

IDENTIFIKASI MOLEKULER *BROAD BEAN WILT VIRUS 2 (BBWV2)* DAN *CYMBIDIUM MOSAIC VIRUS (CYMMV)* ASAL TANAMAN NILAM (*POGOSTEMON CABLIN BENTH.*)

Miftakhurohmah¹, Gede Suastika², Tri Asmira Damayanti², & Rita Noveriza¹

¹Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
Jl. Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111

²Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680
E-mail: miftah_tia05@yahoo.co.id

ABSTRACT

Molecular identification Broad Bean Wilt Virus 2 (BBWV2) and Cymbidium Mosaic Virus (CymMV) from patchouli plant (*Pogostemon cablin Benth.*). Several viruses have been reported to be associated with mosaic disease on patchouli plant in Indonesia. This study aims to identify the two viruses in patchouli cultivation in West Java by studying the molecular characterization. Mosaic symptomatic leaf samples taken from patchouli cultivation in Manoko (Bandung Barat District, West Java Province). RNA extraction was performed using Xprep Plant RNA mini kit. RNA amplification with RT-PCR technique using primers for the *cp* gene region of BBWV2 and CymMV. The PCR product was sent to PT. Science Genetics Indonesia to do sequencing, then analyzed nucleotide sequences. Results of RT-PCR were performed successfully obtained DNA bands with size accordance with the predictions of the primer design for BBWV2 and CymMV *cp* region. Further, based on nucleotide and amino acid sequence analyses, the two virus isolates were confirmed as BBWV2 and CymMV respectively. Phylogenetic analyses revealed that BBWV2 Manoko clustered with BBWV2 from Singapore (original host of Brazilian red-cloak), China (pepper) and South Korea (chili). Whereas, CymMV Manoko become one cluster with CymMV from India (*Phaius* sp.), Indonesia (*Dendrobium*), China (vanilla), Thailand (*Oncidium*), Hawaii (*Dendrobium*) and South Korea (*Cymbidium*).

Key words: nucleotide sequence, virus, patchouli, BBWV2, CymMV

ABSTRAK

Identifikasi molekuler Broad Bean Wilt Virus 2 (BBWV2) dan Cymbidium Mosaic Virus (CymMV) asal tanaman nilam (*Pogostemon cablin Benth.*). Beberapa virus dilaporkan berasosiasi dengan penyakit mosaik pada tanaman nilam di Indonesia. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi dua virus pada pertanaman nilam di Jawa Barat dengan mempelajari karakterisasi molekulnya. Sampel daun bergejala mosaik diambil dari pertanaman nilam di Manoko (Kabupaten Bandung Barat, Provinsi Jawa Barat). Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan *Xprep Plant RNA mini kit*. Amplifikasi RNA dengan teknik RT-PCR menggunakan primer untuk daerah gen *cp* BBWV2 dan CymMV. Produk PCR yang dihasilkan dikirimkan ke PT. Genetika Science Indonesia untuk dilakukan peruntukan nukleotida, dan selanjutnya dianalisis runutan nukleotidanya. Hasil RT-PCR yang dilakukan berhasil didapatkan pita DNA dengan ukuran sesuai prediksi dari desain primer untuk bagian *cp* BBWV2 dan CymMV. Berdasarkan analisis runutan nukleotida dan asam amino, dua virus yang ditemukan merupakan BBWV2 dan CymMV. Analisis homologi dan filogenetik menunjukkan bahwa BBWV2 Manoko mengelompok dengan BBWV2 dari Singapura (*Brazilian red-cloak*), Cina (lada) dan Korea Selatan (cabai). Sedangkan CymMV Manoko berada dalam satu kelompok dengan CymMV dari India (*Phaius* sp.), Indonesia (*Dendrobium*), China (vanili), Thailand (*Oncidium*), Hawaii (*Dendrobium*) dan Korea Selatan (*Cymbidium*).

Kata kunci: sekuen nukleotida, virus, nilam, BBWV2, CymMV

PENDAHULUAN

Infeksi virus pada tanaman nilam di Indonesia telah ditemukan sejak tahun 1996 oleh Sumardiyono *et al.* (1996), yang berdasarkan uji serologi dengan antibodi *patchouli mottle virus* (PatMoV), menunjukkan reaksi

positif. Pada pertanaman nilam di Cianjur dan Bogor, ditemukan infeksi campuran antara *cucumber mosaic virus* (CMV) dan genus *Potyvirus* (Sukanto *et al.*, 2007). Gejala mosaik ditemukan pada beberapa pertanaman nilam di Jawa Tengah, Jawa Barat, Sumatera Utara dan Sumatera Barat. Berdasarkan hasil

deteksi dan identifikasi, penyakit berasosiasi dengan *telosma mosaic virus* (TeMV) yang tergolong ke dalam genus *Potyvirus* (Noveriza et al., 2012).

Selain genus *Potyvirus* dan CMV, juga ditemukan infeksi virus lain pada pertanaman nilam di Manoko (Kabupaten Bandung Barat, Provinsi Jawa Barat) yang berdasarkan deteksi secara serologi merupakan BBWV2 dan CymMV. Kedua virus tersebut merupakan virus pada tanaman nilam yang tergolong patogen A1, dalam arti belum pernah ada laporan serangan virus ini pada tanaman di Indonesia (Badan Karantina Pertanian, 2011). Berdasarkan pengamatan, saat ini sebagian besar bibit nilam hasil perbanyak vegetatif sudah terserang virus dengan berbagai gejala sebelum ditanam di lapangan.

Berdasarkan hal tersebut diatas, perlu dilakukan identifikasi lanjut BBWV2 dan CymMV yang menginfeksi pertanaman nilam. Deteksi secara serologi memiliki kelemahan, yaitu tidak bisa membedakan virus yang sekerabat, terutama bila yang digunakan antiserum universal genus. Selain itu, beberapa *antigenic site* dimiliki oleh virus yang tidak sekerabat, sehingga memungkinkan terjadinya reaksi silang (Putnam, 1995). Oleh karena itu, hasil deteksi secara serologi perlu dilanjutkan dengan identifikasi berdasarkan asam nukleat. Hasil identifikasi digunakan sebagai salah satu dasar dalam pengambilan tindakan pengendalian.

Identifikasi berdasarkan asam nukleat dilakukan secara molekuler, dengan teknik *Polymerase chain reaction* (PCR). Untuk diagnosis virus tanaman yang memiliki asam nukleat RNA, RNA target dikonversikan menjadi *complementary DNA* (cDNA) yang dikopi dengan transkripsi balik sebelum PCR dimulai (Naidu & Hughes, 2003).

