

IDENTIFIKASI MOLEKULER *BEAN COMMON MOSAIC VIRUS* YANG BERASOSIASI DENGAN PENYAKIT MOSAIK KUNING KACANG PANJANG

Melinda¹, Tri Asmira Damayanti², & Sri Hendrastuti Hidayat²

¹Fakultas Pertanian, Universitas Negeri Papua, Manokwari
Jl. Gunung Salju, Amban Manokwari, Papua Barat

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
E-mail: triasmiradamayanti@gmail.com

ABSTRACT

Molecular identification of bean common mosaic virus associated with yellow mosaic disease on yard long bean. *Bean common mosaic virus* (BCMV) has been reported as one of the causal agents of yellow mosaic disease on yard long bean in West Java and Central Java. Infected plants showed mosaic, yellowing, and mixture of yellow mosaic. The research was conducted to identify the diversity of BCMV associated with yellow mosaic disease based on coat protein (CP) gene sequences. Symptomatic leaf samples were collected from yard long bean growing areas in several districts in West Java (Bogor, Cirebon, Subang, and Indramayu), and several districts in Central Java (Tegal, Klaten, Solo, Yogyakarta, Sleman, and Magelang). Molecular detection using RT-PCR method was carried out by using specific primer to BCMV which will amplify the CP gene. DNA fragment, \pm 860 bp in size, was successfully amplified from 8 out of 13 leaf samples, i.e samples from three villages in Bogor District (Cangkurawok, Bubulak, Bojong), and five samples from District of Cirebon, Subang, Solo, Sleman, and Tegal. Sequence analysis of those DNA fragment showed that 4 isolates (Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo and Sleman) had the highest homology to BCMV-BIC from Taiwan, whereas 2 isolates (Cirebon and Tegal) had the highest homology to BCMV-NL1 from England. Further, phylogenetic analysis revealed that those of 4 isolates were closely related to BCMV-BIC from Taiwan based on nucleotide as well as amino acid sequences; while those other 2 isolates were closely related to BCMV-NL1 from England based on nucleotide sequences but closely related to BCMV-BIC Y from China based on amino acid sequences. Phylogenetic analysis showed that those of 6 BCMV isolates separated in two different clusters; 4 isolates (Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo, and Sleman) in cluster 1 together with BCMV-BIC from Taiwan, while other 2 isolates (Cirebon and Tegal) in cluster 2 together with BCMV-NL1.

Key words: *bean common mosaic virus*, coat protein, diversity, yard long bean

ABSTRAK

Identifikasi molekuler bean common mosaic virus yang berasosiasi dengan penyakit mosaik kuning kacang panjang. *Bean common mosaic virus* (BCMV) telah dilaporkan sebagai salah satu penyebab penyakit mosaik kuning di pertanaman kacang panjang di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Tanaman terinfeksi menunjukkan gejala mosaik, menguning, dan campuran mosaik kuning. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi keragaman BCMV yang berasosiasi dengan penyakit mosaik kuning berdasarkan urutan gen protein selubung (CP). Sampel yang bergejala dikumpulkan dari pertanaman kacang panjang di beberapa kabupaten di Jawa Barat (Bogor, Cirebon, Subang, dan Indramayu), dan beberapa kabupaten di Jawa Tengah (Tegal, Klaten, Solo, Yogyakarta, Sleman, dan Magelang). Deteksi molekuler menggunakan metode RT-PCR, dilakukan dengan menggunakan primer spesifik BCMV yang menyandi gen CP. Fragmen DNA berukuran \pm 860 pb berhasil diamplifikasi 8 dari 13 sampel daun, yaitu sampel dari 3 desa di Kabupaten Bogor (Cangkurawok, Bubulak, Bojong) dan 5 sampel dari Kabupaten Cirebon, Subang, Solo, Sleman, dan Tegal. Analisis urutan fragmen DNA menunjukkan bahwa 4 isolat (Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman) memiliki homologi tertinggi dengan BCMV-BIC dari Taiwan, sedangkan 2 isolat (Cirebon dan Tegal) memiliki homologi tertinggi dengan BCMV-NL1 dari Inggris. Analisis filogenetika lebih lanjut menunjukkan bahwa 4 isolat (Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo, dan Sleman) memiliki kekerabatan yang dekat dengan BCMV-BIC dari Taiwan berdasarkan urutan nukleotida serta urutan asam amino, sedangkan 2 isolat (Cirebon dan Tegal), memiliki kekerabatan yang dekat dengan BCMV-NL1 dari Inggris berdasarkan urutan nukleotida dan memiliki kekerabatan yang dekat dengan BCMV-BIC Y dari Cina berdasarkan urutan asam amino. Analisis filogenetika menunjukkan 6 isolat BCMV terpisah menjadi 2 kluster; 4 isolat (Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo, dan Sleman) pada kluster 1 bersama BCMV-BIC dari Taiwan dan 2 isolat (Cirebon dan Tegal) pada kluster 2 bersama BCMV-NL1.

