

IDENTIFIKASI *TOMATO INFECTIOUS CHLOROSIS VIRUS* PENYEBAB PENYAKIT KLOOROSIS PADA TANAMAN TOMAT DI CIPANAS JAWA BARAT MELALUI PERUNUTAN NUKLEOTIDA GEN PROTEIN SELUBUNG UTAMA

Fitrianiingrum Kurniawati, Gede Suastika, & Giyanto

Departemen Proteksi Tanaman Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor
Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
E-mail: fitrianiingrumk@gmail.com

ABSTRACT

Identification of tomato infectious chlorosis virus, the causal agent of chlorosis disease on tomato in Cipanas West Java by sequencing of main coat protein gene nucleotide. *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) causes chlorosis on tomato. Tomatoes infected by this virus shows interveinal yellowing, necrotic, bronzing, brittleness, and declining in productivity. This study aims to identify the causal agent of chlorotic disease on tomato by sequencing the coat protein gene. The methods involve collecting infected plants, total RNA extraction, cDNA synthesis, DNA amplification, visualization of the results of reverse transcription polymerase chain reaction (PCR), and phylogenetic analysis using BLAST, clustal w, Bioedit v 7.0.5.3, MEGA v 6:06. RT-PCR using spesific primers (CP-F TICV Bam and TICV R-Hind) amplified a DNA band of 792 bp, which has been successfully sequenced and identified as TICV. Nucleotide sequences homology analysis showed that TICV Indonesia_TWJ isolate Cipanas is the same strain as TICV from other countries (99.4 – 100%), such as Spain, Greece, USA, France, and Italy.

Key words: chlorosis disease, coat protein gene, reverse transcription polymerase chain reaction, sequencing, TICV

ABSTRAK

Identifikasi Tomato infectious chlorosis virus penyebab penyakit klorosis pada tanaman tomat di Cipanas Jawa Barat melalui perunutan nukleotida gen protein selubung utama. *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) merupakan penyebab penyakit klorosis pada tanaman tomat. Tomat yang terserang penyakit ini menunjukkan gejala klorosis pada bagian antara tulang daun, nekrotik, *bronzing*, daun mudah rapuh, dan produksi buah menurun. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi penyebab penyakit klorosis pada tanaman tomat melalui perunutan nukleotida gen protein selubung. Metode penelitian ini meliputi pengumpulan tanaman sakit, ekstraksi RNA total tanaman, sintesis cDNA, amplifikasi DNA, visualisasi hasil *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR), analisis perunutan nukleotida dan filogenetika menggunakan program BLAST, Clustal W, Bioedit Sequence Alignment Editor v 7.0.5.3, MEGA v 6.06. Berdasarkan hasil RT-PCR menggunakan pasangan primer spesifik (TICV CP-F Bam dan TICV R-Hind) diperoleh pita DNA berukuran 792 pb, telah berhasil dirunut berdasarkan runutan basa nukleotida dan diidentifikasi sebagai TICV. Analisis homologi runutan nukleotida menunjukkan bahwa TICV TWJ asal Cipanas merupakan strain virus yang sama dengan TICV dari negara lain (99.4-100%) seperti Spanyol, Yunani, USA, Perancis, dan Italia.

Kata kunci: gen coat protein, klorosis, perunutan nukleotida, TICV, *reverse transcription polymerase chain reaction*

PENDAHULUAN

Tanaman tomat merupakan salah satu tanaman hortikultura yang mempunyai banyak manfaat. Salah satu hambatan dalam budi daya tomat adalah serangan virus tanaman. Banyak jenis virus tanaman yang telah dilaporkan menyerang tanaman tomat. *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Xue *et al.*, 1998), *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (Segev *et al.*, 2004), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Köklü *et al.*, 2006), *Tomato leaf curl virus* (TLCV) (Reddy *et al.*, 2005), dan *Tomato*

spotted wilt virus (TSWV) (Hu *et al.*, 2011) merupakan virus yang telah dilaporkan menyerang tanaman tomat di beberapa negara. Beberapa tahun terakhir ini di berbagai negara telah dilaporkan adanya virus baru yang menginfeksi tanaman tomat. Tanaman tomat yang terinfeksi virus ini menunjukkan gejala klorosis, sehingga penyakitnya disebut dengan penyakit klorosis. Penyakit klorosis ini disebabkan oleh *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) (Dalmon *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2004). Penyakit ini telah ditemukan di beberapa sentra produksi tomat di Indonesia, seperti Garut, Cianjur, Bogor,

Magelang, Rinjani, dan Yogyakarta (Hartono & Wijonarko, 2007; Fitriyari, 2010; Suastika *et al.*, 2010; Sa'adah, 2013).

