

Deteksi dan Identifikasi Virus pada Umbi Bawang Merah

Detection and Identification of Plant Viruses on Shallot

Arif Kurniawan^{1,2}, Gede Suastika^{1*}

¹Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

²Badan Karantina Pertanian, Jakarta 12550

ABSTRAK

Bawang merah merupakan komoditas hortikultura penting di Indonesia. Salah satu pembatas produksinya ialah penyakit yang disebabkan virus. Penyebaran virus pada bawang merah dapat melalui umbi yang diperdagangkan, namun belum banyak informasi terkait virus-virus terbawa umbi bawang. Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi virus yang berasosiasi dengan umbi bawang merah. Pengambilan sampel dilakukan secara acak terhadap beberapa varietas bawang merah (varietas Jawa, Biru, Nganjuk dan Brebes) yang diperoleh dari Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Deteksi dan identifikasi virus menggunakan metode RT-PCR dengan primer spesifik OYDV, SYSV, SLV, dan ShVX, serta perunutan nukleotida. RT-PCR hanya berhasil mengamplifikasi *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) dengan ukuran pita DNA ~749 pb dan virus lainnya tidak terdeteksi. Kejadian SYSV pada umbi bawang merah varietas Jawa dan Brebes berturut-turut 60% dan 53.3%. Perunutan DNA menunjukkan homologi nukleotida tertinggi terhadap SYSV asal Cina dan Korea Selatan.

Kata kunci: perunutan nukleotida, RT-PCR, *Shallot yellow stripe virus*

ABSTRACT

Shallot is an important horticultural crop in Indonesia. One of its production constraint is viral disease. Dispersal of viruses on shallots may occur through shallots bulb trading. However, there is not much information regarding viruses infecting shallot bulbs. Laboratory study was conducted to detect and identify viruses associated with shallot. Random sampling was done for several varieties of shallots (Jawa, Biru, Nganjuk, and Brebes varieties) collected from Bantul Districts. Virus detection and identification was based on RT-PCR using specific primer of OYDV, SYSV, SLV, and ShVX followed by sequencing of the nucleotides. RT-PCR was only successfully amplified *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) with size ~749 bp, while other viruses were not detected. Disease incidence of SYSV on Java and Brebes varieties were 60% and 53.3% respectively. Nucleotide sequences of SYSV CP gene showed the highest homology to SYSV from China and South Korea.

Key words: RT-PCR, sequencing nucleotides, *Shallot yellow stripe virus*

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Jalan Kamper, Bogor 16680
Tel: 0251-8629364, Faks:0251-8629362, Surel: gedesuast@yahoo.com

PENDAHULUAN

Bawang merah (*Allium cepa*) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang banyak dikonsumsi penduduk Indonesia dan mempunyai nilai ekonomi cukup penting sehingga lalu lintas antardaerah komoditas ini cukup tinggi. Berdasarkan data BPS (2012) produksi bawang merah tahun 2010 mencapai 1 048 934 ton. Virus penting pada bawang merah antara lain *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), *Mite-borne filamentous virus* (MbFV), *Shallot latent virus* (SLV), dan *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) (Diekmann 1997; CABI 2007).

Budi daya bawang merah di Indonesia, khususnya di Kabupaten Bantul, dilakukan dengan penanaman umbi bibit. Hal ini memperbesar peluang tersebarnya virus. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi virus yang terbawa pada umbi bawang merah.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan Sampel Bawang Merah

Bawang merah diambil secara acak dari 4 varietas (Jawa, Biru, Nganjuk, dan Brebes) dari Kabupaten Bantul, Yogyakarta. Sampel bawang merah diambil pada tiga titik (bagian depan, tengah, dan bagian belakang) di dalam gudang penyimpanan umbi bawang merah. Sampel ini dicampur sampai homogen sehingga didapatkan sampel komposit. Sebanyak 2 kg sampel kiriman diambil dari sampel komposit dan dipisahkan menjadi dua

bagian, yaitu sampel arsip sebagai cadangan dan sampel kerja untuk pemeriksaan virus.

