

Deteksi dan identifikasi virus-virus yang menginfeksi bawang merah di Kabupaten Bantul, Yogyakarta

Detection and identification of viruses infecting onion crops in Bantul District, Yogyakarta

FLORENTINA SEKAR PRIMA SWARI^{1,2*}, SITI SUBANDIYAH², SEDYO HARTONO²

¹Badan Pelaksana Penyuluhan Ketahanan Pangan (BPPKP) Kabupaten Purbalingga, Jawa Tengah

²Program Studi Fitopatologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora Bulaksumur Sleman 55281, Yogyakarta. *email: fsprima@gmail.com

²Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora Bulaksumur Sleman 55281, Yogyakarta.

Manuskrip diterima: 24 April 2015. Revisi disetujui: 30 Mei 2015.

Abstrak. Swari FSP, Subandiyah S, Hartono S. 2015. Deteksi dan identifikasi virus-virus yang menginfeksi bawang merah di Kabupaten Bantul, Yogyakarta. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1*: 961-968. Bawang merah merupakan komoditas hortikultura yang bernilai penting sebagai bahan makanan, bumbu pokok, penyedap alami, maupun obat herbal bagi masyarakat Indonesia. Ketidakseimbangan antara jumlah kebutuhan dan produksi bawang merah kerap menyebabkan kelangkaan pasokan dan fluktuasi harga. Selama ini petani cenderung menganggap bahwa rendahnya produktivitas bawang merah dipengaruhi oleh tingginya serangan ulat, jamur, ataupun bakteri. Penurunan mutu dan jumlah panen akibat infeksi virus belum mendapat perhatian yang cukup, khususnya di Kabupaten Bantul sebagai penghasil utama bawang merah di Daerah Istimewa Yogyakarta. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat infeksi *Potyvirus*, *Carlavirus*, dan *Allexivirus* pada pertanaman bawang merah di Bantul; serta mengidentifikasi jenis virus yang menginfeksi varietas bawang merah yang ditanam pada musim hujan dan kemarau tahun 2014. Pengujian secara molekuler di Laboratorium Klinik Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta, dilakukan terhadap 10 komposit sampel daun bawang merah yang diambil secara acak dari 10 lahan di Kecamatan Kretek, Sanden, Imogiri, dan Jetis, Kabupaten Bantul. Varietas Biru, Crok, Tiron, Bauji, dan lokal Parangkusumo yang diambil sebagai sampel, positif terinfeksi *Carlavirus* dan *Potyvirus*. Varietas Crok paling rentan, sedangkan Biru relatif toleran terhadap infeksi virus. *Allexivirus* ditemukan hanya menginfeksi varietas lokal Parangkusumo pada musim kemarau dengan rerata infeksi yang sangat rendah, 2%. *Carlavirus* lebih dominan daripada *Allexivirus* dan *Potyvirus*. Tingkat infeksi *Carlavirus* dan *Potyvirus* pada musim hujan, 78% dan 62%, lebih tinggi daripada saat kemarau, yaitu 60% dan 46%. Berdasarkan hasil peruntutan nukleotida serta analisis filogenetik, isolat virus yang ditemukan di Bantul teridentifikasi sebagai *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) dan *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) anggota genus *Potyvirus*, serta *Shallot latent virus* (SLV) dari genus *Carlavirus*.

Kata kunci: *Allexivirus*, Bantul, bawang merah, *Carlavirus*, *Potyvirus*

Abstract. Swari FSP, Subandiyah S, Hartono S. 2015. Detection and identification of viruses infecting shallot crops in Bantul District, Yogyakarta. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1*: 961-968. Onion (*Allium cepa* var. *aggregatum*) is a horticultural commodity having important values for Indonesian people like fresh food, seasoning, natural flavoring, and herbal medicine. It is commonly seen that the increasing demand for onion has not been balanced with production, which is often lead to supply shortage and price fluctuation in the market. So far farmers assume that low productivity of onion is caused by severe attacks of armyworms, fungi, or bacteria. As a result, the reduction of quality and yield of shallot due to viral infection has not received sufficient attention, especially in Bantul which is the major shallot production area in the special region of Yogyakarta. The aims of this study were to determine the infection rate of *Potyvirus*, *Carlavirus*, and *Allexivirus* in shallot crops in Bantul and to identify viruses infecting shallot cultivars which are planted in wet and dry seasons in 2014. The molecular assessment was executed on 100 shallot leaf sample at Clinical Laboratory of Plant Disease, Faculty of Agriculture, Gadjah Mada University, Yogyakarta. Leaf samples were collected randomly from 10 fields in Kretek, Sanden, Imogiri, and Jetis, four districts of Bantul Regency. The results showed that the samples of Biru, Crok, Tiron, Bauji, and local Parangkusumo cultivars were infected with *Carlavirus* and *Potyvirus*. Crok was the most susceptible cultivar, while Biru was relatively tolerant to viral infection. Infection of *Allexivirus* was only found in local Parangkusumo cultivar in the dry season with the lowest rate of infection, 2%. *Carlavirus* was more dominant than *Allexivirus* and *Potyvirus*. The infection rate of *Carlavirus* and *Potyvirus* in the wet season, 78% and 62% respectively, which is higher than dry season, 60% and 46%. Based on the results of nucleotide sequencing and phylogenetic analysis, detected virus isolates in Bantul were *Shallot Yellow Stripe Virus* (SYSV) and *Onion Yellow Dwarf Virus* (OYDV), under the genus of *Potyvirus*, and *Shallot latent virus* (SLV), under the genus of *Carlavirus*.

Keywords: *Allexivirus*, Bantul, *Carlavirus*, *Potyvirus*

PENDAHULUAN

Bawang merah merupakan komoditas hortikultura yang bernilai penting sebagai bahan makanan, bumbu pokok, penyedap alami, maupun obat herbal bagi masyarakat Indonesia. Kebutuhan bawang merah penduduk di Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY) sebanyak 10 ribu ton per tahun (Ridarineni 2013). Menurut data Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura Kementerian Pertanian Republik Indonesia (2013), jumlah produksi bawang merah di DIY berfluktuasi selama lima tahun terakhir, yaitu 19.763 ton (2009), 19.950 ton (2010), 14.407 ton (2011), 11.855 ton (2012), dan 8.519 ton (2013). Meskipun penurunan produksi terjadi hingga tahun 2012, dampaknya kurang dirasakan sebab surplus produksi masih dapat dicapai.