Dari hasil RT-PCR, selanjutnya dilakukan peruntukan nukleotidanya, yang dapat digunakan untuk mengklasifikasikan virus berdasarkan genomnya. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa analisis runutan nukleotida *coat protein* (*cp*) sangat berguna dalam kegiatan identifikasi BBWV1 dan BBWV2 (Kobayashi et al., 2005; Kondo et al., 2005). Beberapa software telah tersedia untuk mengklasifikasikan virus berdasarkan genomnya, diantaranya BioEdit, MEGA, dan GeneDoc (Tamura et al., 2007; Hall, 1999).

Penelitian bertujuan mengidentifikasi BBWV2 dan CymMV pada tanaman nilam di Jawa Barat dengan mempelajari karakteristik molekularnya.

METODE PENELITIAN

Tempat dan Waktu. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Fakultas Pertanian,

Institut Pertanian Bogor, dari bulan Februari sampai dengan Agustus 2012.

Sumber Virus. Virus diambil dari daun bergejala mosaik pada pertanaman nilam di Kebun Percobaan (KP) Manoko (Kabupaten Bandung Barat). Gejala mosaik yang ditemukan bervariasi, dari mosaik lemah, mosaik kuning hijau, mosaik hijau muda hijau tua, mosaik dengan penebalan dan mosaik dengan perubahan bentuk daun (*malformasi*).

Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Ekstraksi RNA. Ekstraksi RNA dilakukan dengan *Xprep Plant RNA mini kit* (PKT-Philekorea Technology). Bufer XPRB disiapkan dengan menambahkan 1% *mercaptoethanol* (ME). Sampel daun nilam sebanyak 0,1 g digerus menggunakan nitrogen cair pada mortar, sampai menjadi serbuk. Serbuk sampel ditambah bufer XPRB yang telah ditambah ME, dimasukkan ke dalam kolom filter dan disentrifugasi selama dua menit pada kecepatan 13.000 rpm. Supernatan dipindahkan ke tabung *ependorf* baru dan etanol absolut ditambahkan sebanyak 0,5 kali volume supernatan, dan dicampur dengan cara dipipet atau dibolak-balik. Kemudian supernatan dalam alkohol dimasukkan ke dalam kolom XPPLR mini, dan disentrifugasi selama satu menit pada kecepatan 13.000 rpm. Setelah supernatan dibuang, kolom diberi *wash buffer 1* (WB1) sebanyak 500 µl, disentrifugasi selama satu menit, dan supernatan dibuang. *Wash buffer 2* (WB2) sebanyak 750 µl ditambahkan ke dalam kolom, disentrifugasi selama satu menit, dan supernatan dibuang. Selanjutnya, untuk mengeringkan kolom, dilakukan sentrifugasi kolom selama tiga menit pada kecepatan 13.000 rpm. RNA total dikoleksi dengan cara memberikan air bebas nuklease sebanyak 50 µl ke pusat membran kolom XPPLR yang diletakkan pada tabung *ependorf* baru, dibiarkan selama satu menit, lalu disentrifugasi selama satu menit. RNA yang telah diperoleh disimpan di *freezer* -80 °C, sampai digunakan.

Sintesis complementary DNA (c-DNA). Reaksi *reverse transcription* (RT) dilakukan untuk membuat cDNA dengan menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Pereaksi yang digunakan terdiri atas air bebas nuklease (3,7 µl), bufer RT 5x (2 µl), DTT 50 mM (0,35 µl), dNTP 10 mM (0,5 µl), M-MuLV Rev (Fermentas) (0,35 µl), RNase Inhibitor (0,35 µl), Oligo d(T) 10 µM (0,75 µl) dan RNA templat (2 µl) dengan total volume sebanyak 10 µl. Setiap komponen reaksi dipipet satu persatu, dimasukkan ke dalam tabung

eppendorf berukuran 0,5 µl, kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR. Reaksi RT dilakukan selama satu jam pada suhu 42 °C.

Amplifikasi cDNA. Untuk amplifikasi DNA, digunakan sepasang primer *degenerate* untuk BBWV (Kondo *et al.*, 2005) dan satu pasang primer spesifik CymMV (Lee & Chang, 2008) dengan urutan nukleotida yang dapat dilihat pada Tabel 1. cDNA yang dihasilkan dari hasil RT, diamplifikasi dengan teknik PCR pada volume 25 µl yang terdiri atas: air bebas nuklease 9,5 µl, PCR mix (Go Green Taq-Promega) 12,5 µl, primer *forward* 10 µM dan *reverse* 10 µM, masing-masing 1 µl dan DNA templat 1 µl. Setiap komponen reaksi dipipet satu persatu, dimasukkan ke dalam tabung *eppendorf* berukuran 0,5 µl, kemudian dimasukkan dalam mesin PCR. Program PCR diatur berbeda, tergantung pasangan primer yang digunakan (Tabel 2).

Visualisasi DNA. DNA hasil amplifikasi dari PCR dipisahkan pada gel agarose 1,5% yang telah ditambah etidium bromida (0,5 µl/10 ml TBE). Sampel dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose, kemudian dielektroforesis pada 50 V selama 60 menit. Adanya pita DNA pada gel agarose dilihat di bawah *transilluminator ultraviolet* dan didokumentasi dengan kamera digital.

Analisis Runutan Nukleotida *cp* BBWV2, CymMV, dan Asam Amino CP BBWV2 dan CymMV

Perunutan Nukleotida. Perunutan nukleotida menggunakan mesin sequencer *ABI-Prism 3100-Avant Genetic Analyzer* di Laboratorium *Research and Development Centre* PT. Genetika Science. Indonesia.

Hasil runutan dianalisis menggunakan *software Blast* (www.NCBI.Nml.Niv.gov) dan *software Wu-Blast* (www.ebi.ac.uk). *Contiq* hasil perunutan DNA dilakukan dengan bantuan program *Sequenche r4.8* dan *software Complementor* (www.justbio.com). Selanjutnya, hasil runutan yang sudah diolah, ditranslasi menjadi urutan protein (asam amino), dengan bantuan *software Translate* (www.expasy.org.tools).

Analisis Identitas Matriks dan Filogenetika.

Runutan nukleotida yang diperoleh dibandingkan dengan data runutan nukleotida yang ada di *GenBank*. Matriks identitas nukleotida dan asam amino diperoleh dengan menggunakan *software BioEdit* versi 7.0. Selanjutnya, gambar pensejajaran runutan nukleotida didapatkan dengan menggunakan program *GeneDoc* versi 2.7.000. Pohon filogenetika dikonstruksi dengan menggunakan *software MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetic Analysis software)* (Tamura *et al.*, 2007), dengan metode *neighbour-joining* menggunakan *bootstrap* 1000 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Broad Bean Wilt Virus 2

RT-PCR. Primer yang digunakan yaitu BBWV25 dan BBWV3487M merupakan primer *degenerate* untuk mengamplifikasi gen *coat protein (cp)* BBWV baik BBWV1 maupun BBWV2, sehingga produk yang dihasilkan merupakan gen *cp* BBWV. Pasangan primer ini telah berhasil digunakan untuk mengamplifikasi gen *cp* BBWV2 dari tanaman *Chinese yam (Dioscorea opposita* Thunb.) di Ojima, Jepang (Kondo *et al.*, 2005).

