

DETEKSI BEGOMOVIRUS PADA TANAMAN CABAI DI MAGELANG INDONESIA

BEGOMOVIRUS DETECTION ON CHILLI PLANTS AT MAGELANG
INDONESIA

Fariha Wilisiani

Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, INSTIPER Yogyakarta
E-mail korespondensi: *fariha.wilis@gmail.com*

ABSTRACT

Begomovirus is one of the emerging viruses that cause serious disease on chilli plantation worldwide, including Indonesia. Chilli as the important commodity in Indonesia is reported widely infected by begomovirus. Molecular analysis on begomovirus-infecting chilli is important for the disease management of this virus. The purpose of this research is to detect the begomovirus-infecting melon in Magelang, Central Java, as one of the central chilli production in Indonesia. This research was conducted through several phases, which are: yellow and curly leaves collection on the field, virus DNA isolation, and begomovirus detection using universal primer of of this virus. The result of field studies which were conducted in Muntilan, Magelang found some chilli plant with symptom of begomovirus infection. The detection of begomovirus by PCR showed that chilli with yellowing and leaf curl symptoms is positively infected by begomovirus. This study is the report of naturally infection of begomovirus on chilli with yellowing and leaf curl symptoms at Magelang, Central Java, Indonesia.

Keyword : chilli, begomovirus, Indonesia

PENDAHULUAN

Begomovirus merupakan genus terbesar dari family *Geminiviridae* (King *et al.*, 2011). Secara keseluruhan, ada 388 spesies dalam genus *Begomovirus* yang sudah terdaftar dalam International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Genus *Begomovirus* juga diketahui tidak hanya genus terbesar dalam family *Geminiviridae*, tetapi dalam seluruh taksonomi virus

tanaman (Brown *et al.*, 2015).

Begomovirus terdiri dari virus-virus dengan genom bipartite yang memiliki dua komponen DNA (DNA-A dan DNA-B) dengan ukuran yang sama kurang lebih 2.5 hingga 3.0 kb (Fauquet *et al.*, 2003; Varma and Malathi, 2003) maupun monopartite yang hanya memiliki satu genom yang mirip dengan DNA-A (Briddon *et al.*, 2010).

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

Infeksi begomovirus pada tanaman cabai merupakan masalah penting pada budidaya tanaman tersebut dan menyebabkan kerusakan yang parah di berbagai negara tropis dan subtropis (Varma and Malathi, 2003). Penyebaran virus tersebut melalui vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci* Genn.; Hemiptera: Aleyrodidae). Gejala umum yang ditimbulkan akibat serangan begomovirus yaitu daun keriting (*curling*), menguning (*yellowing*), serta pertumbuhan tanaman yang terhambat (*stunting*) (De Barro *et al.*, 2008; Varma and Malathi, 2003). Di Indonesia, gejala yang ditimbulkan oleh infeksi begomovirus tersebut ditemukan pada tanaman cabai di beberapa daerah sentra produksi cabai, terutama di pulau Jawa dan Sumatra dengan tingkat keparahan yang tinggi (Sulandari *et al.*, 2006).

Deteksi yang umum digunakan untuk mendeteksi infeksi begomovirus yaitu dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer universal begomovirus (Wilisiani *et al.*, 2014; 2019a; 2019b; 2019c). Analisis molekuler terhadap begomovirus yang menginfeksi tanaman cabai tersebut perlu dilakukan sebagai informasi awal

dalam usaha pengendalian virus tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi ada tidaknya infeksi begomovirus pada tanaman cabai di Magelang, Jawa Tengah sebagai salah satu sentra produksi cabai di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Pengamatan dan Pengambilan Sampel Daun Cabai Isolat Magelang

Pengamatan dan pengambilan sampel daun cabai dilakukan pada bulan Agustus 2017 di Muntilan, Magelang, Jawa Tengah. Sampel yang diambil adalah daun bagian pucuk dari tanaman cabai yang bergejala daun menguning dan keriting, serta tanaman tumbuh kerdil sebanyak 10 sampel (satu sampel satu tanaman). Sampel tersebut disimpan dalam keadaan kering segar di dalam plastik dan disimpan di dalam *freezer* sebelum dilakukan analisis lebih lanjut.