Dampak penurunan produksi bawang merah di DIY baru dirasakan pada tahun 2013. Bawang merah menjadi langka di pasaran dan harganya berfluktuasi dalam kisaran Rp15.083,00–Rp40.922,00 (Kementerian Perdagangan RI, 2013). Selama ini petani cenderung menganggap bahwa penurunan produksi bawang merah disebabkan oleh cuaca yang kurang baik, ledakan hama ulat daun, serta serangan jamur dan bakteri. Penurunan mutu dan jumlah panen akibat infeksi virus belum mendapat perhatian yang cukup, khususnya di Kabupaten Bantul sebagai penghasil utama bawang merah di Daerah Istimewa Yogyakarta. Kehilangan hasil bawang merah akibat infeksi virus belum pernah dihitung secara rinci, tetapi hasil penelitian pada bawang putih menunjukkan bahwa umbi dari tanaman yang bebas virus ternyata lebih berat 32–216% daripada umbi tanaman yang terinfeksi virus (Perroto et al. 2010).

Infeksi virus pada bawang merah menyebabkan penurunan berat umbi sehingga jumlah produksi lebih rendah daripada potensi hasil. Karena infeksi bersifat sistemik, virus yang sudah berada di dalam umbi menjadi sulit dikendalikan serta dapat membawa masalah baru pada pertanaman berikutnya (Gunaeni et al. 2011). Arisuryanti et al. (2008) telah membuktikan bahwa bibit bawang merah kultivar Phillipine Bima dari Desa Srigading, Kecamatan Sanden, Kabupaten Bantul, DIY positif terinfeksi *Onion yellow dwarf virus* (OYDV). *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) juga terdeteksi pada umbi bawang merah varietas Jawa dan Brebes yang diambil dari Kabupaten Bantul (Kurniawan dan Suastika 2013).

Para petani bawang merah di Kabupaten Bantul masih sangat awam mengenai virus. Mereka belum memiliki pengetahuan, sikap, dan keterampilan yang cukup untuk menghadapi infeksi virus. Para petani perlu mendapatkan informasi yang memadai tentang virus sehingga patogen ini dapat dikenali agar para petani tidak sampai merugi. Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat infeksi *Potyvirus*, *Carlavirus*, dan *Allexivirus* pada pertanaman bawang merah di Bantul; serta mengidentifikasi jenis virus yang menginfeksi varietas bawang merah yang ditanam pada musim hujan dan kemarau tahun 2014.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel

Sampel daun bawang merah diambil dari 10 lahan pertanaman bawang merah yang tersebar di Kabupaten Bantul pada bulan Februari 2014 dan Oktober 2014, saat musim hujan dan kemarau. Sampel musim hujan diambil dari empat lahan di Kecamatan Kretek yang masing-masing ditanami dengan varietas Biru (2 lahan), Tiron (1 lahan), dan Crok (1 lahan), serta satu lahan varietas Biru di Kecamatan Sanden. Sampel musim kemarau diambil dari dua lahan varietas Biru di Kecamatan Sanden, satu lahan varietas Bauji di Kecamatan Imogiri, satu lahan varietas Crok di Kecamatan Kretek, dan satu lahan varietas lokal Parangkusumo di Kecamatan Jetis.

Setiap lahan tempat pengambilan sampel dibagi menjadi 10 blok yang masing-masing terdiri atas 10 rumpun tanaman bawang merah. Sampel daun bawang merah diambil secara acak tanpa memperhatikan kenampakan gejala tanaman yang terinfeksi virus. Satu helai daun yang setingkat lebih tua daripada daun termuda, dipetik dari satu rumpun tanaman sehingga 10 helai daun diperoleh dari satu blok tanaman. Sampel daun dimasukkan ke dalam amplop, diberi keterangan, kemudian disimpan sementara dalam kotak pendingin sebelum dibawa ke laboratorium.

Di Laboratorium Klinik Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, sampel daun bawang merah dibersihkan dengan kertas tisu. Setiap helai daun digunting menjadi potongan-potongan kecil sepanjang 0,5 cm. Potongan daun ini kemudian dimasukkan ke dalam tabung plastik dan disimpan pada lemari pendingin bersuhu -20°C. Komposit sampel dibuat untuk setiap blok, terdiri atas 10 potongan sampel daun bawang merah, sehingga dari 100 sampel daun diperoleh 10 komposit sampel yang mewakili satu lahan. Secara keseluruhan, 100 komposit sampel didapatkan dari 1.000 sampel daun bawang merah yang diambil dari 10 lahan.

Ekstraksi RNA dan sintesis cDNA

Ribonucleic acid (RNA) virus diekstraksi dari 100 mg komposit sampel jaringan daun segar dengan menggunakan *Plant Virus RNA Extraction Kit* (Geneaid) menurut protokol yang tersedia. Ekstrak RNA virus kemudian dipakai sebagai cetakan pada *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) yang menggunakan *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Campuran komponen RT-PCR terdiri atas 4 µL *5X Reaction Buffer*, 2 µL 10 mM *dNTP Mix*, 1 µL primer Poty, 1 µL *RiboLock RNase Inhibitor*, 1 µL *RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase*, 10 µL *nuclease-free water*, dan 1 µL RNA sampel. Reaksi dijalankan pada *Teche Thermocycler* dengan suhu dan durasi sebagai berikut: 65°C (5 menit), 42°C (60 menit), 70°C (5 menit), dan 4°C (∞).

