

KOMUNIKASI SINGKAT

Identifikasi Molekuler *Cowpea mild mottle virus* pada Tanaman Kedelai di Jawa

Molecular Identification of *Cowpea mild mottle virus* on Soybean in Java

Umi Kulsum¹, Sedyo Hartono^{2*}, Sri Sulandari², Susanto Sumowiyarjo²

¹Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan, Karawang 41374

²Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta 55281

ABSTRAK

Kedelai (*Glycine max*) merupakan salah satu tanaman pangan penting di Indonesia, tetapi produksinya belum memenuhi kebutuhan nasional. Salah satu faktor pembatas produksi ialah infeksi oleh *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV). Infeksi CPMMV dapat menimbulkan berbagai gejala pada tanaman kedelai seperti mosaik, klorosis, nekrosis, distorsi, dan kerdil. Tujuan penelitian ialah mendeteksi dan mengidentifikasi CPMMV secara molekuler dari kedelai varietas Anjasmoro, Argomulyo, Grobogan, dan dua kedelai Edamame varietas lokal. Sampel bergejala diperoleh secara acak dari berbagai lokasi sentra tanaman kedelai di Jawa. Amplifikasi pita DNA menggunakan primer spesifik selubung protein CPMMV hanya berhasil diperoleh dari sampel daun kedelai varietas Argomulyo asal Malang yang bergejala mosaik, *vein-clearing* dan klorosis. Analisis lebih lanjut berdasarkan sikuen asam amino dan nukleotida isolat CPMMV tersebut menunjukkan tingkat homologi yang tertinggi (99%) dengan isolat CPMMV dari kacang buncis asal Cina.

Kata kunci: amplifikasi, mosaik, selubung protein, varietas Anjasmoro

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max*) is an important food crops in Indonesia, but the production is considered low. Infection of *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) may affect to the productivity of the crops. The virus cause a variety of symptoms on soybean such as mosaic, chlorosis, necrosis, distortion, and leaf dwarf. The aims of this study were to detect and identify CPMMV by molecular technique from some varieties of soybeans, i.e. 'Anjasmoro', 'Argomulyo', 'Grobogan', and two local Edamame varieties. Symptomatic samples was obtained randomly from main soybean growing areas in Java. DNA amplification using specific primer for coat protein of CPMMV was only successfully gained from leaf samples of var. Argomulyo from Malang which showing mosaic on the leaf surface, vein clearing, and chlorosis. Further amino acid and nucleotide sequence analysis showed that this CPMMV isolate has highest homology (99%) to CPMMV isolate of French bean from China.

Key word: amplification, coat protein, mosaic, variety Anjasmoro

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Jalan Flora, Bulaksumur, Yogyakarta 55281.
Tel: 0274-563062, 6491298, Faks: 0274-563062, Surel: sedyohartono@ugm.ac.id

Kedelai (*Glycine max*) merupakan salah satu komoditas tanaman pangan yang penting di Indonesia. Biji kedelai banyak dimanfaatkan untuk berbagai jenis olahan. Kebutuhan kedelai cukup tinggi terbukti pada tahun 2014 produksi kedelai di Indonesia mencapai 954 997 ton dan meningkat pada tahun 2015 menjadi 982 967 ton (BPS 2015), tetapi produktivitas kedelai belum memenuhi kebutuhan nasional. Salah satu pembatas produksi kedelai ialah adanya penyakit tanaman termasuk infeksi *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV).

Gejala infeksi CPMMV pada tanaman berbeda-beda bergantung pada jenis dan varietas tanaman (Demski dan Kuhn 1989). CPMMV merupakan penyebab mosaik pada tanaman kacang-kacangan dan mampu menurunkan produksi tanaman kacang tunggak (*Vigna unguiculata*) hingga 10–15% dengan keparahan penyakit mencapai 15–40% (Akin 2003). Secara umum, gejala CPMMV pada beberapa tanaman diantaranya tulang daun memucat (*vein-clearing*), daun mengeriting, daun menggulung, daun belang atau burik, klorosis, mosaik, kerdil, nekrosis dan distorsi pada daun (Almeida *et al.* 2005; Tavasoli *et al.* 2009; Zanardo *et al.* 2014). Gejala khas CPMMV pada tanaman buncis (*Phaseolus vulgaris*) ialah daun belang, malformasi, dan kerdil, sedangkan pada tanaman kacang tunggak gejala khasnya tulang daun menjadi klorosis. Pada tanaman kacang tanah (*Arachis hypogaea*) gejala khas berupa klorotik pada daun dan gejala khas pada tanaman kedelai berupa mosaik pada tulang daun dan mosaik merata pada daun (Iizuka *et al.* 1984; Mukoye *et al.* 2015). Infeksi CPMMV pada kedelai mengakibatkan penurunan bobot biji kering dan biji tidak normal pada varietas Wilis (Akin 2003).