Tabel 1. Primer-primer yang digunakan untuk deteksi virus mosaik nilam

No	Primer	Urutan basa	Ukuran DNA	Referensi
1	BBWV25	5'-AATGARRTKGTNCTCAAYTA-3'	2000 pb	Kondo <i>et al.</i> (2005)
2	BBW3487M	5'-AMAMAGGTCATGGAACCCA-3'		
3	CyCP-F1	5-ATGGGAGAGYCCACTCCARCYCCAGC-3'	679 pb	Lee & Chang (2008)
4	CyCP-R1	5'-ATCGCTCGAGTTCAGTAGGGGGTGCAGGCA-3'		

Tabel 2. Program PCR untuk setiap primer yang digunakan untuk kegiatan PCR

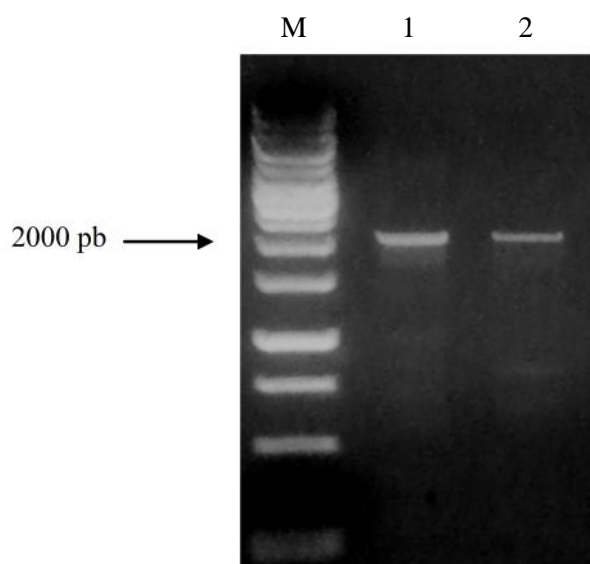
No	Primer	Program PCR	Referensi
1	BBWV25	Denaturasi awal pada suhu 95 °C (5 menit); 35 siklus: 99 °C (1 menit),	Kondo <i>et al.</i> (2005)
2	BBW3487M	55 °C (2 menit) dan 72 °C (3 menit); diakhiri dengan 72 °C (5 menit)	
3	CyCP-F1	Denaturasi awal pada suhu 96 °C (5 menit); 30 siklus: 96 °C (30 detik),	Lee & Chang (2008)
4	CyCP-R1	52 °C (30 detik) dan 72 °C (30 detik); diakhiri dengan 72 °C (7 menit)	

Produk berukuran 2000 pb (pasang basa), berhasil teramplifikasi dari RNA total yang diekstraksi dari daun nilam asal Manoko (Gambar 1). Ukuran pita DNA yang didapatkan sesuai dengan prediksi desain primer yang digunakan, yang menunjukkan terdeteksinya BBWV2 pada sampel daun nilam asal Manoko. Selanjutnya dilakukan perunutan nukleotida terhadap isolat Manoko yang didapatkan.

Homologi runutan nukleotida *scp* dan asam amino CP BBWV2. Dari hasil kegiatan PCR untuk mengamplifikasi keseluruhan gen *cp* BBWV2, didapatkan pita DNA berukuran 2000 pb. Pada perunutan nukleotida, pembacaan hanya berhasil dilakukan sampai 591 pb (ditranslasikan menjadi 197 asam amino) yang merupakan gen *Small Coat Protein (scp)*. Analisis

homologi dan filogenetika dilakukan menggunakan gen *scp*. *Broad bean wilt virus 2* yang menginfeksi tanaman Yam dibandingkan homologi asam amino bagian LCP dan SCPnya dengan beberapa isolat BBWV2 secara terpisah, dimana homologi asam amino SCP cenderung lebih rendah dibandingkan homologi LCP (Kondo *et al.*, 2005). Penggunaan gen *scp* juga dilakukan untuk melihat variasi genetik beberapa isolat BBWV2 dari beberapa negara (Ferrer *et al.*, 2011).

Runutan nukleotida *scp* dan asam amino SCP isolat BBWV2 Manoko dibandingkan dengan 8 isolat BBWV2 dari beberapa negara, satu isolat *patchouli mild mosaic virus* (PatMMV) dari Jepang dan sebagai isolat di luar grup, digunakan *broad bean wilt virus 1* (BBWV1) (Tabel 3).



Gambar 1. Hasil visualisasi *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) BBWV2 pada gel agarose 1%. M: Penanda DNA 1 kb plus, 1-2: Isolat Manoko

Tabel 3. Isolat BBWV2, PatMMV dan BBWV1 dari database *GenBank* yang digunakan untuk membandingkan homologi gen *scp* BBWV2 Manoko

Spesies	Asal isolat	Inang/strain	Kode akses
BBWV2	Cina	Tomat/-	JQ855708
	Jepang	<i>Alstroemeria</i> / Rs	AB261176
	Taiwan	<i>Salvia dorisiana</i> /Fruit <i>sage</i>	EF392660
	Jepang	<i>Chinese yam</i> /Nagaimo	AB207244
	Singapura	<i>Megakeepasma erythrochlamys</i> /ME	AF225954
	Cina	Lada/ XJP1	HQ283390
	Jepang	<i>Gentiana triflora</i> /-	AB746939
	Korsel	Cabai /RP7	JX183234
	PatMMV	Jepang	Nilam/-
BBWV1	Spanyol	Cabai/Ben	AY781172

Hasil analisis homologi runutan nukleotida dan asam amino menunjukkan bahwa gen *scp* isolat asal Manoko menunjukkan homologi tertinggi sebesar 93,0% dan 93,9% dengan BBWV2 asal Singapura. Sedangkan dengan isolat BBWV2 lain dan PatMMV, homologi berdasarkan runutan nukleotida berkisar antara 78,8–90,0%, dan berdasarkan asam amino berkisar antara 88,8–93,4%. Homologi isolat asal Manoko dengan BBWV1, hanya sebesar 63,6% berdasarkan runutan nukleotida, dan sebesar 58,8% berdasarkan asam amino (Tabel 4). Hasil ini menunjukkan bahwa virus yang ditemukan merupakan salah satu spesies BBWV2. Dalam genus *Fabavirus*, virus diklasifikasikan ke dalam spesies yang sama bila homologi gen *cp* lebih dari 75% (Fauquet *et al.*, 2005).