Amplifikasi DNA

Hasil RT-PCR berupa cDNA virus diperbanyak dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Campuran komponen

PCR terdiri atas 12 μL *DreamTaq Green PCR Master Mix* (2X) (Thermo Scientific), 4 μL *nuclease-free water*, 1 μL *reverse primer* 10 μM (primer Poty1), 1 μL *forward primer* 10 μM (primer pCV3t/AlcarF/U341), dan 1 μL cDNA sampel. Primer Poty1 (IDT) merupakan basa nukleotida dengan susunan 5'-GGA TTC CGG GTT TTT TTT TTT TTT TTT V-3' (Gibbs dan MacKenzie, 1997). Adapun susunan *forward primer* berbeda sesuai dengan sekuens target virus. Primer pGV3t (Sigma) untuk *Allexivirus* memiliki susunan 5'-TGG NCN TGC TAC CAC AAN GG-3' (Chen *et al.*, 2001). Primer AlcarF (Sigma) dengan susunan 5'-TGC TGC YTT TGA TAC YTT CGA T-3' (Gambley, 2012) digunakan untuk *Carlavirus*, sedangkan primer U341 (Sigma) untuk *Potyvirus* mempunyai susunan 5'-CCG GAA TTC ATG RTI TGG TGY ATI GAI AAY GG-3' (Langeveld *et al.*, 1991). Selanjutnya, campuran diinkubasi dalam *Teche Thermocycler* dengan pengaturan reaksi yang meliputi satu siklus denaturasi awal pada suhu 94°C selama 3 menit, 30 rangkaian siklus (denaturasi: 94°C, 45 detik; penempelan primer: 56°C, 60 detik; pemanjangan: 72°C, 90 detik), dan satu siklus terakhir (72°C, 6 menit).

Elektroforesis gel agarosa

Gel agarosa 1,5% dibuat dengan cara melarutkan 0,45 gram serbuk agarosa ke dalam 30 mL bufer TBE (*Tris-Borate-EDTA*) 1x melalui pemanasan pada oven gelombang mikro. Larutan yang tampak jernih sesudah agarosa larut sempurna itu didinginkan hingga mencapai suhu 50°C, kemudian dituang ke dalam cetakan gel dengan sisir elektroforesis yang sudah terpasang. Setelah gel memadat, sisir elektroforesis dilepaskan agar sumuran terbuka. Masing-masing produk PCR sebanyak 10 μL , 4 μL kontrol positif, dan 10 μL marka 100 bp *DNA Ladder* (Microzone) dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa secara berurutan. Elektroforesis dengan TBE 1x sebagai *running buffer* dalam perangkat (Advance MupidExu) dijalankan pada tegangan 50 volt selama 50 menit. Sesuai elektroforesis, gel agarosa direndam dalam larutan etidium bromida selama 20 menit. Pola migrasi DNA dalam bentuk pita (*band*) yang berpendar selanjutnya diamati dengan transiluminator ultraviolet (Bio-Rad). *Allexivirus* terdeteksi jika tampak pita DNA yang berukuran 950 bp, sementara fragmen DNA *Carlavirus* yang teramplifikasi berukuran 715 bp dan *Potyvirus* berukuran 600–850 bp. Elektroforegram didokumentasikan dengan *Gel Documentation Viewer*.

Perunutan dan analisis sekuens nukleotida

Perunutan nukleotida (*nucleotide sequencing*) dilakukan dengan menggunakan primer AlcarF dan U341 sebagai *sequencing primer*, masing-masing untuk *Carlavirus* dan *Potyvirus*. Produk PCR sebanyak 50 μL dari setiap isolat virus terpilih, dikirimkan ke Laboratorium *First BASE*, Seri Kembangan, Selangor, Malaysia melalui layanan jasa PT Genetika Science Indonesia. Data sekuens nukleotida dari setiap isolat virus selanjutnya dibandingkan dengan data sekuens nukleotida yang terdapat pada basis data NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Program *Nucleotide Basic Local Alignment*

Search Tool (BLAST) dipakai untuk mencari sekuens yang memiliki banyak kemiripan dengan sekuens isolat virus. Tipe strain dari jenis virus tertentu serta nomor akses sekuens nukleotida dikutip dari basis data. Program *ClustalX* versi 2.1 digunakan dalam penyejajaran sejumlah sekuens nukleotida, pembuatan matriks persentase identitas, serta konstruksi pohon filogenetik. Visualisasi pohon filogenetik dilakukan dengan Program *NJPlot* versi 2.3.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deteksi virus