Ekstraksi DNA total dari tanaman cabai bergejala

Ekstraksi DNA virus dan DNA genom total tanaman yang bergejala kuning dilakukan dengan menggunakan *DNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen). Sebanyak 100 mg sampel daun tersebut digerus sampai halus dengan penambahan nitrogen cair.

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml dan ditambahkan dengan 400 µl bufer AP1, kemudian ditambahkan 4 µl RNase (100 mg/ml). Selanjutnya sampel diinkubasi selama 10 menit pada penangas air 65°C sambil tabung dibolak balik setiap 5 menit. Selanjutnya, ditambahkan bufer P3 sebanyak 130 µl ke dalam tabung, dicampur dengan sampel, dan diinkubasi selama 5 menit di dalam box yang telah berisi pecahan es batu. Setelah itu, tabung berisi sampel tersebut disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam *QIAshredder Mini spin column* yang telah dipasangkan dengan 2 ml *collection tube*, kemudian disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Larutan yang tertampung di dalam *collection tube* dipindahkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml baru, kemudian ditambahkan 1.5 volume bufer AW1 ke dalam tabung tersebut dan dicampur dengan cara dipipet. Sebanyak 650 µl sampel tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam *DNeasy Mini spin column* yang juga telah dipasangkan dengan 2 ml *collection tube*. Selanjutnya, *column* tersebut disentrifus selama 1 menit

dengan kecepatan 8000 rpm. Larutan yang tertampung di dalam *collection tube* dibuang dan tube tersebut dipasangkan kembali dengan *DNeasy Mini spin column* yang terdapat sampel di dalamnya. Tahapan ini dilakukan kembali hingga semua sampel yang ada di dalam tabung 1.5 ml tersentifus semua. Selanjutnya, *DNeasy Mini spin column* diletakkan di *collection tube* yang baru. Sebanyak 500 µl bufer AW2 ditambahkan ke dalam *column* tersebut dan disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Larutan yang tertampung di dalam *collection tube* dibuang, kemudian ditambahkan kembali buffer AW2 sebanyak 500 ml ke dalam *DNeasy Mini spin column* dan disentrifus selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. *DNeasy Mini spin column* dipindahkan ke dalam tabung mikro 1.5 ml, kemudian ditambahkan buffer AE sebanyak 50 µl dan diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang (15-25°C). Selanjutnya *column* tersebut disentrifus selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. *DNeasy Mini spin column* dibuang dari tabung mikro 1.5 ml. Larutan yang tertampung di dalam tabung mikro 1.5 ml tersebut mengandung DNA virus dan DNA total genom

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

tanaman untuk digunakan lebih lanjut pada tahap deteksi begomovirus.

Deteksi begomovirus dengan PCR

DNA yang diperoleh digunakan sebagai *template* untuk deteksi begomovirus dengan menggunakan metode PCR. Primer universal dari begomovirus UPV1 (Bridson and Markham, 1994) dan PAV1c715 (Rojas *et al.*, 1993) (Tabel 1) digunakan dalam metode PCR untuk deteksi ada tidaknya infeksi begomovirus pada sampel yang dianalisis. Amplifikasi produk PCR dilakukan dengan *BioTaqTM DNA Polymerase Kit* (Bioline). PCR dilakukan pada 25 μ l *mix-reaction* yang mengandung 2.5 μ l 10x *NH₄ Reaction Buffer*, 1.5 μ l 50 mM *MgCl₂*, 2.5 μ l 100 mM *dNTP Mix*, 1 μ l setiap primer UPV1 dan PAV1c715 (10 pM), 0.5 μ l *BioTaqTM DNA Polymerase*, dan *distilled-water* hingga 25 μ l total volume akhir reaksi. Kondisi PCR dilakukan pada 94°C selama 2 menit untuk pre-denaturasi, diikuti dengan 35 siklus denaturasi pada 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, dan elongasi pada 72°C selama 1 menit 30 detik, dan diikuti dengan *final extension* pada 72°C selama 5 menit.