Genus *Fabavirus* nilam di Jepang diidentifikasi sebagai PatMMV. PatMMV memiliki kemiripan morfologi partikel, berat molekul CP dan hubungan serologi dengan isolat BBWV dan *lamium mild mosaic virus* (LMMV). Namun, PatMMV menunjukkan perbedaan kisaran inang dan gejalanya pada *Vicia faba* dan *Nicotiana tabacum*, sehingga digolongkan sebagai spesies baru dalam genus *Fabavirus* (Natsuaki *et al.*, 1994). Genus *Fabavirus* yang menginfeksi pertanian nilam di Indonesia, menunjukkan homologi nukleotida dan asam amino lebih tinggi terhadap BBWV2 asal Singapura, dibandingkan dengan PatMMV. Dengan demikian, genus *Fabavirus* yang menginfeksi tanaman nilam merupakan BBWV2. Selain itu, PatMMV akhirnya juga diklasifikasikan sebagai salah satu strain BBWV2, karena perbedaan gen *cp*-nya hanya berkisar antara 3–21% dengan BBWV2 (Fauquet *et al.*, 2005).

BBWV2 memiliki kisaran inang yang luas, menginfeksi tanaman hortikultura dan hias (Ferrer *et al.*,

2011), namun belum pernah dilaporkan menginfeksi nilam. Secara serologi BBWV2 terdeteksi menginfeksi nilam (Noveriza *et al.*, 2012). Penelitian ini berhasil mengidentifikasi BBWV2 secara molekuler melalui teknik RT-PCR menggunakan primer dengan target gen *cp* serta analisis runutan nukleotida dan asam aminonya.

Pohon Filogenetika Runutan Nukleotida dan Asam Amino Gen *scp* BBWV2. Hasil analisis filogenetika berdasarkan runutan nukleotida gen *scp* menunjukkan terbentuknya dua kelompok/*cluster*. BBWV2 Manoko berada dalam satu kelompok dengan BBWV2 Singapura (yang menginfeksi *Megakepasma erythroclamys*/ME), Cina (lada) dan Korea Selatan (cabai). Isolat PatMMV (nilam) berada pada kelompok lain dengan BBWV2 Taiwan (*S. dorisiana*), Jepang (*Gentiana, yam, Alstroemeria*) dan Cina (tomat) (Gambar 2). Hasil analisa filogenetik ini mendukung hasil analisa homologi runutan nukleotida dan asam amino, dimana BBWV2 Manoko memiliki homologi tertinggi dengan BBWV2 Singapura, dan pada pohon filogeni berada dalam satu kelompok.

Hasil analisis filogenetika menunjukkan bahwa pengelompokan isolat-isolat BBWV2 tidak berdasarkan asal isolat. Hal ini terlihat pada kedua isolat Cina, berada pada kelompok yang berbeda. Hasil yang sama juga terjadi pada analisis filogenetika isolat-isolat BBWV2 dari beberapa negara dan dari inang yang berbeda berdasarkan gen *scp*, terlihat bahwa pengelompokan tidak berdasarkan inang dan asal isolat (Ferrer *et al.*, 2011).

Cymbidium Mosaic Virus

RT-PCR. Primer yang digunakan untuk mengamplifikasi gen *cp* CymMV adalah primer

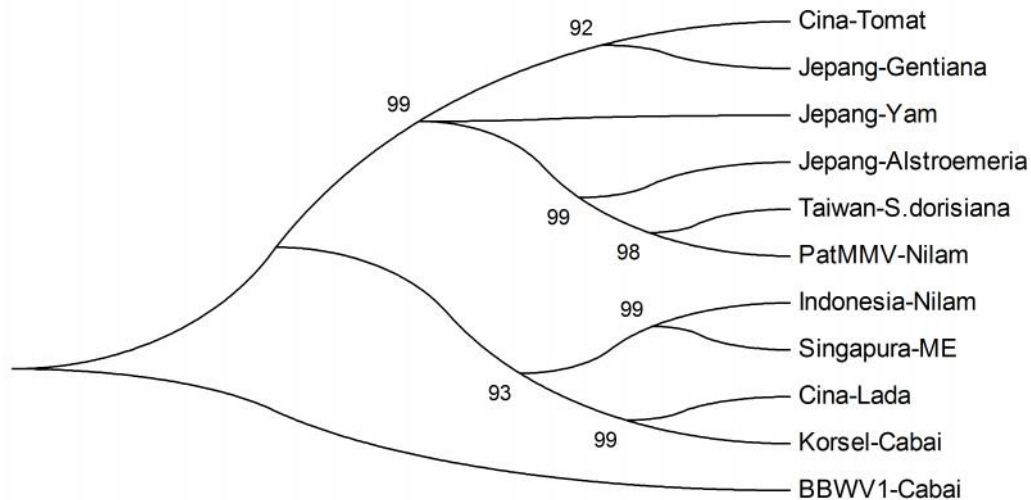
Tabel 4. Homologi runutan nukleotida dan asam amino gen *scp* BBWV2 Manoko dengan beberapa anggota genus *Fabavirus*

Spesies	Asal isolat	Inang/strain	Homologi (%)	
			Nukleotida	Asam amino
BBWV2	Cina	Tomat/-	80,5	91,3
	Jepang	<i>Alstroemeria</i> /Rs	78,8	88,8
	Taiwan	<i>Salvia dorisiana</i> /Fruit Sage	80,0	88,0
	Singapura	<i>Megakepasma erythroclamys</i> /ME	93,0	94,9
	Cina	Lada/XJP1	90,0	93,4
	Jepang	<i>Gentiana triflora</i> -	80,3	89,3
	Korsel	Cabai/RP7	88,1	92,8
	Jepang	Chinese yam/Nagaimo	80,7	86,8
	PatMMV	Jepang	Nilam/-	79,6
BBWV1	Spanyol	Cabai/Ben	63,6	58,8

