crinivirus* dan *Closterovirus* dari luar negeri menggunakan *software* BioEdit

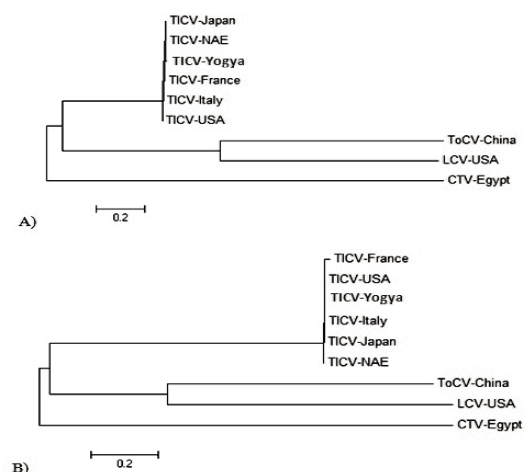
	TICV-Yogya	TICV-France	TICV-Italy	TICV-Japan	TICV-NAE	TICV-USA	ToCV-China	LCV-USA	CTV-Egypt
TICV-Yogya	*								
TICV-France	99,4 (97,5)	*							
TICV-Italy	99,4 (97,5)	99,4 (98,3)	*						
TICV-Japan	99,7 (98,3)	99,7 (99,1)	99,7 (99,1)	*					
TICV-NAE	99,7 (98,3)	99,7 (99,1)	99,7 (99,1)	100 (100)	*				
TICV-USA	99,4 (97,5)	99,4 (98,3)	100 (100)	99,7 (99,1)	99,7 (99,1)	*			
ToCV-China	42,2 (18,5)	42,2 (18,5)	42 (18,5)	42 (18,5)	42 (18,5)	42 (18,5)	*		
LCV-USA	38,4 (12,9)	38,9 (12,2)	38,9 (12,9)	38,6 (12,9)	38,6 (12,9)	38,9 (12,9)	41,3 (17,5)	*	
CTV-Egypt	43,3 (7,2)	43,5 (7,2)	43,5 (7,2)	43,3 (7,2)	43,3 (7,2)	43,5 (7,2)	34 (3,3)	30 (7,6)	*

Keterangan: Isolat Yogya = Isolat Magelang merupakan hasil analisis sekuen dalam penelitian ini; Data di dalam tanda kurung merupakan persentase kesamaan asam amino; France (DQ355217.1), Italy (EU881362.1), Japan (AB085603.1), NAE = North America and Europe (FJ542306.1), dan USA (FJ815441.1); ToCV isolat Beijing asal China (KC887999.1); LCV asal USA (NC_012910.1); CTV isolat Qaha asal Egypt/Mesir (AY340974.1)

nukleotida yang identik berturut-turut 42,2% (ToCV), 38,4% (LCV), dan 43,3% (CTV), persentase ini lebih rendah apabila dibandingkan dengan asam amino yang identik berturut-turut 18,5% (ToCV), 12,9% (LCV) dan 7,2% (CTV). Hasil ini menunjukkan bahwa virus penyebab penyakit kuning ungu pada tanaman tomat asal Magelang merupakan spesies yang sama dengan isolat dari luar negeri yaitu *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) dan bukan ToCV karena sekuen asam aminonya hanya identik 42,2% saja. Menurut Martelli *et al.* (2000), apabila persentase kesamaan asam amino antara virus satu dengan virus lain < 90% berarti virus tersebut dikelompokkan ke dalam anggota spesies yang berbeda. Sebelumnya hasil penelitian Hartono dan Wijonarko (2007) juga melaporkan bahwa TICV Indonesia termasuk anggota *Crinivirus*.