Kata kunci: *bean common mosaic virus*, kacang panjang, keragaman, protein selubung

PENDAHULUAN

Tanaman kacang panjang (*Vigna sinensis* ssp. *sesquipedalis*) merupakan tanaman hortikultura yang memiliki peluang sebagai komoditas strategis untuk pangan masa depan serta sebagai alternatif sumber pertumbuhan ekonomi (Pitojo, 2006). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2011), produksi kacang panjang di Indonesia pada tahun 2010 mencapai 489.449 ton dan pada tahun 2011 menurun menjadi 458.307 ton. Salah satu faktor pembatas produksi kacang panjang adalah gangguan hama dan penyakit tanaman. Hama yang umum ditemukan pada pertanaman kacang panjang adalah kutu daun *Aphis craccivora* Koch, penggerek polong (*Maruca testulalis* Geyer), kutu kebul (*Bemisia tabaci* Genn), ulat jengkal (*Plusia chalcites* Esper), lalat kacang (*Agromyza phaseoli* Cog), tungau merah (*Tetranychus cinnabarinus* Boisid.) dan kepik polong (*Riptortus linearis* F.). Sedangkan penyakit yang sering ditemui diantaranya adalah layu (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*), antraknosa (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc et Magn), mosaik yang disebabkan oleh *Bean common mosaic virus* (BCMV), *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) dan *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), daun kecil kacang panjang (*Cowpea witches-broom virus*) dan puru akar (*Meloidogyne* sp.) (Anwar et al., 2005; Haryanto et al., 2010; Lazuardi, 2005; Siregar, 1996).

Pada tahun 2008–2009, Damayanti et al. (2009) melaporkan insidensi penyakit mosaik kuning kacang panjang yang meluas di beberapa daerah pantai utara Jawa Barat. Tanaman yang terinfeksi menunjukkan gejala mosaik kuning, penghambatan pertumbuhan dan malformasi daun. Infeksi pada tanaman yang masih muda menyebabkan tidak terbentuknya polong dan jika infeksi sangat parah dapat mengakibatkan kematian. Salah satu virus yang terdeteksi pada tanaman kacang panjang dengan gejala mosaik kuning dari daerah Bubulak, Dramaga Bogor dan Sidorejo, Karanganyar Pekalongan adalah BCMV strain *Blackeye* (BCMV-BIC).

BCMV umumnya menginfeksi tanaman kacang-kacangan seperti pada spesies *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata*, dan *V. radiata*. Tanaman yang terinfeksi menunjukkan gejala utama mosaik dan nekrosis, tulang daun berwarna hijau tua sedangkan daerah interveinal menjadi hijau muda. Adanya perubahan warna daun biasanya diikuti dengan malformasi daun berupa kerutan dan menggulung. Gejala pada tanaman umumnya muncul 7 sampai 10 hari setelah inokulasi. Tipe gejala yang ditimbulkan ditentukan oleh strain virus, suhu lingkungan pertanaman dan

genotipe inang. Terdapat 10 strain BCMV yang telah diketahui yaitu *Blackeye*, US1, US5, NL2, NL3, NL4, NL5, NL6, NL7 dan NL8 (Morales, 1988). Sebelumnya dilaporkan infeksi BCMV dan BCMNV (*Bean common mosaic necrosis virus*) menyebabkan gejala yang mosaik yang berbeda dari gejala khas pada tanaman *Phaseolus lunatus* (*lima bean*) di Peru (Melgarejo et al., 2007). Selain itu beberapa isolat BCMV-BIC juga dilaporkan menginfeksi vanili di India (Bhadramurthy & Bhat, 2009) dan menjadi masalah serius yang mengancam produksi kedelai di Cina (Zhou et al., 2014).

Mengingat sedikitnya informasi mengenai strain BCMV atau keragaman BCMV yang menginfeksi tanaman kacang panjang di Indonesia, maka perlu dilakukan identifikasi secara molekuler terhadap BCMV yang menyebabkan penyakit mosaik kuning pada tanaman kacang panjang. Insidensi penyakit mosaik kuning di lapangan dilaporkan masih cukup tinggi terutama di Jawa Barat dan Jawa Tengah. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman BCMV dari tanaman kacang panjang yang berasal dari beberapa daerah di Jawa Barat dan Jawa Tengah.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor mulai bulan Juni sampai dengan Desember 2012.

Pengamatan Gejala di Lapangan serta Pengambilan Sampel Tanaman. Pengamatan gejala dan pengambilan sampel dilakukan di pertanaman kacang panjang di daerah Dramaga, Kabupaten Bogor Propinsi Jawa Barat yaitu di daerah Cangkurawok, Bubulak, Situgede dan Bojong. Sebanyak 20 sampel daun yang menunjukkan gejala mosaik kuning diambil dari masing-masing lokasi. Sampel daun dengan gejala kuning juga diperoleh dari koleksi Laboratorium Virologi Tumbuhan IPB yaitu sampel yang berasal dari beberapa Kabupaten di Jawa Barat (Bogor, Cirebon, Subang, dan Indramayu) dan beberapa kabupaten di Jawa Tengah (Tegal, Solo, Yogyakarta, Sleman, Klaten, dan Magelang).