Gejala infeksi CPMMV pada kedelai di lapangan secara spesifik tidak dapat dibedakan dengan gejala mosaik yang disebabkan oleh infeksi virus lainnya. Tersedianya metode deteksi dan identifikasi secara molekuler dengan RT-PCR dan perunutan DNA akan membantu mengetahui identitas virus dengan cepat dan akurat sebagai langkah awal dalam

penentuan strategi pengelolaan virus yang tepat sasaran. Tujuan penelitian ini untuk mendeteksi dan mengidentifikasi CPMMV dari beberapa varietas kedelai secara molekuler.

Kedelai bergejala berupa mosaik, nekrosis, klorosis dan kerdil diambil dari varietas Grobogan asal Kabupaten Bantul, Yogyakarta; varietas Anjasmoro asal Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta; kedelai edamame varietas lokal asal Kabupaten Magelang, Jawa Tengah; dan varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang, Jawa Timur (Gambar 1). Varietas-varietas yang diperoleh merupakan varietas yang biasa ditanam oleh petani setempat. Gejala pada masing-masing varietas hampir sama berupa gejala mosaik pada seluruh permukaan daun. Gejala yang ditemukan diduga disebabkan oleh CPMMV, tetapi perlu diidentifikasi lebih lanjut.

Identifikasi virus dilakukan secara molekuler menggunakan metode RT-PCR dengan tahapan ekstraksi RNA total, sintesis cDNA, amplifikasi dan perunutan DNA. Ekstraksi RNA total menggunakan Kit *Gene Aid Plant Virus RNA* (Geneaid Biotech, New Taipei City, Taiwan) mengikuti protokol yang disediakan produsen kit. RNA total selanjutnya disintesis menjadi cDNA menggunakan kit *Revert Aid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific, Waltham, MA USA) mengikuti protokol pada kit. Sintesis cDNA dilakukan pada mesin PCR *thermocycler* dengan program inkubasi pada suhu 65 °C selama 5 menit, dilanjutkan pada suhu 42 °C selama 60 menit dan diakhiri dengan suhu 70 °C selama 5 menit dan 4 °C (∞). cDNA selanjutnya diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik gen selubung protein CPMMV yang dirancang berdasarkan pada kemiripan sikuen gen selubung protein CPMMV. Adapun primer yang digunakan ialah pasangan primer CPMMV (CP) F(5'-AATTAAGGATCCGAGTTGATTTAAA TAAGT-3') dan CPMMV (CP) R(5'-AAT TAAGAATTCCTTGTGATTGAAATTG CG-3') dengan produk PCR berukuran 820 pb. Amplifikasi DNA menggunakan kit *KAPA Taq Extra Hotstart Readymix PCR* (KAPA biosystem, USA). Program amplifikasi yang



Gambar 1 Kemiripan gejala infeksi *Cowpea mild mottle virus* pada beberapa varietas kedelai berupa mosaik pada seluruh permukaan daun tanaman, klorosis, nekrosis dan kerdil. 1a dan 1b, varietas Grobogan asal dari Kabupaten Bantul; 2a dan 2b, Varietas lokal kedelai Edamame asal Kabupaten Magelang, 3, varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang; 4a dan 4b, varietas Anjasmoro asal Kabupaten Gunung Kidul; 5a dan 5b, varietas lokal kedelai Edamame asal Kabupaten Magelang.

digunakan terdiri atas tahap pre-denaturasi pada suhu 94 °C selama 3 menit, sebanyak 35 siklus pada suhu denaturasi 94 °C selama 30 detik, tahap penempelan primer pada suhu 53 °C selama 25 detik, ekstensi pada suhu 68 °C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 3 menit.

DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1% yang dilarutkan dalam 0.5 × Tris-Borate EDTA (TBE) pada tegangan 50 volt selama 45 menit. Gel agarosa kemudian direndam dalam larutan etidium bromida (EtBr) selama 15 menit, divisualisasi pada UV transluminator dan didokumentasi dengan kamera digital. Selanjutnya DNA dikirim ke First Base Malaysia melalui PT. Genetika Science Jakarta untuk perunut nukleotida. Homologi urutan basa nukleotida dianalisis menggunakan *basic local alignment*

search tool (BLAST) pada situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov), sedangkan pohon filogenetika dibuat dengan program MEGA versi-6 menggunakan 500 kali bootstrap.

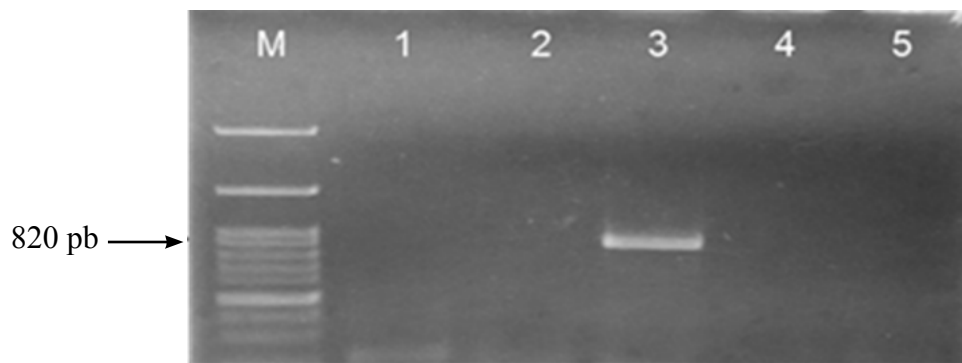
CPMMV hanya dideteksi dari kedelai varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang saja, meskipun gejala yang ditunjukkan oleh semua tanaman uji mirip satu sama lain. DNA spesifik CPMMV diamplifikasi pada 820 pb (Gambar 2). Diagnosis virus berdasarkan gejala tidak dapat menentukan identitas virus sehingga virus yang sama bisa saja menghasilkan gejala yang berbeda atau gejala yang sama dapat juga disebabkan oleh virus yang berbeda (Hull 2002).

Selanjutnya sampel yang positif CPMMV diinokulasi balik pada tanaman kedelai varietas Argomulyo yang sehat. Inokulasi balik CPMMV menghasilkan gejala yang

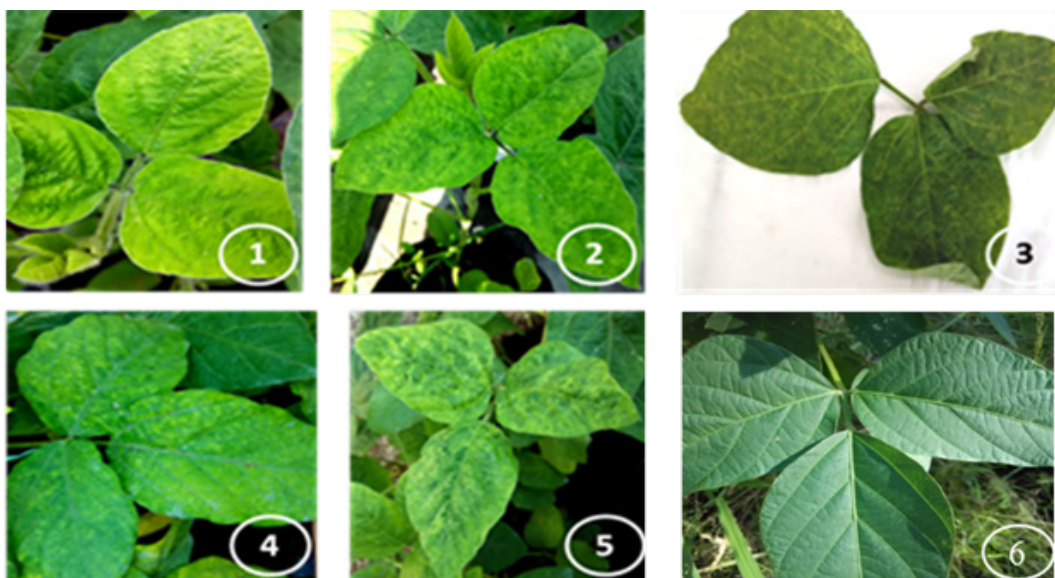
bervariasi (Gambar 3), tetapi CPMMV hanya berhasil dideteksi dari sampel dengan gejala mosaik dan klorosis (Gambar 4). Kemampuan virus menginfeksi tanaman harus memenuhi beberapa syarat, salah satunya ialah adanya respons dari tanaman. Respons tanaman akan memunculkan gejala khas yang merupakan efek adanya infeksi virus terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman kedelai, seperti terganggunya fungsi fisiologi,