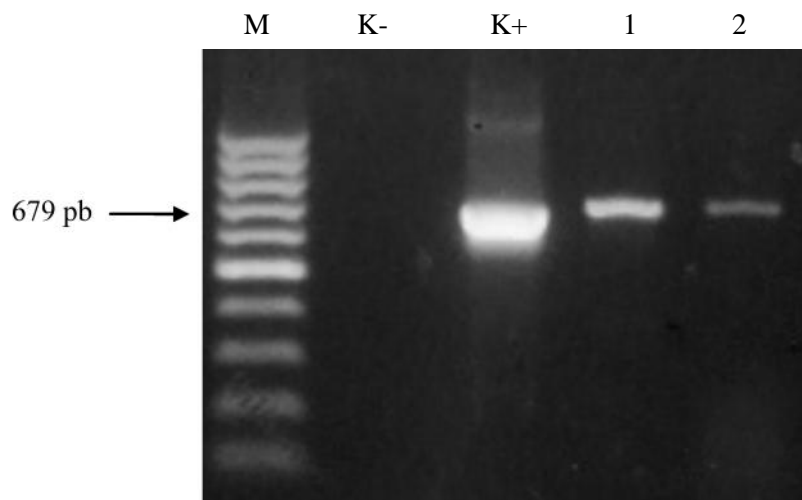
degenerate yang disusun dari 3 genom CymMV (AF016914, AY571289, U62963) yang diambil dari *GenBank* (Lee & Chang, 2008). Ketiga genom CymMV tersebut memiliki homologi yang tinggi dengan isolat CymMV asal Manoko berdasarkan analisa BLAST (Miftakhurohmah *et al.*, 2013). Hasil RT-PCR menunjukkan 2 sampel dari Manoko teramplifikasi pita DNA berukuran 679 pb, yang berukuran sama dengan kontrol positif (CymMV asal anggrek) (Gambar 3). Hasil ini menunjukkan bahwa dua sampel daun nilam asal Manoko yang dideteksi, positif terinfeksi CymMV.

Selanjutnya, dilakukan perunutan nukleotida terhadap isolat CymMV asal Manoko yang didapatkan.

Homologi Runutan Nukleotida dan Asam Amino Gen *cp* CymMV. Gen *cp* CymMV berhasil dirunut berukuran 681 pb, yang ditranslasikan menjadi 227 asam amino, dimana hasil translasi menunjukkan CP penuh. Pensejajaran gen *cp* CymMV dilakukan dengan membandingkan homologinya dengan 8 isolat CymMV dari beberapa negara, satu isolat CymMV Indonesia, dan sebagai pembandingan di luar grup, digunakan satu isolat PVX (Tabel 5).



Gambar 2. Pohon filogenetika BBWV2 isolat Manoko berdasarkan runutan nukleotida gen *scp*. Pohon filogenetika dibuat dengan menggunakan *software* MEGA 4.0, metode *neighbour-joining*, dengan *bootstrap* sebanyak 1000 kali. BBWV1 digunakan sebagai pembandingan di luar grup



Gambar 3. Hasil visualisasi *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR) CymMV pada gel agarose 1,5%. M: Penanda DNA 100 pb, K-: kontrol negatif, K+: kontrol positif, 1-2: sampel Manoko

Runutan nukleotida gen *cp* CymMV isolat Manoko terlihat memiliki kemiripan yang tinggi (88,5–96,8%) dengan sembilan isolat CymMV dari beberapa negara. Homologi tertinggi yaitu sebesar 96,8% dengan isolat CymMV dari Korea Selatan (*Cymbidium*), dan homologi terendah sebesar 88,5% dengan isolat CymMV Thailand (*Oncidium*). CymMV isolat Manoko memiliki homologi sebesar 95,8% dengan CymMV Indonesia (*Dendrobium*). Sedangkan dengan PVX sebagai isolat di luar grup, hanya memiliki homologi sebesar 48,6% (Tabel 6).

Tingkat homologi yang tinggi dengan isolat-isolat CymMV dari negara lain juga didapatkan dari hasil penghitungan homologi runutan asam amino CP CymMV asal Manoko, dengan kisaran antara 94,6–99,1%. Homologi tertinggi dengan isolat CymMV asal Korea Selatan, sedangkan homologi terendah dengan CymMV Thailand. Sedangkan dengan PVX sebagai isolat di luar

grup, seperti halnya isolat-isolat CymMV lain, tingkat kemiripannya rendah, hanya sebesar 35,8% (Tabel 6).

CymMV Manoko mengalami mutasi nukleotida pada beberapa titik dibandingkan dengan 9 isolat CymMV dari beberapa negara, termasuk CymMV Indonesia asal *Dendrobium*. Mutasi pada urutan nukleotida ke-10 dan ke-82 menyebabkan perubahan asam amino pada posisi ke-4, yaitu dari *proline* menjadi *serine*, dan ke-28, dari *alanine* menjadi *threonine* (Gambar 4). Sedangkan mutasi pada titik yang lain tidak menyebabkan perubahan asam amino.

CymMV Manoko memiliki perbedaan nukleotida pada titik ke 670-672, serta tambahan 9 nukleotida di akhir runutan gen *cp*, dibandingkan dengan gen *cp* CymMV Indonesia dan beberapa CymMV yang lain. Nukleotida TAA yang berada pada posisi 670-672, yang mengkode stop kodon, bergeser posisinya ke titik 679-681. Pada titik 670-678, merupakan tambahan 9

Tabel 5. Isolat CymMV dari database GenBank yang digunakan untuk membandingkan homologi gen *cp* CymMV Manoko

Spesies	Asal Isolat	Inang/Strain	Kode Akses
CymMV	Korea Selatan	<i>Cymbidium</i> /CYK9	AB541542
	Cina	Vanili/HNXL	HQ681906
	Indonesia	<i>Dendrobium</i>	AB693982
	Hawai	<i>Dendrobium</i> /2	EF125179
	Thailand	<i>Oncidium</i> /-	AY376393
	Cina	<i>Cymbidium</i> /GD3	AY360410
	India	Vanili/-	DQ208422
	Singapura	<i>Dendrobium</i> /-	AF405728
	India	<i>Phaius tancarvilleae</i>	AJ564562
	PVX	Cina	Terong

Tabel 6. Homologi nukleotida dan asam amino gen CP CymMV Manoko dengan beberapa CymMV asal beberapa negara