Gejala serangan TICV pada tanaman tomat ditunjukkan oleh daun-daun menguning (Duffus *et al.*, 1996), klorosis pada bagian antara tulang daun. Gejala klorosis yang sangat parah akan menyebabkan daun mengalami nekrotik (kematian jaringan) dan menjadi rapuh, serta ukuran buah menjadi lebih kecil, mudah gugur dan proses pemasakan terganggu sehingga hasil panen menurun (Wisler *et al.*, 1998a; Wisler *et al.*, 1998b).

TICV ditularkan dari satu tanaman ke tanaman lainnya oleh serangga vektor *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae) yang dikenal dengan nama kutu kebul. Penularan dapat terjadi secara cepat ke seluruh areal pertanaman karena serangga vektor bersifat aktif. TICV ditularkan oleh serangga vektor secara semipersisten (Duffus *et al.*, 1996; Wintermantel, 2004).

Teknik deteksi TICV berbasis molekuler melalui *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) telah dilakukan oleh para peneliti. Teknik deteksi ini dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang berbeda-beda tergantung dari bagian mana yang akan diamplifikasi. Hartono & Wijonarko (2007) serta Jacquemond *et al.* (2009) telah melakukan deteksi TICV dengan teknik RT-PCR menggunakan pasangan primer *heat shock protein* (HSP-70h), Fitriyari (2010) menggunakan pasangan primer yang telah disisipi dengan runutan enzim restriksi Bam HI dan HindIII (TICV-CP F Bam dan TICV-CP R Hind), Orillio & Navas-Castillo (2009), Andriani (2011), dan Nurulita & Suastika (2013) menggunakan pasangan primer TICV-CF dan TICV-CR. Deteksi dengan RT-PCR dapat dilakukan dengan cepat dan hasilnya akurat.

Teknik deteksi berbasis molekuler selain RT-PCR adalah dengan perunutan DNA (*sequencing*). Perunutan DNA adalah proses penentuan urutan nukleotida pada suatu fragmen DNA. Tujuan dari proses ini adalah untuk menentukan identitas maupun fungsi fragmen suatu DNA dengan membandingkannya dengan fragmen DNA lain yang telah diketahui. Nurulita & Suastika (2013) telah melakukan perunutan nukleotida TICV pada gen protein selubung minor (CPm). Perbedaan CPm dan CP terletak pada fungsinya. CPm berperan dalam penularan dengan reseptornya, CP utama berperan dalam perakitan virus. Perunutan nukleotida gen protein selubung utama (CP) belum pernah dilakukan sehingga penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi TICV penyebab penyakit klorosis pada

tanaman tomat melalui perunutan nukleotida gen protein selubung utama (CP).

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor dan Laboratorium Biokimia Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB-BIOGEN), pada bulan November 2011 sampai dengan Februari 2012.

Pengumpulan Tanaman Sakit. Pengambilan sampel tanaman bergejala klorosis dilakukan secara purposif (*purposive sampling*). Pengambilan dan pengumpulan sampel dilakukan di desa Pacet, Kecamatan Cipanas, Kabupaten Cianjur, Jawa Barat. Daun tanaman yang terinfeksi TICV diamati dan difoto gejalanya, kemudian diambil untuk diidentifikasi dengan menggunakan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Ekstraksi RNA Total. Ekstraksi RNA total dilakukan dengan menggunakan *Qiagen RNAeasy Plant Mini Kit* dan dikerjakan sesuai dengan protokol yang diberikan (Qiagen, 2001).

Sintesis complementary (c) DNA. RNA hasil ekstraksi disintesis menjadi cDNA dengan menggunakan teknik *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Proses RT-PCR dilakukan menggunakan kit komersial *Access RT-PCR System* (Promega, US). Hasil ekstraksi RNA berupa RNA total selanjutnya dilakukan sintesis complementary cDNA melalui proses *Reverse Transcription* (RT) atau transkripsi balik yang digunakan untuk mengubah RNA menjadi cDNA. Tabung mikro diisi dengan 10 µl reaksi RT yang terdiri atas 1 x ddH₂O 3,7 µl, 10x bufer RT 2 µl, 10 mM dNTP 0,5 µl, 50 mM dTT 0,35 µl, 10 µM random heksamer 0,75 µl, MMuLV Rev 0,35 µl, Ribolock 0,35 µl, dan RNA 2 µl. Komponen-komponen tersebut digunakan untuk satu kali reaksi RT. Reaksi RT dilakukan dalam sebuah *Automated Thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700; PE Applied Biosystem, US) yang diprogram untuk satu siklus pada suhu 25 °C selama 5 menit, 42 °C selama 60 menit, dan 70 °C selama 15 menit. Siapan cDNA hasil RT digunakan sebagai templat dalam reaksi PCR.