Isolasi RNA dan Sintesis *Complementary DNA*

Pemeriksaan virus dilakukan dengan mengambil 30 umbi bawang merah dari sampel kerja dan ditumbuhkan pada tanah steril di rumah kaca. Setelah tanaman berumur 20 hari, sampel daun diambil secara komposit yang masing-masing mewakili 5 tanaman untuk dideteksi dengan metode *two-step* RT-PCR. Ekstraksi RNA total dilakukan dari 0.1 g daun bawang merah menggunakan *Xprep Plant RNA Mini Kit* (Philakorea Technology). Sintesis cDNA menggunakan *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (GE Healthcare). Prosedur ekstraksi RNA total dan sintesis cDNA dilakukan sesuai protokol pada kit.

Amplifikasi RT-PCR

Reaksi PCR dilakukan dengan menggunakan *MasterMix (Qiagen)* serta primer spesifik untuk deteksi protein selubung OYDV, SYSV, SLV, dan ShVX (Tabel 1). PCR dilakukan pada mesin *veriti-applied biosystem* dengan kondisi reaksi denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, sebanyak 35 siklus pada suhu denaturasi 95 °C selama 1 menit; penempelan primer (OYDV dan SYSV pada suhu 57 °C selama 45 detik; SLV 55.8 °C selama 45 detik; ShVX 55 °C selama 1 menit). Ekstensi (OYDV, SYSV dan SLV) pada suhu 72 °C selama 1 menit, sedangkan untuk ShVX pada suhu 72 °C selama 1.5 menit. Selanjutnya tahap ekstensi akhir pada suhu

Tabel 1 Primer yang digunakan untuk reaksi amplifikasi PCR

Virus target	Primer	Produk PCR (pb)	Sumber
OYDV	F 5'- CGAAGCAAATTGCCAAGCAG -3' R 5'- CGATTAGCTGCCCCCTCTAAC -3'	601	Mahmoud <i>et al.</i> (2007)
SYSV	F 5'- ACACGAGCCACACACGCACA -3' R 5'- TCCCTAACAAAACGTGCAACACTCA -3'	749	NCBI (2011)
SLV	F 5'- AAACCTTTTGGTTCACTTTAGG -3' R 5'- GCGTGCTATATTTAAGTTGCATAC -3'	992	Torrico <i>et al.</i> (2010)
ShVX	F 5'- ATTTAGGGGTGAAGGTCTGT -3' R 5'- GAGTTTTGAGGTCGTTGG -3'	912	Egusquiza <i>et al.</i> (2008)

72 °C selama 7 menit. Hasil PCR dielektroforesis menggunakan Mupid-eXu pada tegangan 100 Volt selama 30 menit dan didokumentasikan menggunakan Gel Doc (Bio-Rad).

Perunutan DNA dan Analisis Filogenetika

Perunutan basa nukleotida dilakukan dengan mengirim sampel hasil PCR *First Base Genetica Science* (Singapura). Hasil runutan DNA disejajarkan (*align*) dengan data virus yang tersedia di *GenBank* menggunakan program *basic local alignment search tool* (BLAST) yang terdapat pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Selanjutnya analisis homologi dilakukan terhadap isolat virus lain yang tersedia pada *GenBank* menggunakan BioEdit versi 7.0.0 dan dilanjutkan pembuatan pohon filogenetika menggunakan program Mega v 4.0 untuk menunjukkan kekerabatan dengan virus isolat lain yang tersedia pada *GenBank*.

Kejadian Penyakit dan Daya Tumbuh

Kejadian penyakit ditentukan berdasarkan hasil deteksi RT-PCR terhadap sampel individu dari sampel komposit yang sebelumnya terdeteksi positif SYSV. Persentase daya tumbuh didapatkan dengan menghitung umbi

yang tumbuh dari 30 umbi yang ditumbuhkan untuk deteksi dan identifikasi virus.