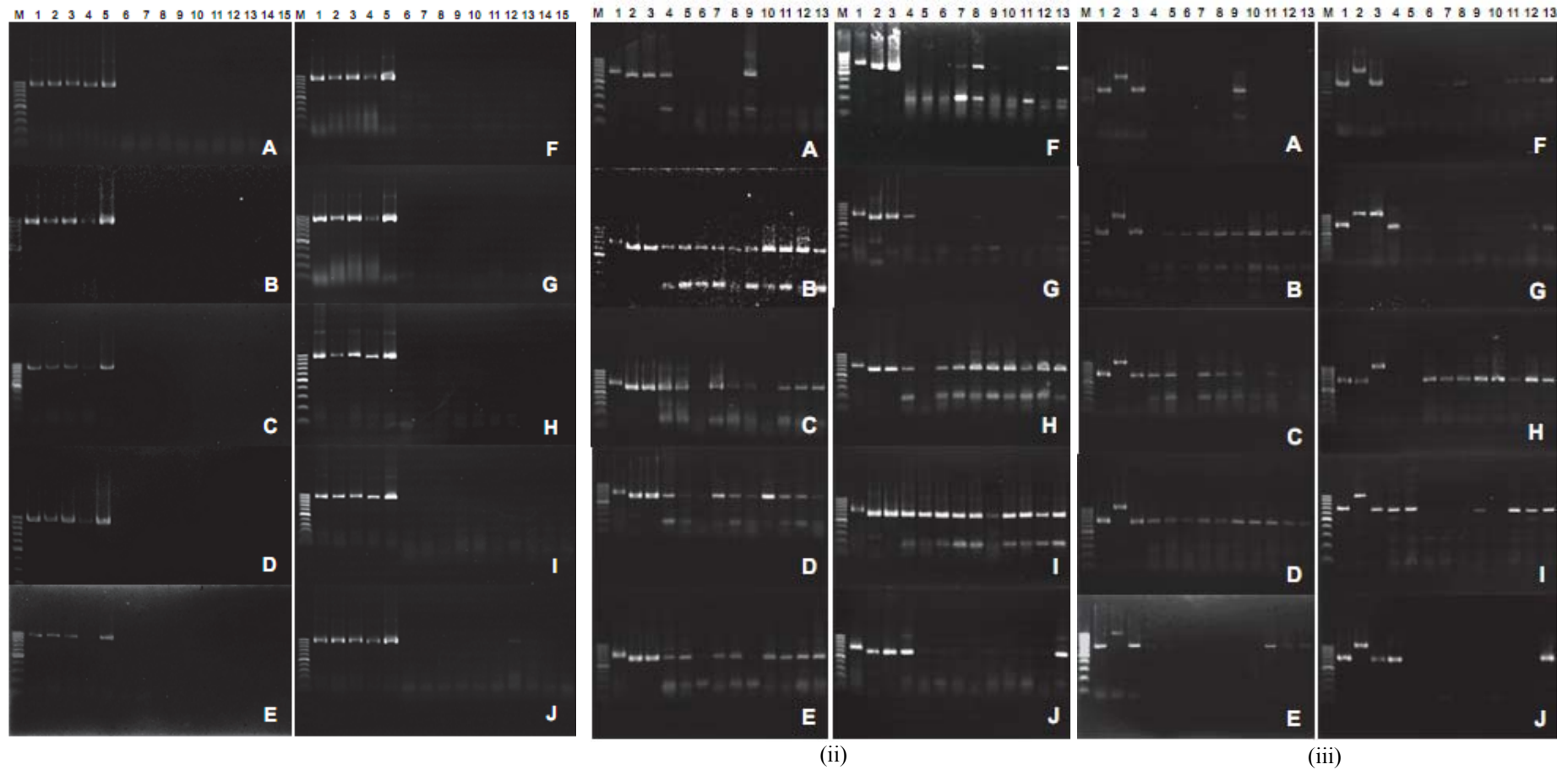
Allexivirus, *Carlavirus*, dan *Potyvirus* terdeteksi pada sampel daun bawang merah dari Bantul dengan beragam tingkat infeksi menurut jenis varietas dan musim tanam. Komposit sampel yang positif terinfeksi *Allexivirus*, *Carlavirus*, dan *Potyvirus* memiliki pita (*band*) DNA yang berpendar seperti tampak pada Gambar 1. Tabel 1 dan 2 menunjukkan tingkat infeksi virus yang dihitung berdasarkan persentase jumlah komposit sampel yang terinfeksi virus dibandingkan dengan jumlah seluruh komposit dari masing-masing lahan pada setiap musim. *Allexivirus* ditemukan hanya menginfeksi varietas lokal Parangkusumo pada musim kemarau dengan rerata infeksi yang sangat rendah, 2%. *Carlavirus* terdeteksi lebih dominan daripada *Potyvirus* dan *Allexivirus*, baik pada musim hujan maupun kemarau. Tingkat infeksi *Carlavirus* dan *Potyvirus* pada musim hujan, 78% dan 62%, lebih tinggi daripada saat kemarau, yaitu 60% dan 46%. Varietas Biru tampak paling toleran terhadap infeksi virus, sedangkan varietas Crok, Tiron, dan Bauji relatif rentan.

Tabel 1. Tingkat infeksi virus patogen bawang merah pada musim hujan tahun 2014

Lahan	<i>Allexivirus</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Potyvirus</i>
A (Biru, Kretek)	0%	20%	10%
B (Tiron, Kretek)	0%	100%	90%
C (Biru, Kretek)	0%	80%	60%
D (Crok, Kretek)	0%	100%	100%
E (Biru, Sanden)	0%	90%	50%
Rerata	0%	78%	62%

Tabel 2. Tingkat infeksi virus patogen bawang merah pada musim kemarau tahun 2014

Lahan	<i>Allexivirus</i>	<i>Carlavirus</i>	<i>Potyvirus</i>
F (Biru, Sanden)	0%	50%	50%
G (Biru, Sanden)	0%	30%	20%
H (Bauji, Imogiri)	0%	100%	80%
I (Crok, Kretek)	0%	100%	60%
J (lokal Parangkusumo, Jetis)	10%	20%	20%
Rerata	2%	60%	46%



Gambar 1. Hasil PCR menggunakan primer universal *Allexivirus* (i), *Carlavirus* (ii), dan *Potyvirus* (iii) terhadap 100 komposit sampel dari lima lahan (A-E) pada musim hujan dan lima lahan (F-J) pada musim kemarau. Lahan A, B, C, D, dan I terletak di Kecamatan Kretek; E, F, G di Kecamatan Sanden; H di Kecamatan Imogiri; dan J di Kecamatan Jetis, Kabupaten Bantul. Varietas bawang merah terdiri atas Biru (A, C, E, F, G), Tiron (B), Crok (D, I), Bauji (H), dan lokal Parangkusumo (J). Lajur M, marka 100 bp DNA Ladder; (i) 1-5, kontrol positif GVA, GVB, GVC, GVX, dan ShVX; 6-15, komposit sampel dari 10 blok pertanaman di setiap lahan; (ii) 1-3, kontrol positif GCLV, GLV, dan SLV; 4-13, komposit sampel; (iii) 1-3, kontrol positif OYDV, LYSV, dan SYSV; 4-13, komposit sampel.