Amplifikasi DNA. Reaksi PCR dengan total volume 25 µl digunakan untuk memperbanyak pita cDNA yang telah terbentuk dari proses RT. Komposisi bahan yang digunakan dalam reaksi PCR terdiri atas 2x Go tag green

master mix PCR 12,5 μ l, 10 μ M Primer spesifik TICV-CP F-Bam no ATG (5'-AATTAAGGATCCGAAAAC TATCTGGTAATGCAAAC-3') 1 μ l dan TICV-CP R-Hind (5'-AATTAAGCTTTTAGCATGGGTGTT TCATATCAGCC-3') (Fitriasari, 2010) 1 μ l, 1 x ddH₂O 8,5 μ l, dan 2 μ l cDNA hasil RT. Proses ini didahului dengan denaturasi awal pada 94 °C selama 4 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94 °C selama 1 menit, penempelan primer (*annealing*) pada 55 °C selama 1 menit, dan pemanjangan (*Extension*) pada 72 °C selama 2 menit. Kontrol positif TICV yang digunakan adalah sampel tanaman tomat yang terinfeksi TICV hasil penelitian Fitriasari (2010), kontrol negatif menggunakan template tanaman tomat sehat, sampel TICV Indonesia_TWJ berasal dari tanaman tomat yang bergejala *interveinal yellowing*.

Visualisasi Hasil RT-PCR. Hasil amplifikasi DNA yang didapat dari proses PCR selanjutnya dilakukan visualisasi dengan elektroforesis *gel agarose* 1% dalam bufer elektroforesis Tris-borat EDTA 0,5x (40 mM Tris, 20 mM sodium asetat, dan 1 mM EDTA, pH 7,0) dengan pewarnaan ethidium bromide (0,5 μ g/10 ml). Visualisasi pita DNA dilakukan dengan meletakkan gel agarose pada *UV transilluminator*. Dokumentasi pita DNA dilakukan menggunakan kamera digital.

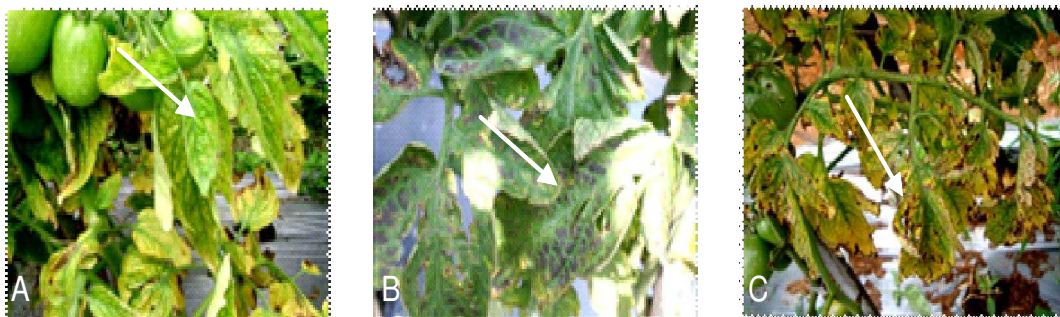
Analisis Perunutan Nukleotida dan Filogenetik. Sebanyak 50 μ l hasil PCR dikirim ke PT. Genetika Science Indonesia untuk disekuensing. Elektroforegram yang didapatkan dianalisis menggunakan program *sequence scanner* v 1.0 (Applied Biosystem, USA). Hasil perunutan nukleotida yang diperoleh kemudian dikonfirmasi ke *GenBank* dengan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) yang tersedia pada

National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2014). Runutan nukleotida yang telah dikonfirmasi kemudian disejajarkan dengan menggunakan penyejajaran berganda ClustalW pada program *Bioedit Sequence Alignment Editor* v 7.0.5.3 (Hall, 1999). Pohon filogenetika dikonstruksi menggunakan perangkat lunak *Molecular Evolutionary Genetic Analysis Software* (MEGA) v 6.06 dengan metode UPGMA menggunakan bootstrap 1000 kali ulangan. Rujukan runutan nukleotida isolat TICV dari negara lain diperoleh dari GenBank.