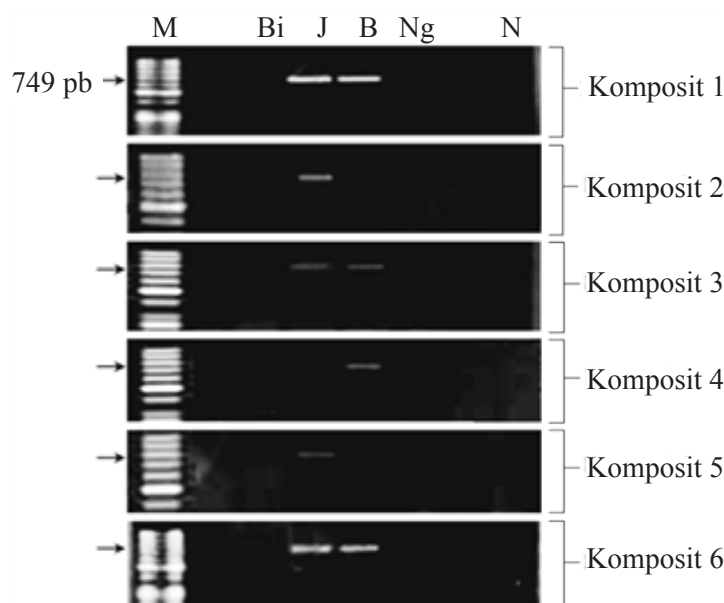
HASIL

Deteksi Virus

Deteksi virus dengan RT-PCR dari masing-masing 6 sampel komposit menunjukkan tidak terdeteksi OYDV, ShVX dan SLV dari semua sampel komposit bawang merah. Hanya SYSV yang berhasil teramplifikasi dengan pita DNA berukuran ~749 pb. SYSV terdeteksi positif pada 5 dari 6 sampel komposit bawang merah varietas Jawa dan pada 4 dari 6 sampel komposit varietas Brebes (Gambar 1). Selanjutnya, kejadian penyakit SYSV ditentukan dengan mendeteksi sampel komposit yang positif secara individu, yaitu 25 sampel individu varietas Jawa dan 20 sampel individu varietas Brebes.

Perunutan Basa Nukleotida dan Analisis Filogenetika

Perunutan basa nukleotida gen CP SYSV berhasil mendapatkan sikuen sepanjang 709 pb. Analisis nukleotida runutan DNA SYSV menggunakan BLAST menunjukkan bahwa isolat SYSV asal varietas Jawa dan Brebes memiliki homologi nukleotida tertinggi dengan



Gambar 1 Hasil PCR menggunakan primer spesifik SYSV terhadap komposit (1–6) sampel bibit bawang merah. Varietas bawang merah terdiri atas Bi, Biru; J, Jawa; B, Brebes; Ng, Nganjuk; M, 50 pb DNA Ladder (Thermo); N, kontrol negatif.

SYSV isolat dari Cina, Jepang, Korea Selatan, serta Vietnam. Homologi nukleotida SYSV antara keduanya sebesar 100%, sedangkan homologi kedua isolat terhadap SYSV isolat lain (isolat SYSV dari Cina, Jepang, Korea Selatan, serta Vietnam) berkisar 91.8–94.9% dan 72% terhadap OYDV (Tabel 2).

Analisis filogenetika memperlihatkan dengan jelas bahwa isolat SYSV isolat Jawa dan Brebes berada pada kelompok yang sama dengan SYSV dari Cina, Korea Selatan, Jepang, dan Vietnam namun berbeda kelompok dengan OYDV sebagai *outgroup* dari genus yang sama, yaitu genus *Potyvirus*. Sebagai *outgroup* genus digunakan SLV (genus *Carlavirus*) yang juga dapat menginfeksi bawang merah (Gambar 2).

Kejadian Penyakit dan Daya Tumbuh

Pada 5 sampel komposit pada varietas Jawa dan 4 sampel komposit pada varietas

Brebes positif terdeteksi SYSV (Gambar 1), hasil deteksi sampel individu menunjukkan kejadian penyakit SYSV sebesar 60% pada varietas Jawa dan 53.3% pada varietas Brebes (Gambar 3).

Apabila persentase infeksi SYSV pada bawang merah tersebut disandingkan dengan persentase daya tumbuh umbi, terlihat bahwa dengan adanya infeksi SYSV, daya tumbuh umbi varietas Jawa sebesar 83.3% dan varietas Brebes 73.3% (Gambar 4).