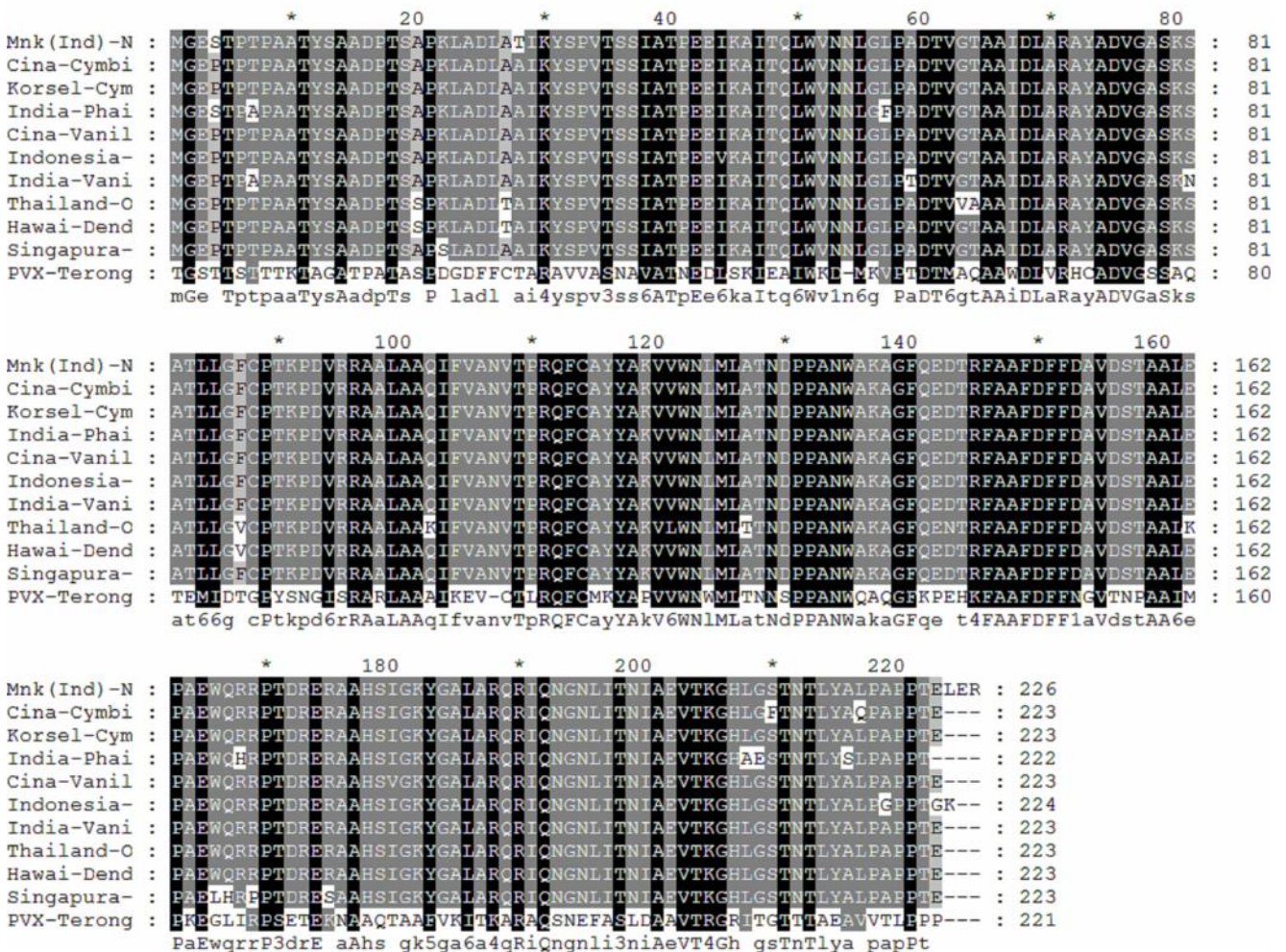
Spesies	Negara	Inang/Strain	Homologi (%)	
			Nukleotida	Asam Amino
CymMV	Cina	<i>Cymbidium</i> /GD3	96,1	98,2
	Korea Selatan	<i>Cymbidium</i> /CYK9	96,8	99,1
	India	<i>Phaius tancarvilleae</i>	95,5	96,4
	Cina	Vanili/HNXL	95,8	98,6
	Indonesia	<i>Dendrobium</i> /-	95,8	97,7
	India	Vanili/-	95,3	97,3
	Thailand	<i>Oncidium</i> /-	88,5	94,6
	Hawai	<i>Dendrobium</i> /2	89,4	97,7
	Singapura	<i>Dendrobium</i> /-	94,7	96,8
	PVX	Cina	Terong	48,6

nukleotida, yang ditranslasikan menjadi asam amino *leucine*, *glutamic acid* dan *arginine* (Gambar 5).

Perubahan dan tambahan beberapa asam amino CP CymMV Manoko ini diduga mempengaruhi perbedaan inang CymMV Manoko dan isolat CymMV lain. CymMV dilaporkan hanya menginfeksi tanaman dalam famili Orchidaceae, sedangkan CymMV Manoko menginfeksi tanaman nilam yang tergolong ke dalam famili Lamiaceae. Hal ini terjadi karena gen *cp* genus *Potexvirus* selain berperan sebagai pembentuk selubung protein, juga berperan dalam pergerakan virus antar sel (sebagai tambahan), yang mempengaruhi penyebaran virus (Scholthof, 2005). Gen *cp* CymMV M1 berperan penting dalam perpindahan sel ke sel. Perbedaan empat asam amino pada CP dua strain CymMV asal angrek

menyebabkan CymMV M1 mampu berpindah ke seluruh bagian tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) yang menyebabkan gejala sistemik, sedangkan CymMV M2 hanya menyebabkan gejala lokal (Lu *et al.*, 2009).

Genus *Potexvirus* pada nilam di Brazil diidentifikasi sebagai virus baru, yang dinamakan dengan PatVX (Filho *et al.*, 2002). Namun demikian, peneliti dari Brazil tersebut hanya melakukan pembuatan antiserum, uji serologi baik dengan antiserum dan dengan uji protein, tanpa melakukan sekuensing. Dengan demikian, runutan nukleotida dan asam amino isolat CymMV yang didapatkan dari nilam tidak bisa dibandingkan homologinya dengan genom PatVX yang ditemukan di Brazil.



Gambar 4. Hasil *alignment* asam amino antara genom CymMV isolat Manoko dengan nukleotida genom- genom CymMV yang didapatkan dari database GeneBank; keterangan: latar belakang warna hitam menunjukkan kesamaan runutan nukleotida antar isolat, sedangkan warna abu-abu menunjukkan ketidaksamaan. Pensejajaran dilakukan dengan program Bioedit. dilanjutkan dengan program GeneDog Ver. 2.7.000 (www.psc.edu/biomed/genedoc)

* 20 * 40 * 60 * 80

Mnk (Ind) -n : ATGGGAGAGTCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
Cina-Cymbi : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
Korsel-Cym : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
India-Phai : ATGGGAGAGTCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCTGACTGGCT : 81
Cina-Vanil : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCTGACTGGCT : 81
Indonesia- : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
India-Vani : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
Thailand-O : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
Hawai-Dend : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
Singapura- : ATGGGAGAGCCCACTCCAACTCCAGCTGCCACTTACTCCGCTGCCGACCCACCTTCTGCACCCAGTTGGCCGACTGGCT : 81
PVX-Terong : ACGGGTCAACTACTTCAACTACACGAAATGCAGGCGCAACTCTCTGCCACAGCTTCAAGGACTTTCACCAATCCCGGAT : 81
AtgGgagag CcActCcaCTcCagCtgccAC tactcCGCtgCcgaccCCActtCt CAcc a gtTggCggaCCTggct