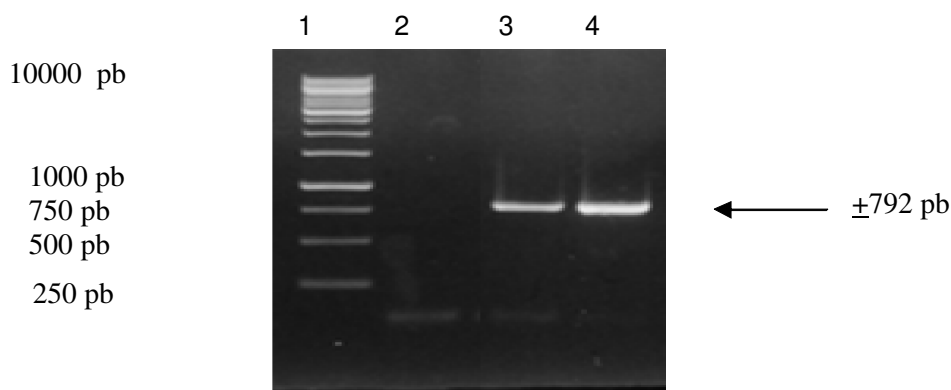
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penyakit Klorosis pada Tanaman Tomat. Survei yang dilakukan di Desa Pacet, Kecamatan Cipanas, Kabupaten Cianjur, Provinsi Jawa Barat berhasil menemukan tanaman tomat yang memperlihatkan gejala klorosis. Penyakit ini ditandai dengan perubahan warna kuning pada jaringan diantara tulang daun (*interveinal yellowing*), yang dimulai dari daun-daun tua di bagian bawah kemudian berkembang ke bagian pucuk (Gambar 1A); kadang-kadang terjadi perubahan warna pada bagian daun menjadi merah keunguan (*bronzing*) (Gambar 1B); dan pada gejala lanjut beberapa bagian daun klorotik mengalami nekrotik (Gambar 1C). Gejala semacam ini bersesuaian dengan gejala yang diinduksi oleh TICV menurut peneliti terdahulu (Duffus *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1998; Wintermantel & Wisler, 2006; Wisler *et al.*, 1998a).

Deteksi dengan RT-PCR. Amplifikasi menggunakan primer spesifik TICV-CP F-Bam no ATG dan TICV-CP R-Hind berhasil mendapatkan pita DNA dengan ukuran sekitar 792 pb (Gambar 2), hal ini sesuai dengan hasil penelitian Fitriasari (2010). Produk RT-PCR TICV



Gambar 1. Gejala penyakit klorosis pada tanaman tomat yang ditemukan di lapangan; (A) *Interveinal yellowing*; (B) Terjadi perubahan warna pada bagian daun menjadi merah keunguan (*bronzing*) dan (C) daun mengalami nekrotik



Gambar 2. Hasil amplifikasi sampel DNA CP-TICV dengan metode RT-PCR. Lajur 1: marker 1 kb (Fermentas, US), Lajur 2: kontrol negatif (tanaman tomat sehat), Lajur 3: kontrol positif (TICV penelitian Fitriasari, 2010), Lajur 4: sampel tanaman tomat yang terinfeksi TICV dari lapangan yang menunjukkan gejala *interveinal yellowing*

berhasil dirunut, dan hasil runutan menunjukkan kualitas yang baik dan tidak ada kesalahan dalam perunutan berdasarkan analisis kesejajaran.

Analisis Perunutan Nukleotida dan Filogenetik.

Menurut Barton (1998) analisis tingkat homologi runutan nukleotida merupakan cara yang sah untuk mengidentifikasi suatu spesies virus. Homologi urutan nukleotida virus penyebab klorosis pada tanaman tomat dapat dilihat pada Tabel 1.

Homologi TICV Indonesia_TWJ dengan TICV dari negara lain berkisar antara 99,4–100%. Menurut Fauquet *et al.* (2005) jika suatu spesies virus mempunyai persamaan runutan nukleotida pada bagian gen *protein selubung* lebih dari 90% maka virus-virus tersebut merupakan suatu spesies virus yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa spesies TICV TWJ yang berasal dari Cipanas, Jawa Barat merupakan spesies TICV yang sama dengan TICV yang berasal dari negara Spanyol, Yunani, USA, Italia, dan Perancis.