PEMBAHASAN

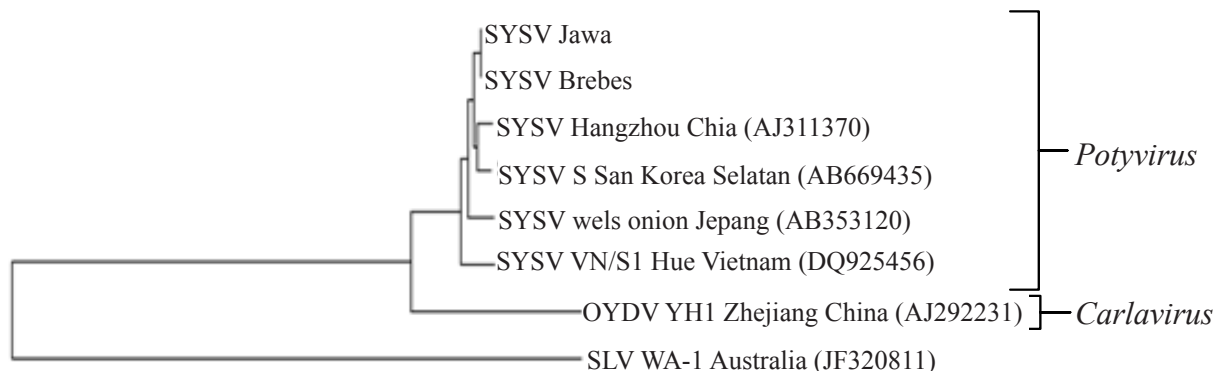
Berdasarkan data *GenBank* SYSV isolat Jawa dan Brebes menunjukkan tingkat homologi yang tinggi (91–94%) dengan isolat SYSV dari Cina, Jepang, Korea Selatan, dan Vietnam. Berdasarkan analisis homologi terhadap sikuen nukleotida protein selubung menunjukkan bahwa virus yang terdeteksi

Tabel 2 Homologi sikuen nukleotida protein selubung isolat SYSV pada bawang merah varietas Jawa dan Brebes dengan isolat virus pada bawang dari negara lain

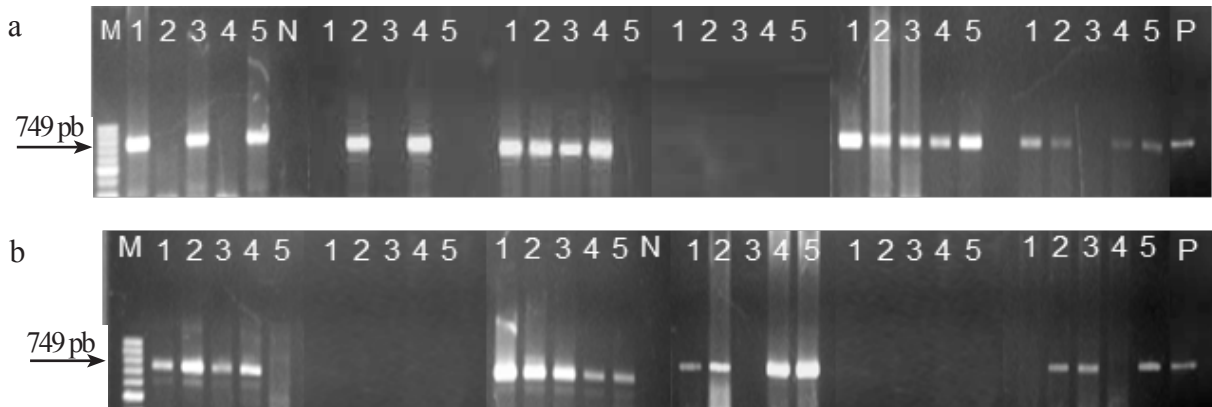
Nomor isolat virus	1	2	3	4	5	6	7	8
1 SYSV Jawa	-	100.0	94.9	93.9	94.9	91.8	72.0	37.1
2 SYSV Brebes		-	94.9	93.9	94.9	91.8	72.0	37.1
3 SYSV Hangzhou Cina ¹ *			-	93.8	96.5	91.7	72.3	36.4
4 SYSV wels onion Jepang ² *				-	93.5	92.5	71.2	36.4
5 SYSV SSan Korea Selatan ³ **					-	92.2	72.0	36.6
6 SYSV VN/S1 Hue Vietnam ⁴ *						-	71.1	36.8
7 OYDV YH1 Zhejiang Cina ⁵ *							-	35.4
8 SLV WA-1 Australia ⁶ *								-