* 100 * 120 * 140 * 160

Mnk (Ind) -n : ACCATCAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Cina-Cymbi : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Korsel-Cym : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
India-Phai : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Cina-Vanil : GCCATCAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Indonesia- : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
India-Vani : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Thailand-O : GCCATCAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Hawai-Dend : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
Singapura- : GCCATTAAGTACTCACCCTGTACCTCTCCATCGCCACCCCGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC : 162
PVX-Terong : GTTCTCTGTAGAGCCCTGCGGTAGTAGCGAATCGCGTTGAAGAAATGAGGACCTCAGCAAGATTGAGGCTTAAGGAC : 162
gccgT aagTactcaCctGtcacctc tC AtcgccaCccccGAAGAAATCAAGGCCATACCCCAATGTGGGTAAACAAC

* 180 * 200 * 220 * 240

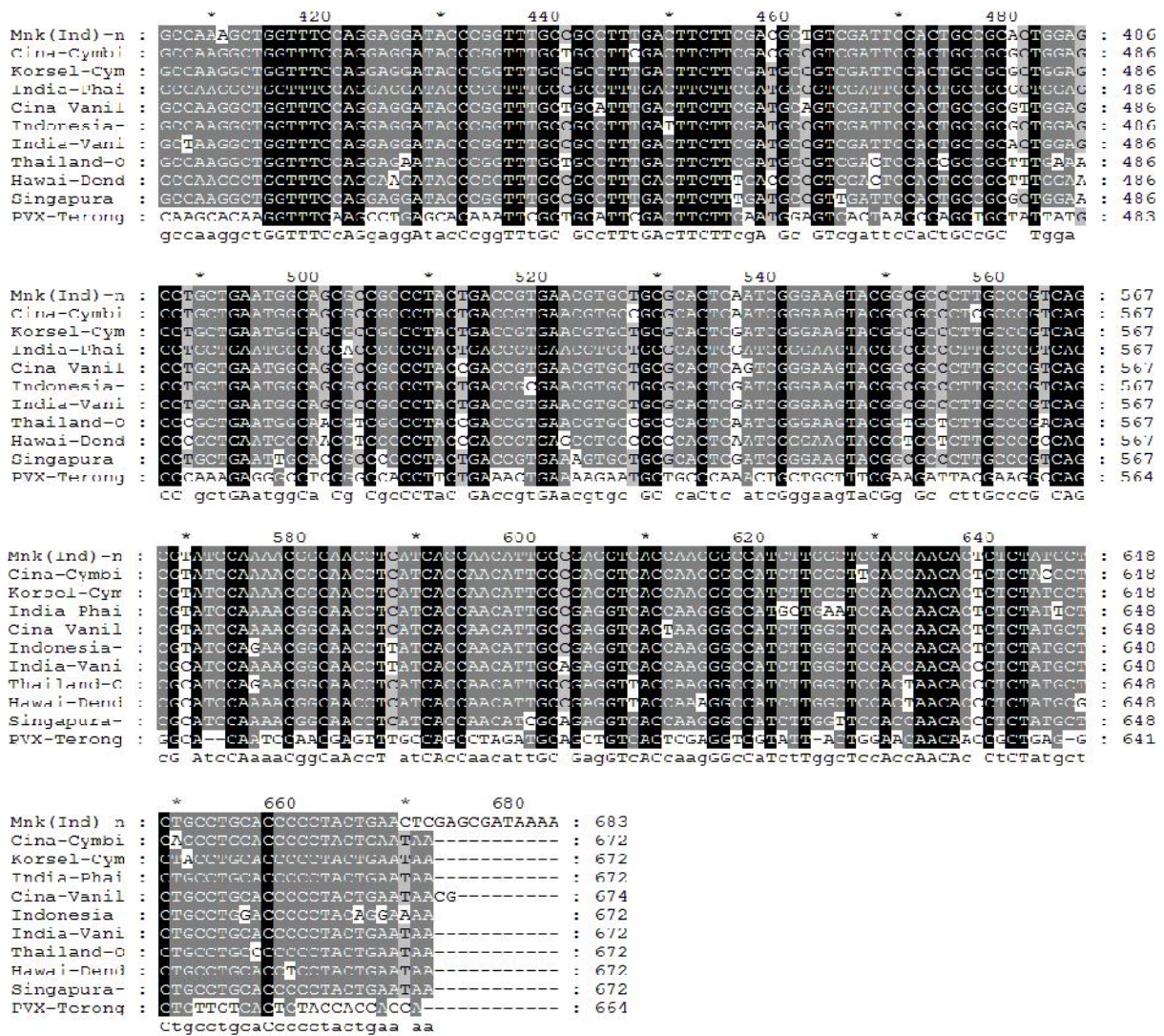
Mnk (Ind) -n : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Cina-Cymbi : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Korsel-Cym : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
India-Phai : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Cina-Vanil : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Indonesia- : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
India-Vani : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Thailand-O : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Hawai-Dend : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
Singapura- : CTTGGCCCTCCCGCTGACACCGTGGTACCGCGCCATTGAGCTGGCCGCGGCTAGCTGAGGTGGGGCATCCAAAGAGT : 243
PVX-Terong : ATGAAGGTCGCCGACACACTATGACACAGGCTGCTGGGACTAGTTAGACACTGTGCTGATGTGGCTCATCTGCCCAA : 243
cTtggccTCCCGC GACAC gTaGgtaccGCGcCattGA cTgGc cG gcCTacGCTGAcGTcGGggC TCcaag t

* 260 * 280 * 300 * 320

Mnk (Ind) -n : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Cina-Cymbi : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Korsel-Cym : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
India-Phai : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Cina-Vanil : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Indonesia- : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
India-Vani : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Thailand-O : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Hawai-Dend : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
Singapura- : GCTACCTGCGTGGTTCTGCCCCACGAAACCTGATGTCCGTCGCGCCGCTCTTGGCGGCAGATCTTGTGGCCAAAGGTC : 324
PVX-Terong : ACAGAAATGATGACACAGCTCCCTATTCCAATGGATTCAGCAAGCTAGATGGCGACGCAATTAAGAGAT--GTG-C : 321
gCtaccctGcT Ggt tctG CC acgaa cctGaTgTccGtcG GcGcctcTtGCcGcGcagATcttcGtgGccaa Gtc