Tabel 1. Homologi runutan nukleotida virus penyebab klorosis pada tanaman tomat di Cipanas, Jawa Barat (TICV Indonesia_TWJ) dengan TICV yang telah dilaporkan oleh beberapa negara lain

No	Nama Isolat	No Akses	Homologi (%)						
			1	2	3	4	5	6	
1	TICV Indonesia_TWJ		ID						
2	TICV Spanyol_SP5131	FJ542305	100	ID					
3	TICV Yunani_TI-Th173	HG380072	99,7	99,7	ID				
4	TICV USA_CA4	FJ542306	99,7	99,7	100	ID			
5	TICV Perancis_Fr	EU625351	99,6	99,6	99,8	99,8	ID		
6	TICV USA_OC	FJ815441	99,4	99,4	99,7	99,7	99,6	ID	

- TICV Indonesia_TWJ (1) : Isolat TICV Cipanas, Jawa Barat, Indonesia
- TICV Spanyol _SP1531 (2) : Isolat TICV Spanyol (Orilio & Navas-Castillo, 2009)
- TICV Yunani_TI-Th173 (3) : Isolat TICV Yunani (Orfanidou *et al.*, 2014)
- TICV USA_CA4 (4) : Isolat Amerika Utara dan Eropa (Orilio & Navas-Castillo, 2009)
- TICV Perancis_Fr (5) : Isolat Perancis (Jacquemond *et al.*, 2009)
- TICV USA_OC (6) : Isolat Orange County, California, Amerika Serikat (Wintermantel *et al.*, 2009)

Panjang gen *protein selubung* TICV adalah sekitar 760 pb (Hartono *et al.*, 2003). Panjang sebagian gen *protein selubung* TICV yang berhasil dirunut dan disejajarkan berkisar 792 pb (Gambar 3). Runutan nukleotida sebagian gen protein selubung isolat TICV Indonesia_TWJ yang berasal dari Cipanas, Jawa Barat setelah disejajarkan dengan isolat-isolat TICV dari negara lain terletak antara nukleotida ke- 1 sampai 792 pada runutan nukleotida RNA2 genom TICV. Perbedaan runutan nukleotida antara isolat TICV Indonesia_TWJ (Cipanas-Jawa Barat) dengan isolat dari negara lain terjadi pada posisi nukleotida ke 29, 54, 212, 228, dan 525 (Gambar 3). Perunutan dan penyejajaran nukleotida ini dilakukan untuk memastikan bahwa runutan tersebut

adalah runutan sebagian gen protein selubung TICV yang berada pada RNA 2 dari genom TICV (Orilio & Navas-Castillo, 2009).

Analisis pohon filogenetika menunjukkan bahwa hubungan kekerabatan enam isolat TICV terbagi menjadi 2 kelompok (Gambar 4). Kelompok I terdiri dari isolat TICV asal Yunani, Amerika Utara dan Eropa (USA_CA4), Perancis (Fr). Indonesia, Spanyol, dan Amerika Serikat Orange County (USA_OC). Hal ini menunjukkan bahwa isolat TICV asal Indonesia masih berkerabat dekat dengan isolat asal Spanyol, Amerika Serikat Orange County (USA_OC), Yunani, Perancis (Fr), Amerika Utara dan Eropa (USA_CA4).

A

Alignment: A:\Pipiet\jurnal TICV\rawtext ticv 180615 new

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      5      15      25      35      45      55
TICV Ind   ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TAT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTGAAC TCT
TICV Spany ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TAT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTGAAC TCT
TICV Yunan ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TAT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTAAC TCT
TICV USA_C ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TAT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTAAC TCT
TICV Peran ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TAT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTAAC TCT
TICV USA_O ATGGAAAAC TATCTGGTAA TGCAAAC TT GATGAAAAC TA ACACCAGTCG
TGTAAC TCT
Clustal Co *****
*****
*****
*****
*****
*****
*****
*****

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      65      75      85      95      105     115
TICV Ind   GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
TICV Spany GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
TICV Yunan GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
TICV USA_C GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
TICV Peran GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
TICV USA_O GATGGAATTG GAAGTCACAT GGAGCATGAT GATGATGACA GGTCAGTCAA
CGGACCTCCA
Clustal Co *****
*****
*****
*****
*****
*****
*****
*****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      125    135    145    155    165    175
TICV Ind  AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
TICV Spanyol AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
TICV Yunan AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
TICV USA_C AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
TICV Peran AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
TICV USA_O AGTGATGAGA TAAACAATCA TACTACGAGA TCTGTTCATG GTAGAGATCA
CACGTCAGGT
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      185    195    205    215    225    235
TICV Ind  AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
TICV Spanyol AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
TICV Yunan AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
TICV USA_C AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
TICV Peran AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
TICV USA_O AATATAGGAG ATTACTCAA AGCTGACTTG AATAGAATTA TGGTCAAAGT
CAGTAGACCG
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      245    255    265    275    285    295
TICV Ind  GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGAATATCTGAAA
TICV Spanyol GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGA
ATATCTGAAA
TICV Yunan GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGA
ATATCTGAAA
TICV USA_C GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGA
ATATCTGAAA
TICV Peran GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGA
ATATCTGAAA
TICV USA_O GATGCTATGA GTGAATCCGATAGTAACTTG TATAAAGAGG TGATTGTTGA
ATATCTGAAA
Clustal Co *****

```

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      305    315    325    335    345    355
TICV Ind  AACAAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTT TAGTGGTTGCATT TTTTGTGCA