Deteksi BCMV dengan Teknik Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ekstraksi RNA Total. RNA total diekstraksi dari jaringan daun tanaman bergejala sebanyak 0,1 g menggunakan NucleoSpin RNA Plant (Macherey-Nagel Inc., USA) atau *Xprep Plant RNA Mini Kit*

(Philakorea Technology) dilakukan sesuai protokol yang dianjurkan pembuatnya.

Sintesis cDNA. RNA total hasil ekstraksi selanjutnya digunakan untuk proses transkripsi balik (*reverse transcription-RT*) menjadi cDNA (*complementary DNA*) dengan menggunakan enzim *Reverse Transcriptase*. Reaksi transkripsi balik terdiri dari: 4 µl RNA total, 4 µl 5x bufer RT, 2 µl DTT (dithiothreitol) 50 mM, 2 µl dNTP 10 mM, 1 µl M-MuLV (200 U/µl), 1 µl *RNase inhibitor* (40 U/µl), 2 µl oligo d(T)₁₈ 10 µM dan air bebas nuklease sampai volume total 20 µl. Reaksi RT dilakukan dalam mesin *Automated Thermal Cycler* (Gene Amp PCR System 9700; PE Applied Biosystem, USA) 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 ini digunakan sebagai DNA cetakan dalam reaksi amplifikasi.

Amplifikasi DNA dengan PCR. Amplifikasi DNA virus dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan pasangan primer spesifik gen *coat protein* BCMV yaitu primer *forward* BCMV-F dan primer *reverse* BCMV-R (Anggraini & Hidayat, 2014) dengan hasil amplifikasi berukuran ± 860 pb (pasang basa). Reaksi PCR terdiri dari: 1 µl cDNA, 12,5 µl premix *Go Taq Green* (Promega Jepang), masing-masing 1 µl primer BCMV-F dan BCMV-R (10 µM/µl), dan air bebas nuklease sampai volume total 25 µl. Amplifikasi dilakukan pada *Automated Thermal Cycler* (Gene Amp PCR System 9700; PE Applied Biosystem, USA). Amplifikasi didahului dengan denaturasi awal pada suhu 94 °C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada suhu 94 °C selama 1 menit, penempelan primer pada suhu 68 °C selama 1 menit dan ekstensi pada suhu 72 °C selama 1 menit. Siklus terakhir ditambahkan 7 menit pada suhu 72 °C untuk tahapan sintesis dan siklus berakhir pada suhu 4 °C.

Visualisasi DNA. Gel agarosa konsentrasi 1% dibuat dari 0,3 g agarosa yang dilarutkan dalam bufer TBE 0,5x sebanyak 30 ml dengan bantuan *microwave*. Sebelum digunakan, larutan gel agarosa didinginkan hingga suhu 50 °C selama kurang lebih 15 menit lalu ditambahkan 3 µl *ethidium bromide* (0,5 µg/10 ml). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 V selama 20 menit. Hasil elektroforesis selanjutnya divisualisasi dibawah *transilluminator ultraviolet* dan didokumentasi dengan kamera digital.

Perunutan dan penyejajaran DNA. Fragmen DNA hasil amplifikasi PCR dikirim ke *First Base Genetica Science* (Singapura) untuk proses perunutan nukleotida. Hasil perunutan nukleotida digunakan untuk melihat tingkat kesamaan dengan runutan nukleotida yang terdapat di GenBank menggunakan program *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) dan identitas matriks homologi menggunakan perangkat lunak BioEdit (Hall, 1999), serta MEGA 5.05. untuk konstruksi pohon filogenetika.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Mosaik Kuning pada Tanaman Kacang Panjang di Lapangan. Sampel-sampel tanaman kacang panjang sakit yang diambil dari lapangan menunjukkan gejala mosaik kuning. Gejala mosaik kuning di lapangan dapat dibedakan menjadi dua kelompok berdasarkan warna dan perubahan bentuk pada daun. Kelompok pertama menunjukkan gejala mosaik kuning dengan pola mosaik berwarna hijau muda sampai tua kekuningan dengan warna terang, terjadi penebalan tulang daun (*vein banding*), malformasi daun (daun menggulung seperti krupuk, mengerut sepanjang tulang daun), dan terdapat lepuhan. Bila gejala berlanjut tanaman menjadi kerdil dan terhambat pertumbuhannya. Kelompok kedua menunjukkan gejala dengan pola mosaik berwarna hijau muda sampai tua dengan batas kuning yang kurang tegas, terjadi penebalan tulang daun (*vein banding*), dan malformasi daun (Tabel 1).

Gejala yang ditunjukkan tanaman sampel pada kelompok pertama mengindikasikan tanaman terinfeksi *Bean common mosaic virus* (BCMV). Tanaman yang terinfeksi BCMV menunjukkan gejala utama mosaik dan nekrosis, tulang daun berwarna hijau tua sedangkan daerah interveinal menjadi hijau muda diikuti dengan perubahan warna daun dan malformasi daun berupa kerutan dan menggulung (CABI, 2007). Menurut Agrios (2005) gejala awal daun yang terinfeksi BCMV adalah daun menjadi bergelombang kemudian warna daun menjadi berubah dan tidak merata, seiring dengan berjalannya waktu daun melengkung ke bawah dan ke atas. Daun selanjutnya terlihat mengerut dan terjadi mosaik, malformasi daun dan penebalan di sekitar pertulangan daun berwarna hijau tua.