Identifikasi virus

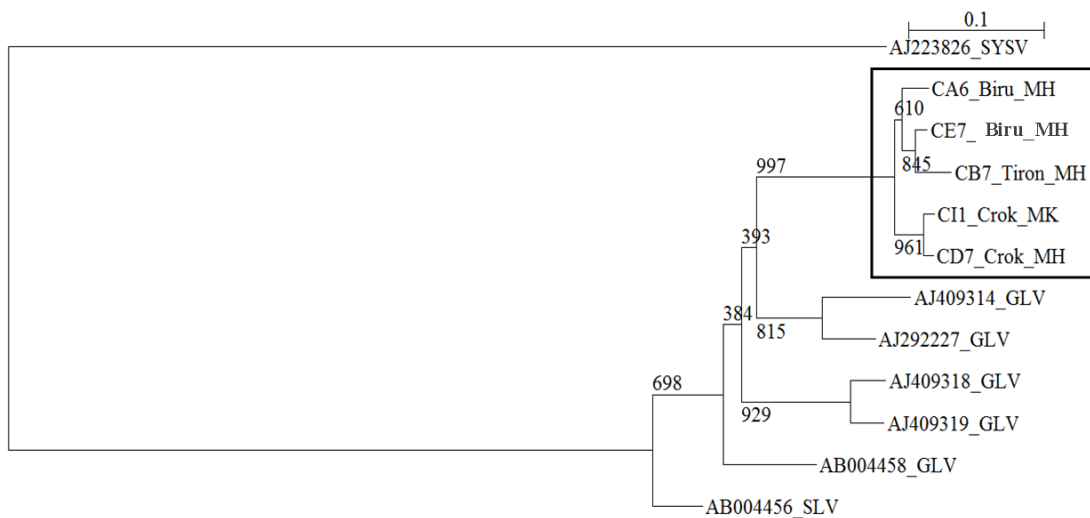
Gambar 1 mengindikasikan pula adanya infeksi campuran *Carlavirus* dan *Potyvirus* pada 53 komposit sampel yang terdiri atas 31 komposit dari musim hujan dan 22 komposit dari musim kemarau. Intensitas infeksi campuran yang tinggi dijumpai pada varietas Crok, Tiron, dan Bauji, sementara infeksi campuran yang relatif rendah terdapat pada varietas Biru dan lokal Parangkusumo. Isolat *Carlavirus* dan *Potyvirus* dari komposit sampel yang mewakili blok A6 (varietas Biru, musim hujan), B7 (Tiron, musim hujan), D7 (Crok, musim hujan), dan I1 (Crok, musim kemarau) dipilih untuk mengungkap jenis virus penyebab infeksi campuran. Identifikasi virus melalui perunutn nukleotida dan analisis filogenetik ini juga dilakukan terhadap isolat *Carlavirus* dari komposit sampel blok E7 (varietas Biru, musim hujan) dan *Potyvirus* dari komposit sampel blok C4 (Biru, musim hujan) dan G1 (Biru, musim kemarau).

Sekuens nukleotida *Carlavirus* A6, B7, D7, I1, dan E7

menunjukkan homologi tertinggi (83%) dengan sekuens GLV dari Tiongkok (Chen et al. 2001) yang memiliki kode aksesinya AJ409314 (ORF1 *partial genomic RNA*, isolat YH2) dan AJ292227 (gen protein TGB2, protein TCB3, protein selubung, dan *nucleic-acid binding protein*, isolat Wuhan). Tabel 3 dan Gambar 2 memperlihatkan persentase identitas dan hubungan kekerabatan isolat *Carlavirus* Bantul dengan isolat lainnya. Adapun Tabel 4 dan Gambar 3 menunjukkan persentase identitas dan hubungan kekerabatan isolat *Potyvirus* Bantul dengan isolat lainnya. Sekuens lima isolat *Potyvirus* dari Bantul, yaitu A6, B7, D7, I1, dan C4 sangat mirip (99%) dengan gen poliprotein *nuclear inclusion body b* WoYSV (AB000842) maupun RNA polimerase dan protein selubung WoYSV (AB000844). Satu isolat, G1, memiliki kemiripan sekuens (96%) dengan gen protein selubung OYDV (AB000473). Berdasarkan hasil identifikasi tersebut, kompleks virus yang dominan menginfeksi pertanaman bawang merah di Bantul terdiri atas GLV dan WoYSV.

Tabel 3. Persentase identitas isolat *Carlavirus*.

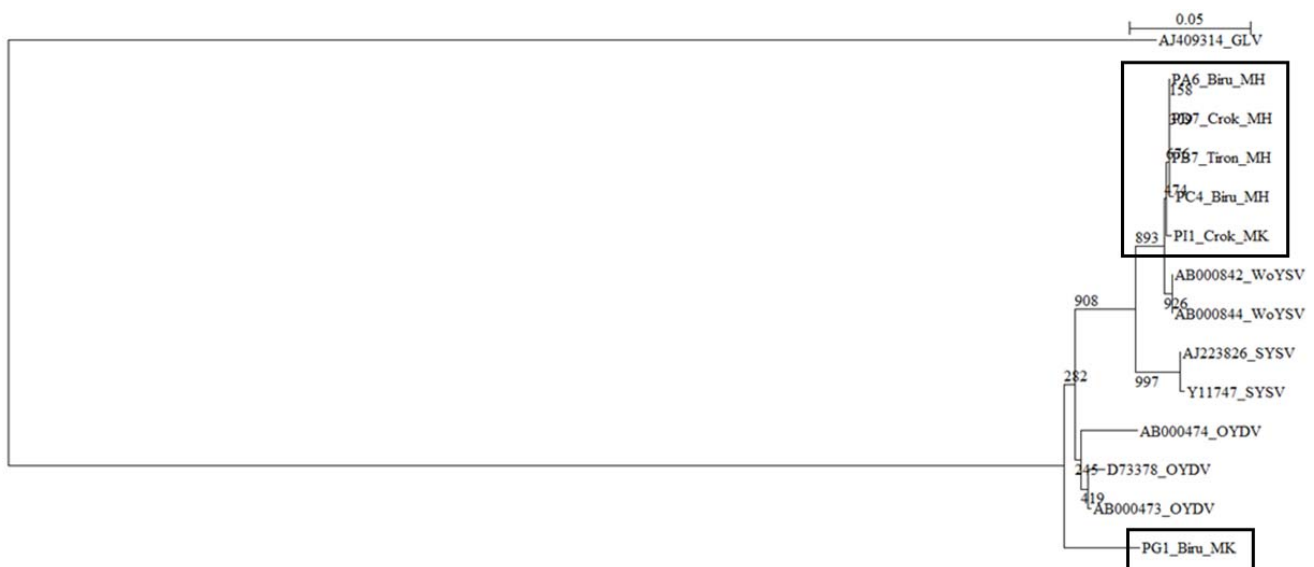
Isolat virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 CB7_Tiron_MH	100											
2 CE7_Biru_MH	97	100										
3 CA6_Biru_MH	95	97	100									
4 CD7_Crok_MH	94	96	95	100								
5 CI1_Crok_MK	93	96	95	99	100							
6 AJ292227_GLV	81	83	83	82	82	100						
7 AJ409314_GLV	79	80	81	80	81	82	100					
8 AJ409319_GLV	80	81	80	80	81	77	79	100				
9 AJ409318_GLV	80	80	79	79	79	77	80	94	100			
10 AB004456_SLV	80	81	81	80	80	76	75	76	75	100		
11 AB004458_GLV	81	81	81	80	81	75	75	77	76	80	100	
12 AJ223826_SYSV	39	39	40	39	39	37	38	38	38	39	39	100