sehingga terjadi perubahan atau penyimpangan fungsi organ tanaman.

Analisis filogenetika berdasarkan sikuen nukleotida gen selubung protein menunjukkan bahwa CPMMV dari kedelai varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang berada pada kelompok yang sama dengan CPPMV dari negara lain dengan homologi mencapai 99% dengan isolat CPMMV kacang buncis asal Cina. CPMMV isolat Malang



Gambar 2 Pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) dari gejala CPMMV pada beberapa varietas kedelai. 1, Varietas Grobogan asal Kabupaten Bantul; 2 dan 5, Varietas lokal kedelai Eamame asal Kabupaten Magelang; 3, Varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang; 4, Varietas Anjasmoro asal Kabupaten Gunung Kidul dan; M, Penanda DNA 0.1 kb (Thermo Scientific).



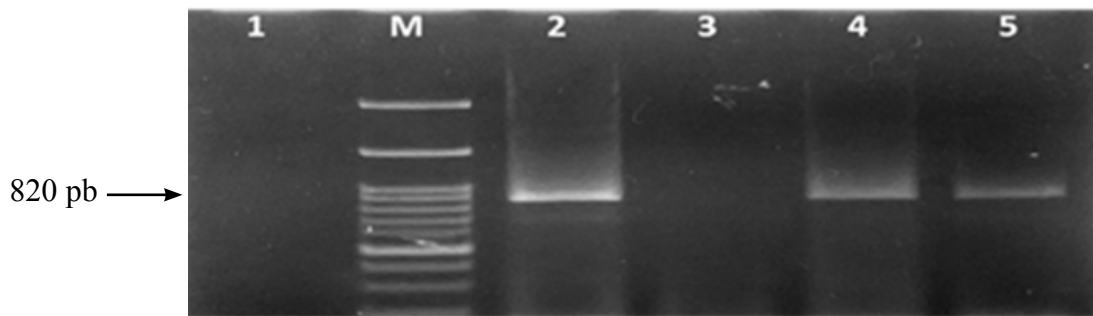
Gambar 3 Gejala infeksi *Cowpea mild mottle virus* pada varietas Argomulyo. 1, Gejala mosaik sepanjang tulang daun dan *vein-clearing* pada sebagian daun; 2, Gejala mosaik yang merata pada seluruh permukaan daun diikuti dengan transparan pada daun saat ada pencahayaan; 3, Gejala klorosis pada seluruh daun sehingga warna daun sebagian besar menjadi lebih gelap; 4, Gejala nekrosis fase awal pada sebagian permukaan daun kedelai dan; 5, Gejala tanaman menjadi kerdil dengan daun sebagian keriting dan menggulung ke bawah dan; 6, Daun sehat.

menunjukkan kemiripan dengan CPMMV asal Cina dan India sedangkan dengan isolat dari Amerika membentuk kelompok terpisah (Gambar 5). Infeksi CPMMV merupakan tipe gejala sistemik, yaitu infeksi virus yang sudah menyebar pada seluruh tanaman. Variasi gejala pada beberapa sampel yang positif teridentifikasi CPMMV dapat menjadi acuan untuk mengetahui gejala khas infeksi CPMMV pada tanaman kedelai varietas Argomulyo. Homologi isolat CPMMV yang diuji dengan isolat CPMMV asal negara lain menunjukkan kemiripan mencapai 98.9% (Gambar 5).