Analisis pohon filogenetik dengan menggunakan pendekatan *Neighbor Joining* dari variasi basa nukleotida penyusun sekuen DNA dan asam amino lebih jelas memperlihatkan hubungan kekerabatan antara TICV isolat Magelang yang dibandingkan dengan virus anggota genus *Crinivirus* yang ada di *database Gen Bank* menunjukkan bahwa TICV asal Magelang berada dalam satu cabang kelompok dengan TICV asal Jepang, Amerika utara dan Eropa, Perancis, Italia, dan USA (Gambar 6.A dan 6.B). Hal tersebut menunjukkan bahwa variasi basa nukleotida dari bagian tertentu pada sekuen parsial DNA TICV dan asam amino mempunyai tingkat kesamaan yang tinggi.

Hasil analisis filogenetik tersebut juga memperlihatkan bahwa TICV isolat Magelang terpisah dari



Gambar 6. Pohon filogenetik yang menggambarkan hubungan kekerabatan antara TICV isolat Magelang dengan virus genus *Crinivirus* dan anggota *Closteroviridae* menggunakan program Mega 6: berdasarkan perbedaan sekuen nukleotida dari CPd (A); berdasarkan variasi asam amino dari CPd (B)

kelompok genus *Crinivirus* lain tetapi masih dalam satu cabang dengan ToCV asal China dan LCV asal USA serta berbeda cabang dengan LCV asal Mesir (Gambar 6.A dan 6.B). LCV merupakan spesies dari genus *Crinivirus* dan CTV termasuk dalam genus *Closterovirus*, famili *Closteroviridae*, mendukung data bahwa TICV adalah anggota genus *Crinivirus*.

KESIMPULAN

Berdasarkan sekuen nukleotida dan asam amino gen CPd, virus isolat Magelang yang menginfeksi tanaman tomat terdeteksi sebagai TICV yang termasuk genus *Crinivirus*, famili *Closteroviridae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Accoto G.P., A.M. Vaira, M. Vecchiati, M.M. Finetti Sialer, D. Gallitelli, & M. Davino. 2001. First Report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. *Plant Disease* 85: 1208.
- Amir. 2009. *Kajian Penularan dan Respon Ketahanan Berbagai Varietas Tomat terhadap Tomato infectious chlorosis virus*. Tesis. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 42 p.
- Anonim. 2013. *Volume Produksi, Impor, dan Ekspor Sayuran Segar Tahun 2011*. <http://hortikultura.deptan.go.id>, diakses 17/2/13.
- Barone, M., M. Senatore, A. Zoina, & D. Alioto. 2009. Severe outbreak of *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) on Tomato Crops in Campania, Southern Italy. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/215399586?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=2&RD=R954RYXA01R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/215399586?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=2&RD=R954RYXA01R), diakses 3/3/14.
- Costa, H.S. & J.K. Brown. 1991. Variation in Biological Characteristics and Esterase Patterns among Populations of *Bemisia tabaci* and the Association of One Population with Silverleaf Symptom Induction. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 61: 211–219.
- Dalmon, A., S. Bouyer, M. Cailly, M. Girard, H. Lecoq, C. Desbiez, & M. Jacquemond. 2005. First Report of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Tomato Crops in France. *Plant Disease* 89: 1243–1243.
- Dovas, C.I., N.I. Katis, & A.V. Avgelis. 2002. Multiplex detection of *Criniviruses* Associated with Epidemics of a Yellowing Disease of Tomato in Greece. *Plant Disease*, 86: 1345–1349.
- Duffus, J.E., H.-Y Liu, & G.C. Wisler. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus*- A new clostero-like Virus Transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *European Journal of Plant Pathology* 102: 219–226.
- Hartono, S. & A. Wijonarko. 2007. Karakterisasi Biologi Molekuler *Tomato infectious chlorosis virus* Penyebab Penyakit Kuning pada Tanaman Tomat di Indonesia. *Agricultural Science* 9: 139–146.
- Hartono, S., T. Natsuaki, H. Sayama, H. Atarashi, & S. Okuda. 2003. Yellowing Disease of Tomatoes Caused by *Tomato infectious chlorosis virus* Newly Recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 69: 61–64.
- Hirota, T., T. Natsuaki, T. Murai, H. Nishigawa, K. Niibori, K. Goto, S. Hartono, G. Suastika, & S. Okuda. 2010. Yellowing Disease of Tomato Caused by *Tomato chlorosis virus* Newly Recognized in Japan. *Journal of General Plant Pathology* 76:168–171.
- Jacquemond, M., A. Dalmont, F. Fabre, L. Guilbaud, & H. Lecoq. 2009. Comparative Whitefly Transmission of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* from Single or Mixed Infectious. *J. Plant Pathology* 58: 221–227.
- Li, R. H., G. C. Wisler, H.-Y. Liu, & J. E. Duffus. 1998. Comparison of Diagnostic Techniques for Detecting *Tomato infectious chlorosis virus*. *Plant Disease* 82: 84–88.
- Louro, D., G.P. Accotto, & A.M. Vaira. 2000. Occurrence and Diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. *European Journal of Plant Pathology* 106: 589–592.
- Martelli, G. P., A.A. Agranovsky, M. Bar-Joseph, D. Boscia, T. Candresse, R.H.A. Coutts, V. V. Dolja, B.W. Falk, D. Gonsalves, W. Jelkmann, A.V. Karasev, A. Minafra, A.F. Murant, S. Namba, C.L. Niblett, H.J. Vetten, & N. Yoshikawa. 2000. *Closteroviridae*, Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, p. 943–964. In M.H.V. Van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bioshop, E.B. Cartens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, & R.B. Wickner (eds.), *Virus Taxonomy*, Academic Press, San Diego.
- Mathews, R.E.F. 1992. *Fundamental of Plant Virology*. Academic Press Inc., San Diego. 403 p.
- Navas-Castillo J., R. Camero, M. Bueno, & E. Moriones. 2000. Severe Yellowing Outbreaks in Tomato in Spain Associated with Infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 84: 835–837.
- Orilio, A.F. & J. Navas-Castillo. 2009. The Complete Nucleotide Sequence of the RNA2 of the *Crinivirus Tomato infectious chlorosis virus*: Isolates from North America and Europe are Essentially Identical. *Archives of Virology* 154: 683–687.
- Sulandari, S. 2004. *Karakterisasi Biologi, Serologi, dan Analisis Sidik Jari DNA Virus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning Cabai*. Disertasi. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 48 p.