Visualisasi pita DNA begomovirus hasil amplikasi dengan PCR

Produk PCR deteksi begomovirus dari tiap sampel divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 0.8% pada 1x bufer TBE (Tris-Boric acid-EDTA). Sebanyak 5 μ l produk PCR dari masing-masing sampel ditambahkan dengan 2 μ l *loading dye* dan dicampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel (satu sampel satu sumuran). Untuk menentukan ukuran dari produk PCR disertakan juga DNA standar/marker (1 kb; Invitrogen) sebagai pembanding.

Gel agarose tersebut dielektroforesis selama 30 menit. Setelah itu, gel diwarnai dengan cara direndam di dalam larutan pewarna *Etidium bromide* 1% selama 3 menit dan dicuci dengan air selama 10 menit. Gel agarosa tersebut divisualisasi di atas *UV transilluminator* dan pita-pita DNA yang tampak didokumentasikan untuk dianalisis amplifikasi target PCR yang diinginkan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan gejala daun keriting pada tanaman cabai

Hasil pengamatan gejala pada bagian atas daun tanaman cabai di

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

lahan cabai Muntilan, Magelang, Jawa Tengah menunjukkan bahwa tanaman-tanaman cabai tersebut diduga terinfeksi *Begomovirus* dengan gejala infeksi yang parah, meliputi daun menguning dan keriting, serta pertumbuhan tanaman terhambat (*stunting*) (Gambar 1).

Tanaman dengan gejala-gejala tersebut diduga dapat mengakibatkan berkurangnya klorofil pada Selain itu, kutu kebul (*Bemisia tabaci*) juga teramati sangat banyak di setiap tanaman cabai pada lahan tersebut.



Gambar 1. Tanaman cabai bergejala daun menguning dan keriting yang diduga terinfeksi begomovirus.

Populasi kutu kebul tersebut sangat melimpah pada musim kemarau (Sulandari *et al.*, 2006). Survei lapangan dalam penelitian ini dilakukan di bulan Agustus sehingga diduga berkaitan dengan banyaknya populasi kutu kebul yang teramati di lahan cabai tersebut. Keberadaan kutu kebul sebagai vektor begomovirus di lahan tanaman cabai tersebut

dimungkinkan sangat berkaitan dengan penyebaran infeksi virus tersebut. Serangga vektor tersebut dapat berkembang dengan baik di daerah tropika (Sulandari *et al.*, 2006) sehingga penyakit yang disebabkan karena infeksi begomovirus di Indonesia sebagai negara tropis sangat tinggi.

Deteksi begomovirus dengan metode PCR

Deteksi begomovirus pada sampel cabai bergejala daun menguning dan keriting diawali dengan tahap isolasi DNA virus dan DNA total tanaman. Dalam penelitian ini, isolasi DNA dilakukan dengan kit yang dapat mengekstraksi DNA virus dan DNA total tanaman dari sampel daun cabai tersebut. Total DNA yang diisolasi dari masing-masing sampel digunakan sebagai *template* dalam PCR untuk deteksi begomovirus menggunakan primer *universal Begomovirus*, UPV1 dan PAV1c715. Hasil deteksi begomovirus dengan PCR menggunakan sepasang primer pada seluruh sampel yang dikoleksi menunjukkan hasil positif terinfeksi begomovirus dengan terlihatnya band berukuran kurang lebih 1500 bp (Gambar 2) pada seluruh sampel yang dianalisis.