```

TICV Spanyol AACAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTTTAG TGGTTGCATT
 TTTTGTGCA
 TICV Yunan AACAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTTTAG TGGTTGCATT
 TTTTGTGCA
 TICV USA_C AACAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTTTAG TGGTTGCATT
 TTTTGTGCA
 TICV Peran AACAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTTTAG TGGTTGCATT
 TTTTGTGCA
 TICV USA_O AACAATTGTA CTGGAGGTGC GGAACCGGAT AAAGTTTTAG TGGTTGCATT
 TTTTGTGCA
 Clustal Co *****

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 365 375 385 395 405 415

TICV Ind CTATGTCAGT ATGCTCTCAACTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGACAGGACTGTG
 TICV Spanyol CTATGTCAGT ATGCTCTCAA CTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGA
 CAGGACTGTG
 TICV Yunan CTATGTCAGT ATGCTCTCAA CTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGA
 CAGGACTGTG
 TICV USA_C CTATGTCAGT ATGCTCTCAA CTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGA
 CAGGACTGTG
 TICV Peran CTATGTCAGT ATGCTCTCAA CTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGA
 CAGGACTGTG
 TICV USA_O CTATGTCAGT ATGCTCTCAA CTCTGGCACT TCGGTAAAG CAATAAGTGA
 CAGGACTGTG
 Clustal Co *****

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 425 435 445 455 465 475

TICV Ind GATTTGAGTT TTGGGTATGACAATCAAAAATATACAGTTAAAGCGGGACATTTTTATCA
 TICV Spanyol GATTTGAGTT TTGGGTATGA CAATCAAAA TATACAGTTA AAGCGGGACA
 TTTTTATCA
 TICV Yunan GATTTGAGTT TTGGGTATGA CAATCAAAA TATACAGTTA AAGCGGGACA
 TTTTTATCA
 TICV USA_C GATTTGAGTT TTGGGTATGA CAATCAAAA TATACAGTTA AAGCGGGACA
 TTTTTATCA
 TICV Peran GATTTGAGTT TTGGGTATGA CAATCAAAA TATACAGTTA AAGCGGGACA
 TTTTTATCA
 TICV USA_O GATTTGAGTT TTGGGTATGA CAATCAAAA TATACAGTTA AAGCGGGACA
 TTTTTATCA
 Clustal Co *****

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
 485 495 505 515 525 535

TICV Ind TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCAACGCTCTAAGGAGGTTTCAT GCGATCTAGT
 TICV Spanyol TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCA AACGCTCTAA GGAGGTTTCAT
 GCGATCTAGT
 TICV Yunan TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCA AACGCTCTAA GGAGGTTTCAT
 GCGATCTAGT
 TICV USA_C TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCA AACGCTCTAA GGAGGTTTCAT
 GCGATCTAGT

TICV Peran TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCA AACGCTCTAA GGAGATTCAT
 GCGATCTAGT
 TICV USA_O TATGCTCAAT CTAGAACGTC AGGTCACCCA AACGCTCTAA GGAGGTTTCAT
 GCGATCTAGT
 Clustal Co *****

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 545 555 565 575 585 595

TICVInd CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG AGTCGTGGCC
 TICV Spanyol CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG
 AGTCGTGGCC
 TICV Yunan CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG
 AGTCGTGGCC
 TICV USA_C CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG
 AGTCGTGGCC
 TICV Peran CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG
 AGTCGTGGCC
 TICV USA_O CTGGAAACAG TTAACAACACTACAAGATGTT GGGCTGATAT ATTCTAATGG
 AGTCGTGGCC
 Clustal Co *****

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 605 615 625 635 645 655

TICV Ind GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 TICV Spanyol GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 TICV Yunan GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 TICV USA_C GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 TICV Peran GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 TICV USA_O GCGAAACATG GGGTTGTGAA AGAATTCAGA AACAGCTATG CAGACTTTGA
 CACTGGTCAT
 Clustal Co *****

...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...| ...|...|
 665 675 685 695 705 715