Gambar 2. Pohon filogenetik dari 11 isolat *Carlavirus*, termasuk lima isolat dari Bantul (dalam kotak). Sekuens pembandingan beserta kode aksesinya: GLV, *Garlic latent virus* AJ409314, AJ292227, AJ409318, AJ409319, AB004458; SLV, *Shallot latent virus* AB004456 dari genus *Carlavirus*; dan SYSV, *Shallot yellow stripe virus* AJ223826 (genus *Potyvirus*) sebagai pembandingan dari luar kelompok (*outgroup genus*). Angka yang terletak pada percabangan pohon mengindikasikan nilai *bootstrap* dari 1.000 kali ulangan. Bar skala menunjukkan 0,1% substitusi per situs asam amino.

Tabel 4. Persentase identitas isolat *Potyvirus*.

Isolat virus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 AB000473_OYDV	100													
2 D73378_OYDV	98	100												
3 AB000474_OYDV	94	94	100											
4 AB000844_WoYSV	90	84	88	100										
5 AB000842_WoYSV	90	89	88	100	100									
6 Y11747_SYSV	91	91	90	96	96	100								
7 AJ223826_SYSV	90	89	89	95	95	100	100							
8 PB7_Tiron_MH	95	95	94	100	100	97	97	100						
9 P11_Crok_MK	95	94	93	99	99	97	97	99	100					
10 PD7_Crok_MH	95	95	94	100	100	97	97	100	100	100				
11 PC4_Biru_MH	95	95	94	99	99	97	97	100	99	100	100			
12 PA6_Biru_MH	95	95	94	100	100	97	97	100	99	100	100	100		
13 PG1_Biru_MK	96	95	95	93	93	93	93	93	93	93	93	93	100	
14 AJ409314_GLV	41	37	41	38	40	41	40	45	45	45	45	45	46	100



Gambar 3. Pohon filogenetik dari 13 isolat *Potyvirus*, termasuk enam isolat dari Bantul (dalam kotak). Sekuens pembandingan beserta kode aksesinya: WoYSV, *Welsh-onion yellow stripe virus* AB000842 dan AB000844; SYSV, *Shallot yellow stripe virus* AJ223826 dan Y11747; OYDV, *Onion yellow dwarf virus* AB 000473, AB000474, dan D73378 dari genus *Potyvirus*; serta GLV, *Garlic latent virus* AJ409314 (genus *Carlavirus*) sebagai pembandingan dari luar kelompok (*outgroup genus*). Angka yang terletak pada percabangan pohon mengindikasikan nilai *bootstrap* dari 1.000 kali ulangan. Bar skala menunjukkan 0,1% substitusi per situs asam amino.

Pembahasan

Karakteristik molekuler seperti sekuens genom virus, organisasi genom, dan urutan asam amino dari protein selubung virus sangat berguna untuk membedakan strain virus dan menentukan hubungan antara genus, spesies, dan subspecies dari virus-virus yang berbeda (Tsuneyoshi et al. 1997). Data runutan nukleotida virus yang terkumpul dengan cepat telah membuka peluang pengembangan metode identifikasi virus berdasarkan reaksi berantai polimerase (*Polymerase Chain Reaction/PCR*). Kesamaan organisasi genom serta kelestarian beberapa bagian genom dari berbagai jenis virus dalam suatu genus telah mendorong pengembangan primer universal untuk mendeteksi virus dari bagian tanaman yang terinfeksi. Pada

penelitian ini tiga pasangan primer universal, yaitu Poty1 dan pGV-3t, Poty1 dan AlcarF, serta Poty1 dan U341 terbukti dapat mengamplifikasi fragmen virus dalam genus *Allexivirus*, *Carlavirus*, dan *Potyvirus*.

Primer universal U341 tampak lebih efektif dan efisien daripada AlcarF dalam perunutan nukleotida (*sequencing*) guna identifikasi isolat virus. Hasil penelitian ini mengonfirmasi fungsi ganda primer U341 seperti yang disampaikan oleh Yamamoto dan Fuji (2008), baik sebagai *forward primer* untuk PCR maupun *sequencing primer* bagi banyak virus yang termasuk genus *Potyvirus*. Penggunaan primer U341 mengurangi urgensi sintesis *sequencing primer* secara khusus untuk setiap jenis *Potyvirus*. Aplikasi *direct sequencing* dengan primer

universal U341 untuk identifikasi *Potyvirus* memberikan dua keuntungan. Pertama, tahap kloning produk PCR dapat dihilangkan. Kedua, penentuan sekuens hanya dari satu cetakan sudah cukup karena kesalahan yang muncul selama PCR dapat diatasi dengan banyaknya runutan akurat yang dihasilkan. Sebaliknya jika produk PCR dikloning, *sequencing* harus dilakukan terhadap sejumlah klon.