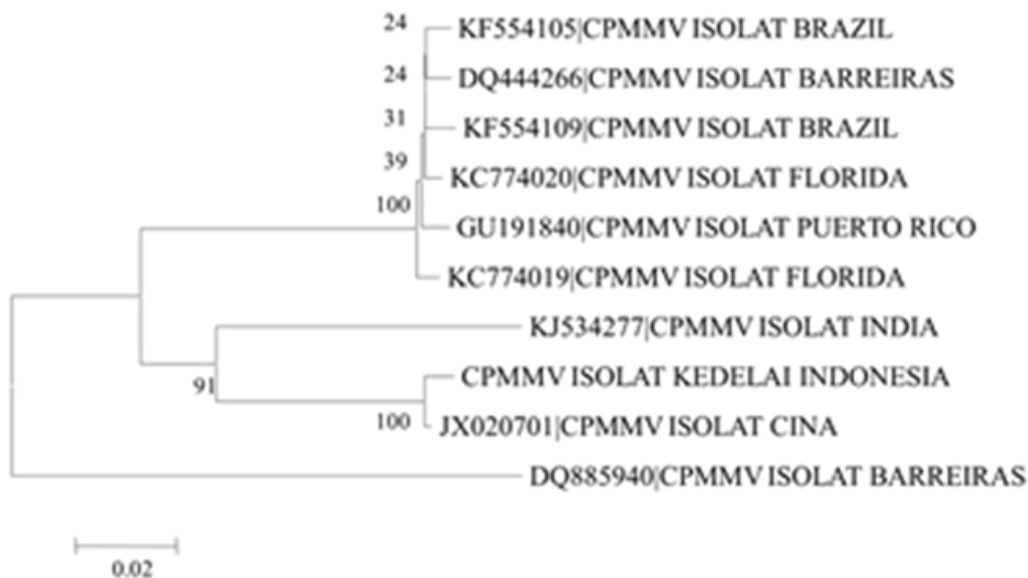
Kedelai varietas Agromulyo merupakan varietas asal Thailand yang dirakit oleh PT.

Nestle Indonesia pada tahun 1988 dengan nama asal Nakhon Sawan I. Kedelai tersebut berbiji besar, daun oval, dan memiliki kandungan protein sebesar 39.5%. Kandungan protein yang tinggi memudahkan multiplikasi virus.

Faktor ketahanan pada varietas lainnya berpengaruh terhadap beberapa karakter morfologi, anatomi dan agronomi varietas kedelai lainnya. Faktor yang sangat berperan dalam epidemi CPMMV pada berbagai varietas tanaman, yaitu adanya peran serangga vektor kutukebul (*Tavasoli et al.* 2009). Populasi kutukebul yang tinggi akan memengaruhi tinggi rendahnya keparahan penyakit akibat infeksi CPMMV pada beberapa varietas



Gambar 4 Pita DNA hasil amplifikasi dengan primer spesifik *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) dari berbagai gejala CPMMV pada tanaman kedelai varietas Argomulyo bergejala; 1, Kerdil; 2, Mosaik sepanjang tulang daun; 3, Nekrosis pada sebagian permukaan daun; 4, Mosaik merata pada seluruh permukaan daun; 5, Klorosis pada seluruh permukaan daun dan; M, Penanda DNA 100 pb (Thermo Scientific).



Gambar 5 Pohon filogenetika *Cowpea mild mottle virus* yang menginfeksi kedelai varietas Argomulyo asal Kabupaten Malang Indonesia. Pohon filogenetika dibuat dengan perangkat lunak MEGA versi-6.

tanaman kedelai. Kedelai varietas Argomulyo termasuk rentan terhadap serangan kutukebul (Marwoto 2014).