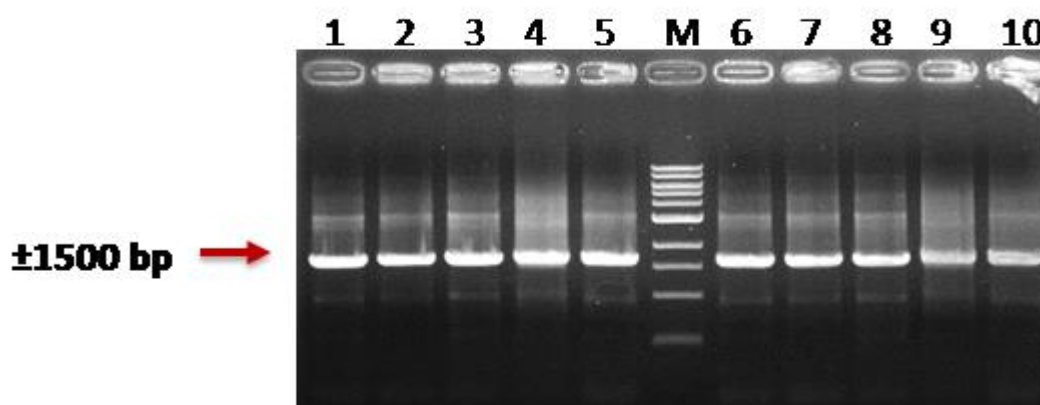
Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

Tabel 1. Primer universal begomovirus

Primer	Sekuen nukleotida	Ukuran PCR	Reference
UPV1	KSGGGTCGACGTCATCAATGACGTTTRTAC	± 1500 bp	Brown JK, <i>et al.</i> 1994
PAVc715	GATTCTGCAGTTDATRRTTYTCRTCCATCCA		Rojas MR, <i>et al.</i> 1993

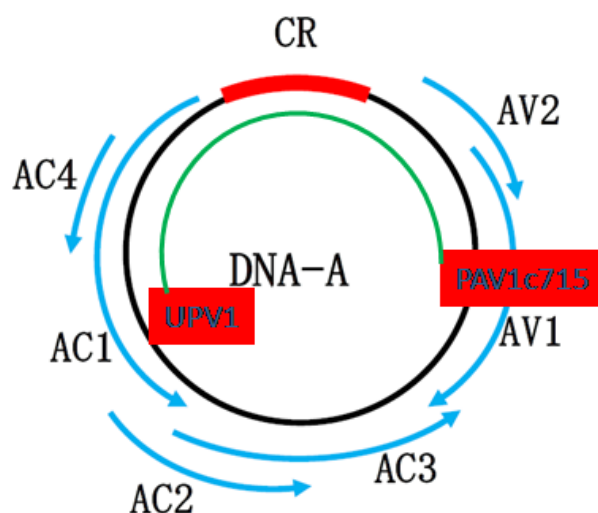
Deteksi begomovirus dengan target gen yang berada di DNA-A merupakan hal penting berkaitan dengan peran DNA-A dalam identifikasi dan klasifikasi spesies begomovirus (Wilisiani *et al.*, 2019a; 2019b; 2019c). Selain itu, gen AV1 pada DNA-A begomovirus merupakan *conserve gene* dari beberapa spesies anggota begomovirus (Revill *et al.*, 2003; Reddy *et al.*, 2005), sehingga primer tersebut dapat digunakan untuk identifikasi awal virus tersebut (Wilisiani *et al.*, 2014).

Infeksi begomovirus pada tanaman cabai juga telah banyak dilaporkan di berbagai daerah di Indonesia (Sakata *et al.*, 2008). Infeksi begomovirus pada tanaman cabai di Indonesia dilaporkan terjadi di daerah Jawa Barat pada tahun 1999 (Hidayat *et al.*, 1999). Sejak tahun 2000 di daerah Sleman, Kulon Progo, Bantul, dan Gunung Kidul (DIY) dilaporkan terjadi epidemi penyakit pada cabai karena infeksi begomovirus pada tanaman cabai dengan intensitas mencapai 100% (Sulandari *et al.*, 2006).