Berdasarkan deskripsi yang diuraikan di atas, ada indikasi bahwa gejala mosaik kuning pada kacang panjang dapat disebabkan oleh infeksi beberapa jenis virus. Kepastian adanya infeksi BCMV dapat ditentukan berdasarkan metode deteksi secara molekuler.

Deteksi Virus dengan Metode RT-PCR dan Perunutan Basa Nukleotida. Pita DNA berukuran ± 860 pb berhasil teramplifikasi dari sampel asal Kabupaten Bogor (Desa Cangkurawok, Bubulak, Bojong), Cirebon, Subang, Solo, Sleman, dan Tegal. BCMV tidak teramplifikasi dari sampel asal Bogor-Situgede, Indramayu, Yogyakarta, Klaten dan Magelang (Gambar 1). Hasil deteksi ini menunjukkan bahwa pengamatan gejala penyakit saja tidak cukup untuk mendeteksi dan mengidentifikasi virus pada tanaman sehingga diperlukan diagnosis secara molekuler. Damayanti *et al.* (2009) berhasil mendeteksi BCMV dan *Cucumber mosaic virus* (CMV) dari tanaman kacang panjang yang menunjukkan gejala mosaik kuning. Oleh karena itu gejala mosaik yang tampak pada sampel-

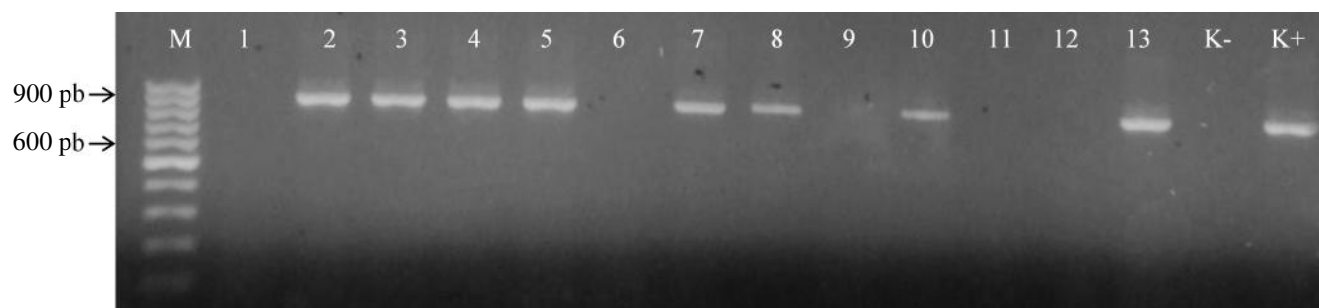
sampel daun pada penelitian ini, kemungkinan juga disebabkan oleh infeksi virus selain BCMV. Nurulita (2014) melaporkan PCR DNA menggunakan primer universal Begomovirus dari gejala mosaik kuning kacang panjang positif *Begomovirus*.

Pita DNA hasil amplifikasi digunakan untuk perunutan basa nukleotida dan diperoleh hasil perunutan berkisar 779 sampai 861 pb (Tabel 2). Setelah dilakukan analisis homologi terhadap sekuen yang ada di *Genbank* menggunakan program BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) diketahui bahwa isolat-isolat Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman memiliki 99% sampai 100% homologi dengan BCMV-BIC asal Taiwan (AY575773.1), sedangkan isolat-isolat Cirebon dan Tegal memiliki 90% homologi dengan

Tabel 1. Tipe gejala dan hasil deteksi BCMV menggunakan metode RT-PCR

Asal sampel	Tipe gejala ^{*)}	Hasil PCR
Bogor-Cangkurawok	Mkb, Md, Vb, K	+
-Bubulak	Mks, Vb	+
-Situgede	Mks, Vb	-
-Bojong	Mks, Vb	+
Cirebon	Mkb, Md, Vb	+
Subang	Mkb, Md, Vb, K	+
Indramayu	Mks, Vb	-
Klaten	Mks, Vb	-
Solo	Mkb, Md, Vb, K	+
Yogyakarta	Mks, Vb	-
Sleman	Mks, Md, Vb	+
Tegal	Mkb, Md, Vb	+
Magelang	Mkr, Vb	-

*Mkr = Mosaik kuning ringan; Mks = Mosaik kuning sedang; Mkb = Mosaik kuning berat; Md = Malformasi daun; Vb = *Vein banding*; K = Kerdil; + = BCMV; - = bukan BCMV.



Gambar 1. Pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik gen CP BCMV (BCMVF/BCMVR) pada gel agarosa 1%. M = Penanda DNA 100 pb, DNA sampel asal; 1. Situgede, 2. Cangkurawok, 3. Bubulak, Bojong, 5. Subang, 6. Indramayu, 7. Cirebon, 8. Tegal, 9. Klaten, 10. Solo, 11. Magelang, 12. Yogyakarta, 13. Sleman; K- = Kontrol negatif (air), K+ = Kontrol positif (isolat BCMV)

BCMV-NL1 asal Inggris (AY112735) (Tabel 2). Hasil diagnosis sesuai dengan penelitian Damayanti *et al.* (2009) yang melaporkan bahwa salah satu virus yang terdeteksi pada tanaman kacang panjang dengan gejala mosaik kuning adalah BCMV strain *Blackeye* (BCMV-BIC).