Kode aksesinya pada *GenBank*: ¹AJ311370, ²AB353120, ³AB669435, ⁴DQ925456, ⁵AJ292231, ⁶JF320811,

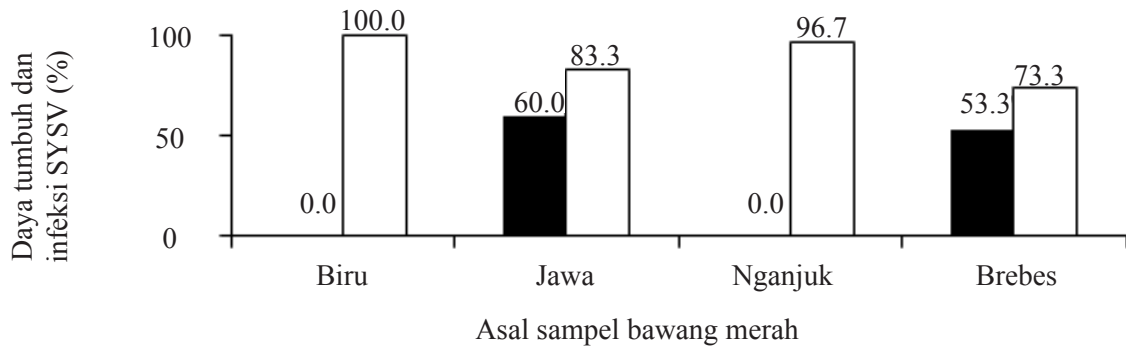
* dipublikasikan pada jurnal; ** tidak dipublikasikan pada jurnal



Gambar 2 Hubungan kekerabatan SYSV asal umbi bawang merah varietas Jawa dan Brebes dari daerah Bantul, Yogyakarta dengan SYSV negara lainnya.



Gambar 3 Hasil amplifikasi SYSV pada setiap individu (1–5) dari 30 umbi bawang merah yang diuji. a, varietas Jawa; b, varietas Brebes; M, 50 pb DNA Ladder (Thermo); P, kontrol positif; dan N, kontrol negatif.



Gambar 4 □ , daya tumbuh dan; ■ , persentase infeksi SYSV pada 4 varietas sampel bibit bawang merah lokal.

pada varietas Jawa dan Brebes merupakan SYSV dan merupakan satu spesies yang sama dengan SYSV isolat lain (isolat SYSV dari Cina, Jepang, Korea Selatan, dan Vietnam) karena untuk genus *Potyvirus*, nilai homologi nukleotida virus 90–99% dikategorikan sebagai satu spesies yang sama (Shukla dan Ward 1988). Hal ini didukung oleh kenyataan bahwa nilai homologi sikuen nukleotida SYSV isolat Jawa dan Brebes kurang dari 90% bila dibandingkan dengan spesies lain (misalnya OYDV) di dalam genus *Potyvirus*. Dengan demikian berdasarkan hasil runutan DNA dan homologinya dengan isolat lain dapat dipastikan bahwa SYSV isolat Jawa dan Brebes adalah SYSV. Hal ini menambah informasi hasil penelitian Arisuryanti *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa bawang merah di Yogyakarta dan Brebes terdeteksi beberapa macam virus antara lain OYDV, SLV dan *Leek yellow stripe virus* (LYSV).

SYSV isolat Jawa dan Brebes paling dekat kekerabatannya dengan SYSV isolat Hangzhou Cina dan Korea Selatan. Berdasarkan Van der Vlugt *et al.* (1999) daerah sebar SYSV di antaranya ialah Cina dan Indonesia. Hal ini menunjukkan adanya kemungkinan bahwa SYSV isolat Hangzhou Cina, isolat Jawa, dan Brebes berasal dari sumber yang sama atau penyebaran SYSV ketiga isolat tersebut meliputi Indonesia (Jawa) dan Cina (Hangzhou).