- Wintermantel, W. M. 2004. Emergence of Greenhouse Whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) Transmitted *Criniviruses* as Threats to Vegetable and Fruit Production in North America. *APSnet feature*. <http://www.apsnet.org/online/feature/whitefly/>, diakses 12/2/13.
- Wintermantel, W.M. & G.C. Wisler. 2006. Vector Specificity, Host Range, and Genetic Diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Disease* 90: 814–819.
- Wintermantel, W. M., H. A. G. Laura, R. Sakhuja, Li, H-Y. Liu, & I. E. Tzanetakis. 2009. The Complete Nucleotide Sequence and Genome Organization of *Tomato infectious chlorosis virus*: A Distinct *Crinivirus* Most Closely Related to *Lettuce infectious yellow virus*. *Archives of Virology* 154: 1335–1341.
- Wisler, G. C., J.E. Duffus, H.-Y. Liu, R. Li, & B.W. Falk. 1997. New Whitefly-transmitted *Closterovirus* Identified in Tomatoes. *California Agriculture* 51: 24–26.
- Wisler, G. C., J.E. Duffus, H.-Y. Liu, & R.H. Li. 1998a. Ecology and Epidemiology of Whitefly-transmitted *Closteroviruses*. *The American Phytopathological Society* 82: 270–280.
- Wisler, G.C., R.H. Li, H.-Y. Liu, D.S. Lowry, & J.E. Duffus. 1998b. *Tomato chlorosis virus*: A New Whitefly-transmitted, Phloem-limited Bipartite *Closterovirus* of Tomato. *Phytopathology* 88: 402–409.