TICVInd CTAGACAGAATGTCTAACGACGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG TCATGCATTG
 TICV Spanyol CTAGACAGAA TGTCTAACGA CGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG
 TCATGCATTG
 TICV Yunan CTAGACAGAA TGTCTAACGA CGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG
 TCATGCATTG
 TICV USA_C CTAGACAGAA TGTCTAACGA CGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG
 TCATGCATTG
 TICV Peran CTAGACAGAA TGTCTAACGA CGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG
 TCATGCATTG
 TICV USA_O CTAGACAGAA TGTCTAACGA CGATCTGGCT GCGTTGATGT TAGCTAAATG
 TCATGCATTG
 Clustal Co *****


```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
      725    735    745    755    765    775
TICV Ind  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC TGATATGAAA
TICV Spanyol  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC
TGATATGAAA
TICV Yunan  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC
TGATATGAAA
TICV USA_C  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC
TGATATGAAA
TICV Peran  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC
TGATATGAAA
TICV USA_O  AAGAAATCCG AAGGTAATAG TAGAACTATA TACAATACGG TGCAATTGGC
TGATATGAAA
Clustal Co  *****

```

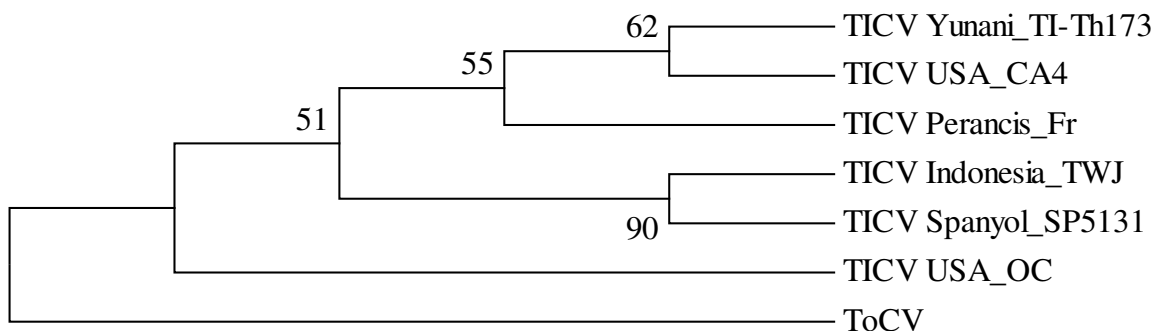


```

      ....|....| ..
      785
TICV Ind  CACCCATGCT AA
TICV Spanyol  CACCCATGCT AA
TICV Yunan  CACCCATGCT AA
TICV USA_C  CACCCATGCT AA
TICV Peran  CACCCATGCT AA
TICV USA_O  CACCCATGCT AA
Clustal Co  ***** **

```

Gambar 3. Runutan basa nukleotida gen protein selubung isolat TICV Indonesia_TWJ (Cipanas, Jawa Barat) dengan isolat TICV dari negara lain, huruf yang berwarna merah menunjukkan runutan nukleotida yang berbeda



Gambar 4. Pohon filogenetika isolat-isolat TICV berdasarkan runutan nukleotida gen protein selubung menggunakan program MEGA v 6.06 dengan pendekatan UPGMA

SIMPULAN

TICV isolat Cipanas berhasil dirunut nukleotidanya dan memiliki homologi sebesar 99,4–100% dibandingkan dengan isolat dari Negara Spanyol, Amerika Serikat Orange County (USA_OC), Yunani, Perancis (Fr), Amerika Utara dan Eropa (USA_CA4). TICV isolat Cipanas berada dalam satu kelompok dengan isolat Spanyol, Amerika Serikat Orange County (USA_OC), Yunani, Perancis (Fr), Amerika Utara dan Eropa (USA_CA4). Dengan demikian TICV isolat Cipanas merupakan spesies yang sama dengan TICV isolat Spanyol, Amerika Serikat Orange County (USA_OC), Yunani, Perancis (Fr), Amerika Utara dan Eropa (USA_CA4).