Hasil deteksi dengan PCR menunjukkan bahwa tingkat infeksi *Carlavirus* pada bawang merah di Bantul lebih tinggi daripada *Potyvirus* maupun *Allexivirus*, tanpa dibatasi oleh jenis varietas, musim, dan lokasi tanam. Kenyataan ini berbeda dengan pandangan umum mengenai *Potyvirus* yang lebih dominan menginfeksi tanaman bawang-bawangan dibandingkan dengan *Carlavirus*. Hal serupa dijumpai di Ceko dan Polandia (Klukáčková et al. 2007; Winiarczyk et al. 2014), infeksi *Potyvirus* pada bawang putih lebih rendah dibanding *Carlavirus*, diduga karena ketahanan varietas terhadap *Potyvirus* dan jumlah vektor yang sedikit. Bibit bawang merah yang terinfeksi virus mungkin menjadi sumber utama *Carlavirus* yang menyerang pertanaman bawang merah di Bantul sebab penularan *Carlavirus* secara nonpersisten oleh kutu daun kurang efisien dibandingkan dengan *Potyvirus*, sementara gulma juga tidak berkontribusi dalam epidemiologi *Carlavirus* (van Dijk 1993).

Kondisi cuaca turut mempengaruhi tingginya infeksi virus pada musim hujan. Data meteorologi dari Stasiun Geofisika Yogyakarta menunjukkan bahwa di sekitar lokasi pengambilan sampel pada bulan Februari 2014, rata-rata suhu udara 26,1°C, kelembaban relatif 87%, curah hujan 152 mm, kecepatan angin 0,7 km/jam, dan lama penyinaran matahari 4,6 jam. Cuaca yang kurang ideal ini meningkatkan kerentanan tanaman bawang merah terhadap infeksi virus. Sebaliknya pada bulan Oktober 2014 saat sampel dari musim kemarau diambil, rata-rata suhu udara 27,5°C, kelembaban relatif 76%, curah hujan 1 mm, kecepatan angin 1,2 km/jam, dan lama penyinaran matahari 8,6 jam. Tanaman bawang merah pada musim kemarau biasanya memang lebih sehat dan kuat mengatasi serangan patogen sehingga hasil produksinya lebih tinggi daripada saat musim hujan.

Pengaruh cuaca terhadap vektor virus belum dapat dievaluasi pada penelitian ini sebab tidak ada vektor yang ditemukan ketika pengambilan sampel dilakukan. Vektor kutu daun mungkin sulit bertahan lama karena terkena insektisida yang banyak disemprotkan oleh petani ataupun tercekam angin berkadar garam tinggi dari Laut Selatan Jawa. Menurut Chen et al. (2004), apapun cara utama penularan virus, perbanyak tanaman secara vegetatif mendorong penyebaran dan akumulasi virus di dalam umbi. Kurniawan dan Suastika (2013) mencatat kejadian *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) pada umbi bawang merah varietas Jawa dan Brebes yang diambil dari Bantul, berturut-turut 60% dan 53,3%. Kebiasaan petani menanam umbi bibit bawang merah yang terinfeksi virus (Gunaeni et al. 2011; Kurniawan dan Suastika 2013) menyebabkan virus terakumulasi, tersebar luas, dan bertahan dari generasi ke generasi selama bertahun-tahun.

Keberadaan *Allexivirus* yang hanya menginfeksi varietas lokal Parangkusumo yang baru ditanam di lokasi

introduksi bawang merah di Kecamatan Jetis semakin menguatkan dugaan bahwa virus ditularkan terutama melalui umbi bibit. Jenis virus dari genus *Allexivirus* ini belum dapat diidentifikasi lebih lanjut karena RNA virus cepat rusak dan sulit diamplifikasi. Hasil penelusuran dengan BLAST menunjukkan kemiripan isolat *Carlavirus* dari Bantul dengan *Garlic latent virus* (GLV) asal Tiongkok. Meskipun demikian, langkah identifikasi isolat perlu ditajamkan dengan merunut sejarah. Berdasarkan serologi, kisaran inang, dan kenampakan gejala, van Dijk (1993) menyimpulkan bahwa GLV merupakan strain dari *Shallot latent virus* (SLV) yang menginfeksi bawang putih (SLV-G). *Partial sequencing* dan analisis filogenetik dari berbagai isolat SLV dan GLV menunjukkan bahwa seluruh strain itu merupakan virus yang sama dalam satu spesies, yaitu SLV (Tsuneyoshi et al. 1998b). Banyaknya variasi sekuens yang teramati di antara strain-strain SLV lebih ditentukan oleh asal geografis, bukan inang alaminya. Oleh karena itu, isolat *Carlavirus* dari Bantul yang semula teridentifikasi sebagai GLV, selanjutnya lebih tepat disebut SLV.

Peninjauan ulang mengenai tatanama juga perlu dilakukan terhadap isolat *Potyvirus* yang teridentifikasi sebagai *Welsh-onion yellow stripe virus* (WoYSV) berdasarkan BLAST. van der Vlugt et al. (1999) telah mengidentifikasi ulang WoYSV sebagai salah satu strain dari *Shallot yellow stripe virus* (SYSV) sehingga WoYSV bersinonim dengan SYSV dan isolat WoYSV dari Bantul sebenarnya merupakan SYSV. Hasil identifikasi ini menegaskan laporan sebelumnya (Arisuryanti et al.; Kurniawan dan Suastika 2013; Hartono dan Natsuaki 1998, data tidak dipublikasikan) yang mengungkap keberadaan OYDV, SYSV, dan SLV sebagai patogen bawang merah di Bantul. Infeksi *Garlic common latent virus* (GCLV), anggota *Carlavirus*, dan *Leek yellow stripe virus* dari genus *Potyvirus* tidak ditemukan dalam penelitian ini. Infeksi campuran antara SYSV dan SLV perlu mendapat perhatian meskipun gejalanya terlihat samar sebab kompleks virus memuncu besarnya kehilangan bobot dan perimeter umbi (Lunello et al. 2007).