Analisis Basa Nukleotida dan Asam Amino Gen Protein Selubung BCMV. Hasil peruntutan basa nukleotida gen protein selubung BCMV diperoleh ukuran

yang berbeda (Tabel 2) sehingga untuk analisis runutan basa nukleotida digunakan ukuran yang sama yaitu 777 nukleotida yang mengkode 259 asam amino. Analisis runutan basa nukleotida gen protein selubung tersebut menunjukkan tingkat homologi yang tinggi antara keenam isolat BCMV asal Jawa Barat dan Jawa Tengah, yaitu berkisar antara 89,1–100%. Isolat Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo, dan Sleman memiliki tingkat homologi yang sangat dekat satu dengan lainnya (99,8–100%) tetapi tingkat homologinya lebih rendah dibandingkan dengan

Tabel 2. Hasil BLAST runutan nukleotida isolat BCMV dan persentase homologinya dengan isolat BCMV dari *GenBank*

Isolat	Panjang nukleotida (pb)	Homologi			
		%	Strain BCMV	Asal strain (Tanaman/Negara)	No. aksesori
Bogor-Crwk*	861	100	BCMV-BIC**	Kacang panjang/Taiwan	AY575773.1
Cirebon	861	90	BCMV-NL1	Buncis/Inggris	AY112735
Subang	861	100	BCMV-BIC	Kacang panjang/Taiwan	AY575773.1
Solo	779	99	BCMV-BIC	Kacang panjang/Taiwan	AY575773.1
Sleman	861	100	BCMV-BIC	Kacang panjang/Taiwan	AY575773.1
Tegal	861	90	BCMV-NL1	Buncis/Inggris	AY112735

*Crwk =Bogor-cangkurawok, **BCMV-BIC = *Bean common mosaic virus strain Blackeye Cowpea*

Tabel 3. Homologi nukleotida dengan BCMV dari negara lain

No	Homologi (%) [*]													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	99,8	99,8	89,3	89,1	99,8	99,8	99,3	90,8	96,3	92,0	89,5	59,3	69,1
2		-	100	89,3	89,3	100	100	99,4	90,9	96,5	92,1	89,7	59,3	69,1
3			-	89,3	89,3	100	100	99,4	90,9	96,5	92,1	89,7	59,3	69,1
4				-	96,6	89,3	89,3	88,8	88,1	89,0	89,8	87,9	57,7	67,9
5					-	89,3	89,3	88,8	88,4	89,1	90,0	88,8	57,9	68,0
6						-	100	99,4	90,9	96,5	92,1	89,7	59,3	69,1
7							-	99,4	90,9	96,5	92,1	89,7	59,3	69,1
8								-	90,7	96,0	91,8	89,4	59,6	69,1
9									-	90,2	96,1	88,2	57,5	68,7
10										-	91,3	89,1	58,7	67,8
11											-	90,2	59	68,7
12												-	58,8	69,3
13													-	58,8
14														-

*Tingkat homologi nukleotida dihitung menggunakan program Bioedit versi 7.0.0. Angka dengan cetak tebal hitam menunjukkan homologi antar sesama isolat asal Jawa Barat dan Jawa Tengah dengan isolat dari *Genbank*. 1) BCMV Solo; 2) BCMV Bogor-Cangkurawok; 3) BCMV Subang; 4) BCMV Cirebon; 5) BCMV Tegal; 6) BCMV Sleman; 7) BCMV-BIC-TAIWAN (AY575773.1); 8) BCMV-BIC-PSU1 (FR775796.1); 9) BCMV-BIC-NY15 (S66252.1); 10) BCMV-BIC-Y (AJ312438.1); 11) BCMV-NL1 (AY112735); 12) BCMV-PSt-T13 (HM776126.1); 13) BYMV-HP (KC011006); dan 14) CabMV-DF-Brs (DQ397532.1).

isolat Cirebon dan Tegal (89,1–89,3%). Dua isolat BCMV asal Cirebon dan Tegal memiliki tingkat homologi yang sangat dekat satu dengan lainnya (96,6%) tetapi tidak terlalu dekat dengan keempat isolat lainnya (Tabel 3).

Analisis homologi dengan melibatkan beberapa isolat lain dari *Genbank* menunjukkan bahwa 4 isolat BCMV (isolat-isolat Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman) memiliki hubungan homologi yang dekat dengan BCMV-BIC dari Taiwan (AY575773.1) dan BCMV-BIC PSU1 dari Thailand (FR775796.1) dengan tingkat homologi berkisar 99,3–100%. Dua isolat BCMV asal Cirebon dan Tegal lebih dekat hubungan kekerabatannya dengan BCMV-NL1 (AY112735) dari Inggris dengan tingkat homologi 89,8–90,0% dibandingkan hubungannya dengan BCMV-BIC asal Taiwan ataupun BCMV-BIC PSU1 asal Thailand. Perbedaan tingkat homologi tersebut memberikan indikasi adanya keragaman diantara isolat-isolat BCMV dari daerah Jawa Barat dan Jawa Tengah.