DAFTAR PUSTAKA

- Andriani A. 2011. Deteksi diferensial *Tomato chlorosis virus* (ToCV) dan *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) dengan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR). *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Barton GJ. 1998. Protein sequence alignment techniques. *Acta Cryst.* D54: 1139–1146.
- Dalmon A, Bouyer S, Cailly M, Girard M, Lecoq H, Desbiez C, & Jacquemond M. 2005. First report of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Tomato crops in France. *Plant Dis.* 89(11): 1243.
- Duffus JE, Liu HY, & Wisler GC. 1996. *Tomato infectious chlorosis virus*-a new clostero-like virus transmitted by *Trialeurodes vaporariorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 102(3): 219–226.
- Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, & Ball LA. 2005. *Virus Taxonomy Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virology Division International Union of Microbiological Societies. San Diego.
- Fitriasari ED. 2010. Keefektifan kutukebul dalam menularkan virus penyebab penyakit kuning pada tanaman tomat. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Hall TA. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hartono S, Natsuaki T, Sayama H, Atarashi Y, & Okuda S. 2003. Yellowing disease of tomatoes caused by *Tomato infectious chlorosis virus* newly recognized in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* 69: 61–64.
- Hartono S & Wijonarko A. 2007. Biomolecular characterization of *Tomato infectious chlorosis virus* caused yellowing disease on tomato plants in Indonesia. *J. Akta Agros Spec.* 2: 139–146.
- Hu ZZ, Feng ZK, Zhang ZJ, Liu YB, & Tao XR. 2011. Complete genome sequence of a tomato spotted wilt virus isolate from China and comparison to other TSWV isolates of different geographic origin. *Arch. Virol.* 156(10): 1905–1908.
- Jacquemond M, Verdin E, Dalmon A, Guilbaud L, & Gognalons P. 2009. Serological and molecular detection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in tomato. *Plant Pathol.* 58(2): 210–220.
- Köklü G, Rojas A, & Kvarnheden A. 2006. Molecular identification and the complete nucleotide sequence of a *Tomato yellow leaf curl virus* isolate from Turkey. *J. Plant Pathol.* 88(1): 61–66.
- Li RH, Wisler GC, Liu HY, & Duffus JE. 1998. Comparison of diagnostic techniques for detecting *Tomato infectious chlorosis virus*. *Plant Dis.* 82: 84–88.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2014. *Basic Local Alignment Search Tool*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Diakses 15 Juli 2014.
- Nurulita S & Suastika G. 2013. Identifikasi *Tomato infectious chlorosis virus* dan *Tomato chlorosis virus* melalui reverse transcription polymerase chain reaction dan analisis sikuen nukleotida. *J. Fitopatol. Indones.* 9(4): 107–115. doi: 10.14692/jfi.9.4.107.

- Orfanidou CG, Dimitriou C, Papayiannis LC, Maliogka VI, & Katis NI. 2014. Epidemiology and genetic diversity of criniviruses associated with tomato yellows disease in Greece. *Virus Res.* 186: 120–129.
- Orlío AF & Navas-Castillo J. 2009. The complete nucleotide sequence of the RNA2 of the *Crinivirus Tomato infectious chlorosis virus*: isolates from North America and Europe are essentially identical. *Arch. Virol.* 154(4): 683–687.
- Qiagen. 2001. *RNeasy Mini Handbook. Ed-3.* Qiagen Inc, Valencia.
- Reddy RVC, Colvin J, Muniyappa V, & Seal S. 2005. Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Arch. Virol.* 150(5): 845–867.
- Sa'adah L. 2013. Uji serologi diferensial dan simultan *Tomato chlorosis virus* (ToCV) dan *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV) pada tanaman tomat. *Skripsi.* Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Segev L, Wintermantel WM, Polston JE, & Lapidot M. 2004. First Report *Tomato chlorosis virus* in Israel. *Plant Dis.* 88(10): 1160.
- Suastika G, Hartono S, Nishigawa H, & Natsuaki T. 2010. Yellowing disease outbreaks in tomato in Indonesia associated with infection of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus*[abstract]. *ISSAAS International Congress 2010: Agricultural Adaptation in Response to Climate Change.* Denpasar (ID). November 14-18, 2010.
- Tsai WS, Shih SL, Green SK, & Hanson P. 2004. First report of the occurrence of Tomato infectious chlorosis virus in Taiwan. *Plant Dis.* 88: 311.
- Wintermantel WM. 2004. Emergence of green house whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. APS Net [jurnal *on-line*]. <http://www.apsnet.org/online/feature/whitefly/whitefly.pdf>. Diakses 24 Maret 2009.
- Wintermantel WM, Hladky LL, Gulati-Sakhuja A, Li R, Liu HY, & Tzanetakis IE. 2009. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato infectious chlorosis virus*: a distinct crinivirus most closely related to *lettuce infectious yellow virus*. *Arch. Virol.* 154(8): 1335–1342.
- Wintermantel WM & Wisler GC. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of Tomato chlorosis virus. *Plant Dis.* 90(6): 814–819.
- Wisler GC, Duffus JE, Liu HY, & Li RH. 1998a. Ecology and epidemiology of whitefly-transmitted closteroviruses. *Plant Dis.* 82(3): 270–280.
- Wisler GC, Li RH, Liu HY, Lowry DS, & Duffus JE. 1998b. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem-limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathology* 88(5): 402–409.
- Xue C, Zhou X, Liu Y, & Li D. 1998. Cloning, sequence, analysis, and expression in *E. coli* of coat proteingene and 3' non-coding region of *Tomato mosaic virus*. *Zhongguo Bing Du Xue* 13: 150–155.