Kejadian penyakit pada varietas Jawa dan Brebes berturut-turut 60% dan 53.3% lebih rendah daripada penelitian Gunaeni *et al.* (2011). Mereka menyatakan bahwa sebanyak 20 sampel bawang merah yang diambil dari Jawa Barat dan Jawa Tengah terdeteksi SYSV 95%.

Pengaruh infeksi SYSV terhadap persentase daya tumbuh umbi relatif kecil, sedangkan umbi yang tidak terdeteksi adanya virus daya tumbuhnya jauh lebih baik. Diekmann (1997) menyatakan bahwa umbi

bawang yang terserang masih mempunyai daya tumbuh baik dan masih dapat memproduksi. Arti penting secara ekonomi belum dilaporkan. Hal ini mengakibatkan tingginya potensi penyebaran SYSV melalui umbi sebagai bahan perbanyakan karena lalulintasnya menjadi terabaikan sehingga dapat mengancam produksi bawang merah jika pada suatu saat keberadaan virus ini menjadi dianggap penting di Indonesia, atau berpotensi menghambat ekspor bawang merah Indonesia jika pada suatu saat virus ini menjadi perhatian di dalam *sanitary and phytosanitary measures* dalam *World Trade Organization* (WTO).

DAFTAR PUSTAKA

- Arisuryanti T, Daryono BS, Hartono S. 2009. Pengembangan metode skrining ketahanan tanaman bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) terhadap virus menggunakan RT-PCR. Laporan Akhir Hasil Penelitian Hibah Bersaing (Tahun Kedua) Universitas Gadjah Mada Tahun Anggaran 2009. Yogyakarta (ID): Universitas Gadjah Mada.
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2012. *Luas Panen, Produksi dan Produktivitas Bawang Merah, 2009–2010*. Jakarta (ID): Badan Pusat Statistik.
- [CABI] Centre for Agricultural Bioscience International. 2007. *Crop Protection Compendium* [CD-Rom]. Wallingford (UK): CABI. 2 CD-Rom dengan penuntun di dalamnya.
- Diekmann M. 1997. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm Number 18 Allium spp.* Roma (IT): FAO.
- Egusquiza ZP, Ward LI, Clover GRG, Fletcher JD, Vlugt RAAVD. 2008. First report of *Shallot virus X* in shallot in New Zealand [abstrak]. *New Disease Reports*. <http://www.ndrs.org.uk/article.php?id=018029> [diakses 18 Nov 2008].
- Gunaeni N, Wulandari AW, Duriat AS, Muharam A. 2011. Insiden penyakit virus tular umbi pada tiga belas varietas bawang merah asal Jawa Barat dan Jawa Tengah. *J Hort*. 21(2):164–172.
- Mahmoud SYM, Maaty SAAE, Borollosy AME, Ghaffar MHA. 2007. Identification of *Onion yellow dwarf virus* as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. *American-Eurasian J Agric Environ Sci*. 2(6):746–755. DOI: <http://dx.doi.org/10.3923/ijv.2008.1.13>.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2011. Primer-BLAST: Finding primers specific to your PCR template using Primer3 and BLAST. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast> [diakses 13 Jul 2011].
- Shukla DD, Ward CW. 1988. Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the *Potyvirus* group. *J Gen Virol*. 69:2703–2710. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/0022-1317-69-11-2703>.
- Torrico AK, Cafrune EE, Conci VC. 2010. First report of *Shallot latent virus* on garlic in Argentina. *Plant Dis*. 97(7):915. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-94-7-0915B>.
- Van der Vlugt RAA, Steffens P, Cuperus C, Barg E, Lesemann DE, Bos L, Vetten HJ. 1999. Further evidence that *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) is a distinct *Potyvirus* and reidentification of *Welsh Onion yellow stripe virus* as a SYSV strain. *Phytopathology*. 89(2):148–155. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/PHTO.1999.89.2.148>.