Gambar 2. Hasil deteksi begomovirus pada tanaman cabai bergejala daun menguning dan keriting dengan PCR, divisualisasi dengan gel agarose 0.8% (1-10: sampel tanaman cabai; M: marker 1 kb DNA ladder).

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....



Gambar 3. Posisi primer universal UPV1 dan PAC1c715 pada genom DNA-A begomovirus

Begomovirus dapat menular dari tanaman inang ke tanaman lain melalui vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci*) (De Barro *et al.*, 2008). Vektor tersebut diketahui mempunyai kisaran inang (*host range*) yang luas (De Barro *et al.*, 2008; Wilisiani *et al.*, 2019b; 2019c). Adanya infeksi begomovirus pada tanaman cabai dalam penelitian ini diduga disebabkan oleh *B. tabaci* yang telah membawa virus tersebut. Kondisi lingkungan di sekitar lahan tanaman cabai yang diamati dalam penelitian ini diduga ikut berpengaruh terhadap penyebaran begomovirus di lingkungan tersebut (Wilisiani *et al.*, 2014). Beberapa tanaman yang ditanam di sekitar lahan tanaman cabai yang diamati dalam penelitian ini, meliputi tanaman tomat dan terong,

merupakan jenis tanaman yang termasuk dalam kisaran inang kutu kebul sebagai vektor begomovirus, sehingga dimungkinkan adanya penyebaran infeksi begomovirus dari tanaman-tanaman tersebut (Aidawati *et al.*, 2005; Hidayat *et al.*, 2006; Sudiono *et al.*, 2001). Selain itu, beberapa jenis tumbuhan liar (*H. brevipes*, *P. floridana*, dan *C. juncea*), tanaman indikator (*D. stramonium* atau kecubung) serta gulma (*A. conyzoides* atau babadotan) yang biasa tumbuh di sekitar pertanaman cabai ternyata juga termasuk dalam kisaran inang vektor virus tersebut (Sulandari *et al.*, 2006) sehingga diduga juga berpengaruh terhadap penyebaran begomovirus di lingkungan tersebut. Di Indonesia, keberadaan gulma di sekitar pertanaman cabai dapat

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

berperan sebagai inang alternatif begomovirus dan juga sebagai inang perbanyakkan vektor kutu kebul (Sakata *et al.*, 2008; Sulandari *et al.*, 2006). Keberadaan gulma pada pertanaman cabai masih belum diperhatikan, misalnya tidak dilakukan penyiangan secara teratur dan lahan dibiarkan ditumbuhi gulma dalam jangka waktu relatif lama setelah masa panen sampai saatnya ditanami cabai pada pertanaman berikutnya sehingga dapat melestarikan sumber inokulum begomovirus di lapangan (Sulandari *et al.*, 2006).

KESIMPULAN DAN SARAN

Penyakit pada tanaman cabai dengan gejala daun menguning dan keriting pada daun bagian atas tanaman disebabkan oleh infeksi begomovirus. Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk mengidentifikasi jenis begomovirus yang menginfeksi tanaman tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Tomohide Natsuaki, Dr. Hishashi Nishigawa, dan Dr. Yutaro Neriya, yang telah memfasilitasi dan membantu penelitian di laboratorium *Plant*

Pathology, Utsunomiya University, Japan serta Dr. Sedyo Hartono yang telah membantu survey lapangan dan sampling tanaman cabai di Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Aidawati N, Hidayat SH, Suseno R, Hidayat P, dan Sujiprihati S. 2005. Identifikasi *Geminivirus* yang menginfeksi tomat berdasarkan pada teknik polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 10(1): 29–32.
- Briddon RW, Markham PG. 1994. Universal primers for the PCR amplification of dicot-infecting geminiviruses. *Molecular Biotechnology* 1:202–205.
- Briddon RW, Patil BL, Bagewadi B, Nawaz-ul-Rehman MS, Fauquet CM. 2010. Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology* 10:97.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JCF, Fiallo-Olivé, E, Briddon RW, Hernández-Zepeda C, Idris A, Malathi VG, Martin DP, Rivera-Bustamante R, Ueda S, Varsani A. 2015. Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology* 160: 1593-1619.