Analisis runutan asam amino gen protein selubung menunjukkan tingkat homologi yang tinggi antara keenam isolat BCMV asal Jawa Barat dan Jawa Tengah, yaitu berkisar antara 93,0–100%. Isolat Bogor-Cangkurawok,

Subang, Solo, dan Sleman memiliki tingkat homologi yang sangat dekat satu dengan lainnya (99,6–100%) tetapi tingkat homologinya tidak terlalu dekat dengan isolat Cirebon dan Tegal (93,0–93,4%). Dua isolat BCMV asal Cirebon dan Tegal memiliki tingkat kekerabatan yang sangat dekat satu dengan lainnya (98,8%) tetapi tidak terlalu dekat dengan keempat isolat lainnya (Tabel 4).

Analisis kekerabatan dengan melibatkan beberapa isolat lain dari *Genbank* menunjukkan bahwa 4 isolat BCMV dari Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan BCMV-BIC dari Taiwan (AY575773.1) dengan tingkat kesamaan berkisar 99,6–100%. Dua isolat BCMV asal Cirebon dan Tegal lebih dekat hubungan kekerabatannya dengan BCMV-BIC Y asal Cina (AJ312438.1) dengan tingkat kesamaan 93,8% dibandingkan hubungannya dengan BCMV-BIC asal Taiwan.

Menurut Adams *et al.* (2005), sekuen demarkasi gen protein selubung dalam *Potyvirus* disebut spesies yang sama jika homologi nukleotidanya berkisar 76–77% dan homologi runutan asam aminonya 82%. Homologi nukleotida dan asam amino 6 isolat BCMV yang diisolasi

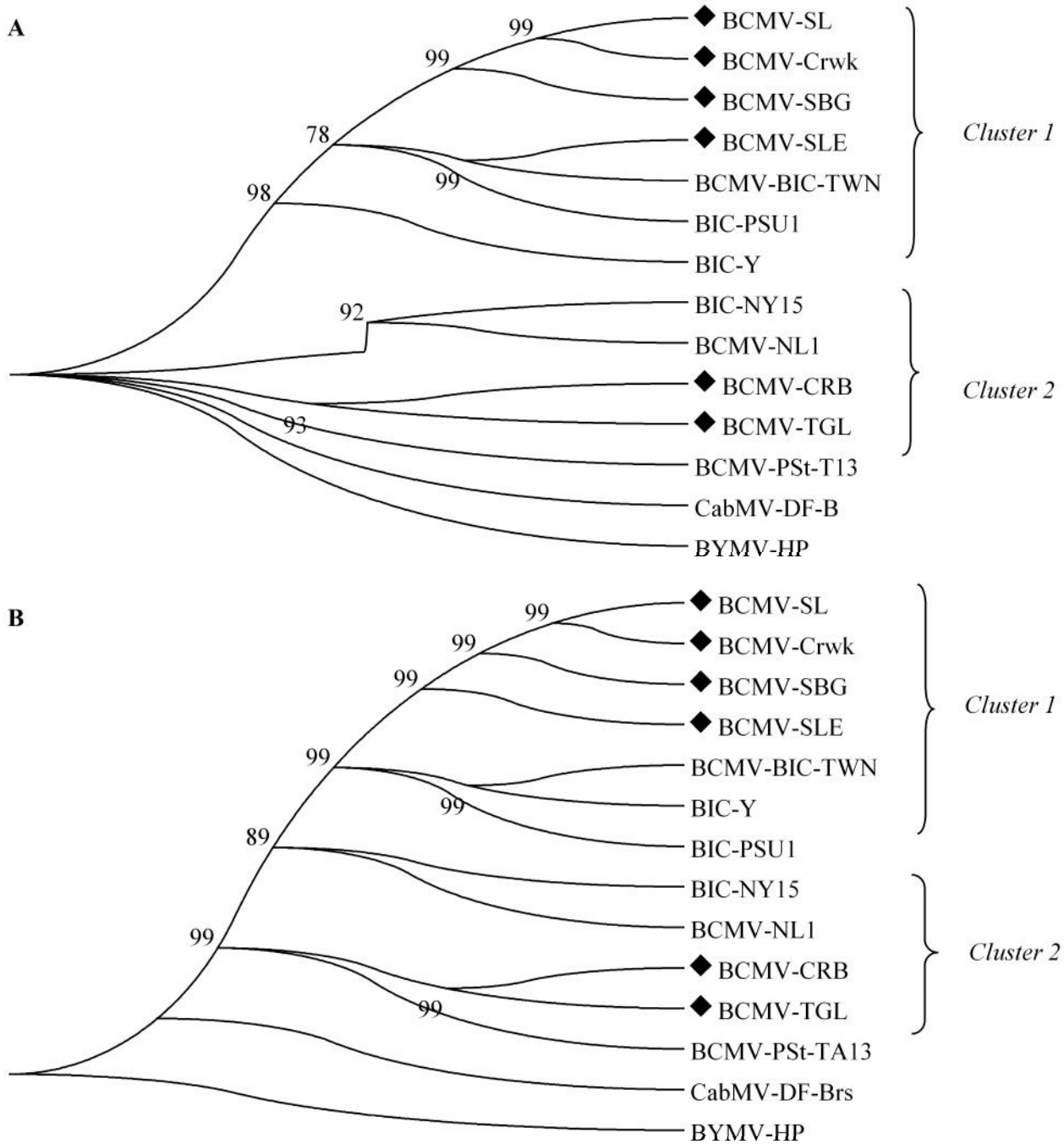
Tabel 4. Homologi asam amino dengan BCMV asal negara lain