Faktor lain yang menyebabkan varietas kedelai lainnya tidak terinfeksi CPMMV ialah ketahanan inang. Pengaruh ketahanan inang dapat menyebabkan adanya stimulasi pertahanan seluler inang di daerah terjadinya inisiasi infeksi (Hull 2002). Perubahan pada sikuen nukleotida genom virus akan memengaruhi pada jenis kisaran inangnya (Wahyuni 2005). Tanaman tidak terinfeksi oleh virus dapat terjadi karena beberapa faktor, yaitu bergantung pada galur virus, varietas tanaman, dan faktor lingkungan (Matthews 1993). Hasil metabolisme tanaman berupa enzim atau protein juga mampu menghambat perkembangan virus terutama zat penghambat pertumbuhan yang terdapat pada tanaman inang, sehingga tanaman menjadi resisten (Mujoko *et al.* 2000).

Berdasarkan hasil tersebut di atas, CPMMV pada kedelai varietas Argomulyo asal Malang memiliki gejala yang khas, yaitu mosaik, mosaik disertai dengan *vein-clearing* dan klorosis. Isolat CPMMV asal Malang (Indonesia) memiliki kekerabatan lebih dekat dengan isolat dari Negara Cina berdasarkan pada peruntukan gen selubung protein.

DAFTAR PUSTAKA

- Akin HM. 2003. Respon bebera pagenotipe kedelai terhadap infeksi CPMMV (*Cowpea mild mottle virus*). J HPT Tropika. 3(2):40–43.
- Almeida AMR, Piuga FF, Marin SRR, Kitajima EW, Gaspar JO, Oliveira TG, Moraes TG. 2005. Detection and partial characterization of a *carlavirus* causing stem necrosis of soybean in Brazil. Fitopatol Bras. 30(2):191–194. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-41582005000200016>.
- [BPS] Badan Pusat Statistika. 2015. Produksi kedelai menurut provinsi (ton) 1993–2015. BPS [Online]. www.bps.go.id. [diakses tanggal 1 Des 2015].
- Demski JW, Kuhn CW. 1989. *Cowpea mild mottle virus*. Di dalam *Compendium Of Soybean Diseases*. Ed ke-3. St. Paul (US): APS.
- Hull R. 2002. *Matthew Plant Virology*. Ed ke-4. Tokyo (JP): Academic Press.
- Iizuka N, Rajeshwari R, Reddy DVR, Goto T, Muniyappa V, Bharathan N, Ghanekar AM. 1984. Natural occurrence of a strain of *Cowpea mild mottle virus* on Groundnut (*Arachis hypogea*) in India. J Phytopathol Zeitschrift. 109(3):245–253. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb00714.x>.
- Marwoto. 2014. Waspada serangan *bemisia tabaci* pada kedelai musim kemarau 2014. Seminar hasil penelitian tanaman pangan. Malang (ID): Balai Penelitian Tanaman kacang-kacangan dan Umbi-umbian
- Matthews REF. 1993. *Diagnosis of Plant Virus Disease*. Florida (US):CRC Press.
- Mujoko T, Suryawinarsih P, Laksono, RJ. 2000. Pengaruh waktu inokulasi *Peanut stripe virus* (PSTV) terhadap produksi beberapa varietas tanaman kedelai (*Glycine max L*). Mapeta. 2(5):10–14
- Mukoye B, Mangeni BC, Leitich RK, Wosula DW, Omayio DO, Nyamwamu PA, Arinaitme W, Winter S, Abang MM, Were HK. 2015. First report and biological characterization of *Cowpea mild mottle virus* (CPMMV) infecting groundnuts in Western Kenya. J Agri Food App Sci. 3(1):1–5.
- [NCBI] National Center for Biotechnology Information. 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. [Diakses 20 November 2015]
- Tavasoli M, Shahraeen N, Ghorbani SH. 2009. Serological and RT-PCR detection of *Cowpea mild mottle carlavirus* infecting soybean. J Gen Mol Virol. 1(1):7–11.
- Wahyuni WS. 2005. *Dasar-Dasar Virologi Tumbuhan*. Yogyakarta (ID): Gadjah Mada University Press.
- Zanardo LG, Silvia FN, Lima ATM, Milanese DF, Castilho U, Almeida AMR, Zerbini FM, Carvalho CM. 2014. Molecular variability of *Cowpea mild mottle virus* infecting soybean in Brazil. Arch Virol. 159(4):727–737. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1879-0>.