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

- De Barro PJ, Hidayati SH, Frohlich D, Subandiyah S, Ueda S. 2008. A virus and its vector, *Pepper yellow leaf curl virus* and *Bemisia tabaci*, two new invaders of Indonesia. *Biological Invasions* 10:411–433.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Bridson RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC, Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405–421.
- Hidayat SH, Chatchawankanpanich O, Rusli E, dan Aidawati N. 2006. *Begomovirus* associated with pepper yellow leaf curl disease in West Java, Indonesia. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia* 11(2): 87–89.
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. 2011. *Virus taxonomy. Ninth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press London: 351–373
- Mushtaq S, Shamin F, Shafique M, Haider MS. 2014. Effect of Whitefly Transmitted *Geminiviruses* on Physiology of Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and Tobacco (*Nicotiana benthamiana* L.) Plants. *Journal of Natural Science Research* 4: 2225
- Reddy RCV, Colvin J, Muniyappa V, Seal S. 2005. Diversity and Distribution of Begomoviruses Infecting Tomato in India. *Archives of Virology* 150: 845–867
- Revill PA, Ha CV, Porchun SC, Vu MT, Dale JL. 2003. The Complete Nucleotide Sequence of Two Distinct Geminiviruses Infecting Cucurbits in Vietnam. *Archives of Virology* 148: 1523–1541.
- Rojas MR, Gilbertson RL, Russell DR, Maxwell DP. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Diseases* 77:340–347
- Sakata J, Sibuya SY, Sharma P and Ikegami M. 2008. Strain of New Bipartite Begomovirus, *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus*, in Leaf-curl-disease Tomato and Yellow-vein-diseased Ageratum in Indonesia. *Archives of Virology* 153: 2307-2313.
- Sudiono, Hidayat SH, Suseno S, and Sosromarsono S. 2001. Deteksi Molekuler dan Uji Kisaran Inang Virus Geminivirus Asal Tanaman Tomat. *Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah Perhipunan Fitopatologi Indonesia*; 22-24 Agustus 2001, Bogor.
- Sulandari S, Suseno R, Hidayat SH, Harjosudarmo J, and Sosromarsono S. 2006. Deteksi dan Kajian Kisaran Inang Virus Penyebab Penyakit Daun Keriting Kuning Cabai. *Hayati* 13: 1–6.

Fariha Wilisiani: Deteksi Begomovirus pada Tanaman Cabai.....

Varma A, Malathi VG. 2003. Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142:145–164

Wilisiani F, Neriya Y, Tagami M, Kaneko M, Hartono S, Nishigawa H, Natsuaki T. 2019a. Complete genome sequence of *Tomato leaf curl New Delhi virus* from luffa in Indonesia. *Microbiology Resource Announcements* 8(15):e01605-18 DOI: 10.1128/MRA.01605-18

Wilisiani F, Mashiko T, Wang WQ, Suzuki T, Hartono S, Neriya Y, Nishigawa H, Natsuaki T. 2019b. New recombinant of *Tomato leaf curl New Delhi virus* infecting melon in Indonesia. *Journal of General Plant Pathology* <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00849-7>.

Wilisiani F, Somowiyarjo S, Hartono S. 2014. Identifikasi molecular virus penyebab penyakit daun keriting isolat Bantul pada melon. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 18 (1): 47-54.

Wilisiani F, Tomiyama A, Katoh H, Hartono S, Neriya Y, Nishigawa H, Natsuaki T. 2019c. Development of a LAMP assay with a portable device for real-time detection of begomoviruses under field conditions. *Journal of Virological Methods* 265: 71-76