NO.	Homologi (%)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	-	99,6	99,6	93,0	93,0	99,6	99,6	99,2	92,2	99,2	93,0	92,2	57,3	66,4
2		-	100	93,4	93,4	100	100	99,6	92,6	99,6	93,4	92,6	57,3	66,4
3			-	93,4	93,4	100	100	99,6	92,6	99,6	93,4	92,6	57,3	66,4
4				-	98,8	93,4	93,4	93,0	90,7	93,8	91,8	93,0	57,3	67,5
5					-	93,4	93,4	93,0	91,1	93,8	92,2	93,0	57,3	67,5
6						-	100	99,6	92,6	99,6	93,4	92,6	57,3	66,4
7							-	99,6	92,6	99,6	93,4	92,6	57,3	66,4
8								-	93,0	99,2	93,8	93,0	57,3	66,7
9									-	93,0	94,9	90,7	57,3	66,7
10										-	93,8	93,0	57,3	66,4
11											-	92,6	58,4	66,7
12												-	58	68,3
13													-	54,9
14														-

^{a)}Tingkat homologi nukleotida dihitung menggunakan program BioEdit versi 7.0.0. Angka dengan cetak tebal hitam menunjukkan homologi antar sesama isolat asal Jawa Barat dan Jawa Tengah dengan isolat dari *Genbank*. 1) BCMV Solo; 2) BCMV Cangkurawok; 3) BCMV Subang; 4) BCMV Cirebon; 5) BCMV Tegal; 6) BCMV Sleman; 7) BCMV-BIC-TAIWAN (AY575773.1); 8) BCMV-BIC-PSU1 (FR775796.1); 9) BCMV-BIC-NY15 (S66252.1); 10) BCMV-BIC-Y (AJ312438.1); 11) BCMV-NL1 (AY112735); 12) BCMV-PSI-T13 (HM776126.1); 13) BYMV-HP (KC011006); dan 14) CabMV-DF-Brs (DQ397532.1).

dari kacang panjang dengan isolat-isolat BCMV di *Genbank* berturut-turut berkisar 89,3–100% dan 93,0–100%. Hal ini menunjukkan keenam isolat tersebut terbukti merupakan BCMV.

Filogenetika Berdasarkan Runutan Basa Nukleotida dan Asam Amino Gen Protein Selubung BCMV. Analisis filogenetika berdasarkan runutan basa nukleotida gen protein selubung BCMV 6



Gambar 2. Pohon filogenetika berdasarkan sekuen nukleotida (A) dan sekuen asam amino (B) BCMV. BYMV-HP dan CABMV-DF-Brs digunakan sebagai *out group*. Isolat BCMV: BGR-Crwk. Bogor-Cangkurawok, CRB. Cirebon, SBG. Subang, TGL. Tegal, SLE. Sleman, SL. Solo. Pohon filogenetika dibuat dengan *Software* MEGA v5.05 menggunakan 1000 kali *bootstrap*

isolat asal Jawa Barat dan Jawa Tengah terhadap isolat dari negara lain menunjukkan terbentuknya 2 kelompok/*cluster*. Keenam isolat tersebut terbagi kedalam *cluster* yang berbeda. *Cluster* pertama terdiri dari isolat-isolat Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman, berada dalam satu *cluster* yang dekat dengan isolat BCMV-BIC Taiwan, BCMV-BIC Y dan BCMV-BIC PSU1. *Cluster* kedua terdiri dari isolat-isolat Cirebon dan Tegal, berada dalam satu *cluster* yang dekat dengan isolat BCMV-BIC NY15, BCMV-NL1 dan BCMV-PSt-TA13 (Gambar 2a). Hal ini menunjukkan adanya keragaman isolat BCMV ditemukan diantara enam isolat. Sebagai pembandingan di luar *cluster* (*outgroup*) digunakan *Bean yellow mosaic virus-HP* (BYMV-HP) dan *Cowpea aphid-borne mosaic virus-DF-Brs* (CabMV-DF-Brs).

Analisis filogenetika berdasarkan sekuen asam amino menunjukkan terbentuknya 2 *cluster* yang sama dengan runutan basa nukleotida. Walaupun membentuk 2 *cluster*, namun kekerabatan antar isolat masih sangat dekat dengan isolat BCMV-BIC dari Taiwan dan BCMV-BIC Y dari Cina (Gambar 2b). Isolat BCMV-BIC asal Taiwan dan BCMV-BIC asal Cina sebelumnya dilaporkan menyebabkan penyakit yang parah dengan gejala daun kuning pada kacang panjang di Taiwan dan Cina (Zheng *et al.*, 2002; Wang & Fang, 2004).