Kedekatan hubungan isolat SYSV Bantul dengan WoYSV dari Indonesia (Tsuneyoshi et al. 1998a) menunjukkan bahwa strain SYSV ini mampu bertahan dalam kurun waktu yang lama tanpa mutasi genetik yang ekstrem (99% masih identik). Data awal dari van Dijk dan Sutarya (1992) mengungkap adanya SYSV pada bawang merah di berbagai daerah di Jawa Barat dan Jawa Tengah dengan tingkat infeksi rata-rata 75%. Penyebaran SYSV pada saat itu lebih lambat daripada OYDV, sementara kejadian penyakit akibat WoYSV pada bawang daun (*Allium fistulosum*) masih tampak rendah di banyak daerah. Setelah lebih dari 20 tahun berlalu, WoYSV sebagai salah satu strain SYSV ternyata masih ditemukan di Kabupaten Bantul. Penyebaran SYSV terindikasi semakin cepat dan turun-temurun melalui umbi bibit yang tidak sehat. Virus yang asli berasal dari Asia ini sudah mapan beradaptasi dengan kondisi iklim dan lingkungan Indonesia. Selanjutnya, kita perlu meningkatkan kewaspadaan dan kecakapan menghadapi infeksi virus. Para petani sebaiknya menerapkan seleksi yang ketat untuk memperoleh umbi

bibit yang sehat dan semakin membiasakan pemanfaatan benih bawang merah (*True Shallot Seed/TSS*) sebagai bahan tanam yang bebas virus. Adapun pemerintah perlu menjamin ketersediaan bibit/benih sehat, mendorong penangkaran serta sertifikasi bibit/benih bawang merah, dan mengatur kebijakan komprehensif mengenai bawang merah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. John Thomas dari Queensland Department of Agriculture and Fisheries atas dukungan yang diberikan dalam kolaborasi penelitian ACIAR HORT/2009/056.

DAFTAR PUSTAKA

- Arisuryanti T, Daryono BS, Hartono S, Swastika AAGR. 2008. Observasi dan identifikasi virus yang menginfeksi bawang merah di Jawa. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 14 (2): 55-62.
- Badan Pusat Statistik dan Direktorat Jenderal Hortikultura. 2013. Produksi Bawang Merah Menurut Provinsi, 2009-2013. http://www.pertanian.go.id/ATAP_2013_IP/PR_Bawang_Merah_%28ATAP%29.pdf [18 Juni 2014]
- Chen J, Chen J, dan Adams MJ. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Archives of Virology* 146: 757-766.
- Chen J, Zheng HY, Antoniw JF, Adams MJ, Chen JP, Lin L. 2004. Detection and classification of allxiviruses from garlic in China. *Arch Virol* 149: 435-445. DOI 10.1007/s00705-003-0234-2
- Gambley C. 2012. RT-PCR for shallot and garlic viruses. In: Protocol of ACIAR Project. Queensland.
- Gibbs A, Mackenzie A. 1997. A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J Virol Meth* 63 (1-2): 9-16.
- Gunaeni, N, Wulandari AW, Duriat AS, Muharam A. 2011. Insiden penyakit virus tular umbi pada tigabelas varietas bawang merah asal Jawa Barat dan Jawa Tengah. *Jurnal Hortikultura* 21 (2): 164-172.
- Kementerian Perdagangan RI. 2013. Tinjauan Pasar Bawang Merah. <http://ews.kemendag.go.id> [18 Juni 2014]
- Klukáčková J, Navrátil M, Duchoslav M. 2007. Natural infection of garlic (*Allium sativum* L.) by viruses in the Czech Republic. *J Pl Dis Protect* 114 (3): 97-100.
- Kurniawan A, Suastika G. 2013. Deteksi dan identifikasi virus pada umbi bawang merah. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 9 (2): 47-52.
- Langeveld SA, Dore J, Memelink J, Derks AFLM, van der Vlugt CIM, Asjes CJ, Bol JF. 1991. Identification of potyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers. *J Gen Virol* 72: 1531-1541.
- Lunello P, Di Rienzo J, Conci VC. 2007. Yield loss in garlic caused by *Leek yellow stripe virus* Argentinean isolate. *Plant Dis* 91:153-158.
- Perotto MC, Cafrune EE, Conci VC. 2010. The effect of additional viral infections on garlic plants initially infected with *Allxiviruses*. *European J Pl Pathol* 126:489-495.
- Ridarineni N. 2013. DIY Surplus Produksi Bawang Merah. <http://www.republika.co.id/berita/nasional/daerah/13/03/19/mjvwti-diy-surplus-produksi-bawang-merah> [18 June 2014]
- Tsuneyoshi T, Ikeda Y, Sumi S. 1997. Nucleotide sequences of the 3' terminal region of *Onion yellow dwarf virus* isolates from *Allium* plants in Japan. *Virus Genes* 15 (1): 73-77.
- Tsuneyoshi T, Matsumi T, Natsuaki KT, Sumi S. 1998a. Nucleotide sequence analysis of virus isolates indicates the presence of three *Potyvirus* species in *Allium* plants. *Arch Virol* 143: 97-113.
- Tsuneyoshi T, Matsumi T, Deng TC, Sako I, Sumi S. 1998b. Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Arch Virol* 143: 1093-1107.
- 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.
- van Dijk P, Sutarya R. 1992. Virus diseases of shallot, garlic and Welsh onion in Java, Indonesia, and prospects for their control. *Onion Newslett Trop* 4: 57-61.
- van Dijk P. 1993. Carlavirus isolates from cultivated *Allium* species represent three viruses. *Netherland J Pl Pathol* 99: 233-257.
- Winiarczyk K, Solarz E, Sienkiewicz W. 2014. Prevalence of infections with *Onion yellow dwarf virus*, *Leek yellow stripe virus* and *Garlic common latent virus* in plants from the genus *Allium*. *Hortorum Cultus* 13 (3): 123-133.
- Yamamoto H, Fuji S. 2008. Rapid determination of the nucleotide sequences of potyviral coat protein genes using semi-nested RT-PCR with universal primers. *J Gen Pl Pathol* 74: 97-100.