SIMPULAN

Gejala mosaik kuning pada tanaman kacang panjang di lapangan sangat bervariasi. Deteksi molekuler menggunakan primer spesifik CP-BCMV berhasil mengamplifikasi pita DNA dari sampel tanaman asal Jawa Barat (Bogor; Cangkurawok, Bubulak, Bojong), Subang, dan Cirebon dan asal Jawa Tengah (Solo, Sleman, dan Tegal). Gejala mosaik kuning pada tanaman kacang panjang tidak hanya terinfeksi oleh BCMV tetapi kemungkinan disebabkan oleh infeksi virus lain. Isolat BCMV asal Bogor-Cangkurawok, Subang, Solo dan Sleman memiliki homologi dan kekerabatan yang dekat dengan BCMV-BIC dari Taiwan berdasarkan runutan basa nukleotida dan asam amino. Isolat BCMV asal Cirebon dan Tegal memiliki homologi dan kekerabatan yang dekat dengan BCMV-NL1 dari Inggris berdasarkan runutan basa nukleotida, namun berdasarkan runutan asam amino lebih dekat ke BCMV-BIC Y dari Cina.

SANWACANA

Penelitian terlaksana atas dana pendidikan dan penelitian dari NUFFIC AGRI-4 UNIPA untuk penulis utama dan secara parsial dari dana penelitian IPVDN tahun 2012.

DAFTAR PUSTAKA

- Adams MJ, Antoniw JF, & Fauquet CM. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch Virol.* 150(3): 459–479.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. 5th eds. Academic Press. New York.
- Anggraini S & Hidayat SH. 2014. Sensitivitas metode serologi dan *polymerase chain reaction* untuk mendeteksi *Bean Common Mosaic Potyvirus* pada kacang panjang. *J. Fitopatol. Indones.* 10(1): 17-22.
- Anwar A, Sudarsono, & Ilyas S. 2005. Perbenihan sayuran di Indonesia: kondisi terkini dan prospek bisnis benih sayuran. *Bul Agron.* 33(1): 38–47.
- Badan Pusat Statistik. 2011. Produksi Sayuran di Indonesia. [internet]. Jakarta (ID). http://www.bps.go.id/tab_sub/view.php. Diakses 19 November 2012.
- Bhadramurthy V & Bhat AI. 2009. Biological and molecular characterization of *Bean common mosaic virus* associated with vanilla in India. *Indian J. Virol.* 20(2): 70–77.
- [CABI] Centre for Agriculture and Biosciences International. 2007. *Crop Protection Compendium*. (Serial Online). CAB International. Wallingford.
- Damayanti TA, Alabi OJ, Naidu RA, & Rauf A. 2009. Severe outbreak of a yellow mosaic disease on the yard long bean in Bogor, West Java. *Hayati J. Biosci.* 16(2): 78-82.
- Haryanto E, Suhartini T, & Rahayu E. 2010. *Budi Daya Kacang Panjang*. Penebar Swadaya, Jakarta.

- Hall TA. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Lazuardi F. 2005. Perkembangan beberapa penyakit penting pada kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) di lahan petani sekitar kampus IPB Dramaga, Kabupaten Bogor. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Melgarejo TA, Lehtonen MT, Fribourg CE, Rannali M, & Valkonen JPT. 2007. Strains of BCMV and BCMNV characterized from lima bean plants affected by deforming mosaic disease in Peru. *Arch. Virol.* 152(10): 1941–1949.
- Morales FJ. 1988. *Bean common mosaic virus*. www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=337. Diakses 12 Oktober 2012.
- Nurulita S. 2014. Molecular characterization of *Begomovirus* infecting yard long bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis* L.) and construction of its specific primers. *Tesis*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Pitojo S. 2006. *Benih Kacang Panjang*. Kanisius, Yogyakarta.
- Siregar S. 1996. Pengamatan hama dan penyakit penting tanaman kacang panjang (*Vigna sinensis* L.) di Kecamatan Ciampea, Kabupaten Bogor Jawa Barat. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Wang HL & Fang CC. 2004. Molecular sequencing and analysis of the viral genomic regions of *Blackeye cowpea mosaic virus* Taiwan strain. *Plant Pathol. Bull.* 13: 117–126.
- Zheng H, Chen J, Chen J, Adams MJ, & Hou M. 2002. *Bean common mosaic virus* isolates causing different symptoms in asparagus bean in China differ greatly in the 5'-parts of their genomes. *Arch. Virol.* 147(6): 1257–1262.
- Zhou GC, Wu XY, Zhang YM, Wu P, Wu XZ, Liu LW, Wang Q, Hang YY, Yang JY, Shao ZQ, Wang B, & Chen JQ. 2014. A genomic survey of thirty soybean-infecting *Bean common mosaic virus* (BCMV) isolates from China pointed BCMV as a potential threat to soybean production. *Virus Res.* 191: 125–133.