* 340 * 360 * 380 * 400

Mnk (Ind) -n : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Cina-Cymbi : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Korsel-Cym : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
India-Phai : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Cina-Vanil : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Indonesia- : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
India-Vani : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Thailand-O : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Hawai-Dend : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
Singapura- : ACCCCCGCCAGTTTTCGGCTTACTAGCAAAAGTGTGTGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 405
PVX-Terong : ACCTTGGCAATTTTCGATGAACTATGCCCCAGTGTATGGAACTGATGCTGGCCACTAACGATCCGCGGCCAACTGG : 402
ACcCc cGcCagTTTTCGcctTA TAcCcaaaAGTgTgTGGAActctGATGcTggC Ac AAcgatCCgCCGCCAACTGG

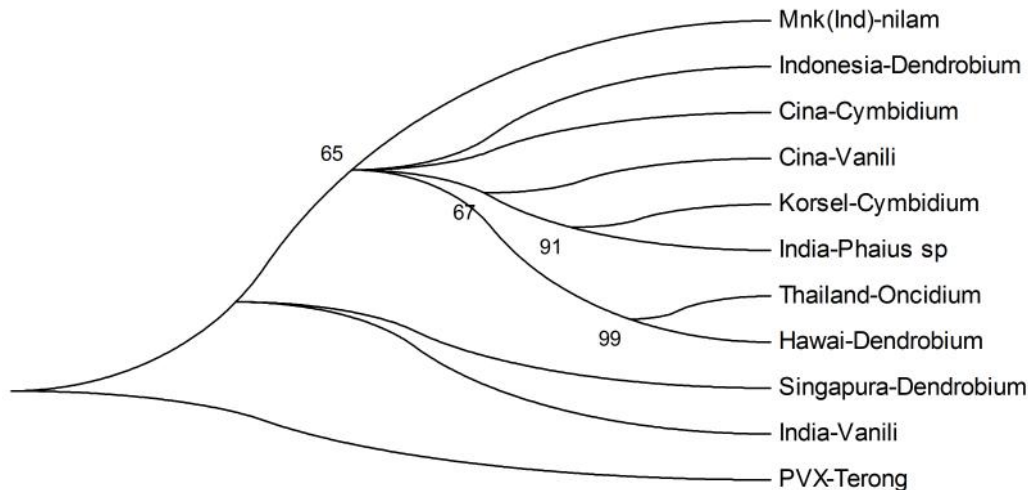


Gambar 5. Hasil *alignment* nukleotida antara genom CymMV isolat Manoko dengan nukleotida genom-genom CymMV yang didapatkan dari database *GeneBank*; keterangan: latar belakang warna hitam menunjukkan kesamaan runutan nukleotida antar isolat, sedangkan warna abu-abu menunjukkan ketidaksamaan. Pensejajaran dilakukan dengan program Bioedit. dilanjutkan dengan program GeneDog Ver. 2.7.000 (www.psc.edu/biomed/genedoc)

CymMV telah dilaporkan menginfeksi tanaman anggrek di beberapa negara. Selain tanaman anggrek, CymMV juga dilaporkan menginfeksi tanaman vanili (Grisoni *et al.*, 2004). Di Indonesia, CymMV telah dilaporkan menginfeksi tanaman anggrek (Lakani *et al.*, 2010). Namun demikian, infeksi CymMV pada tanaman nilam belum pernah dilaporkan. Dengan demikian, penelitian ini merupakan laporan pertama infeksi CymMV pada tanaman nilam.

Pohon Filogenetika Runutan Nukleotida *cp* dan Asam Amino CP CymMV. Hasil analisis filogenetika runutan nukleotida gen *cp* membentuk 2 kelompok/

cluster. Isolat Manoko berada dalam satu kelompok dengan CymMV Indonesia (*Dendrobium*), Cina (*Cymbidium*), Korea Selatan (*Cymbidium*), India (*Phaius* sp.), Thailand (*Oncidium*) dan Hawaii (*Dendrobium*). Isolat Singapura (*Dendrobium*) dan India (vanili) membentuk kelompok terpisah (Gambar 6). Hasil analisa homologi asam amino dan nukleotida serta filogenetik menunjukkan bahwa isolat Manoko yang ditemukan merupakan CymMV. Virus diklasifikasikan ke dalam spesies yang sama bila gennya memiliki homologi nukleotida lebih dari 72% atau asam amino lebih dari 80% (Fauquet *et al.*, 2005).



Gambar 6. Pohon filogenetika CymMV isolat Manoko (Lembang) berdasarkan runutan nukleotida gen *cp*. Pohon filogenetika dibuat menggunakan *software* MEGA 4.0, metode *neighbour-joining*, dengan *bootstrap* sebanyak 1000 kali. PVX digunakan sebagai pembanding di luar grup

SIMPULAN

Virus yang berasosiasi dengan gejala mosaik pada tanaman nilam adalah BBWV2 dan CymMV. Hasil analisis homologi dan pohon filogenetika menunjukkan bahwa BBWV2 asal Manoko mengelompok dengan BBWV2 dari Singapura asal tanaman hias *Megakepasma erythroclamys* (ME), Cina asal tanaman lada dan Korea Selatan asal tanaman cabai. Sedangkan CymMV asal Manoko berada dalam satu kelompok dengan CymMV dari Indonesia, Cina, Korea Selatan, India, Thailand, dan Hawaii yang berasal dari beberapa jenis anggrek. Isolat CymMV yang ditemukan merupakan laporan pertama teridentifikasi pada nilam di Indonesia.

SANWACANA

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Irwan Lakani yang telah membantu kegiatan analisis runutan nukleotida gen *cp* BBWV2 dan CymMV serta asam amino CP BBWV2 dan CymMV.

DAFTAR PUSTAKA

Badan Karantina Pertanian. 2011. *Basis Data Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina*. Badan Karantina Pertanian. Departemen Pertanian Republik Indonesia. <http://karantina.deptan.go.id/optk/index.php>. Diakses tanggal 14 April 2011.

Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, & Ball LA. 2005. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*. Elsevier Academic Press. New York.

Ferrer RM, Ferrior I, Moreno P, Guerri J, & Rubio L. 2011. Genetic variation and evolutionary analysis of *Broad bean wilt virus 2*. *Arch. Virol.* 156(8): 1445–1450.

Filho PEM, Resende RO, Lima MI, & Kitajima EW. 2002. *Pantchouli virus x*, a new potexvirus from *Pogostemon clabin*. *Annu. Appl. Biol.* 141: 267–274.

Grisoni M, Davidson F, Hyrondelle C, Farreyrol K, Caruana ML, & Pearson M. 2004. Nature, incidence and symptomatology of viruses infecting *Vanilla tahitensis* in French Polynesia. *Plant Dis.* 88(2): 119–124.

Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symp. Ser.* 41: 95–98.

Kondo T, Fuji S, Yamashita K, Kang DK, & Chang MU. 2005. *Broad bean wilt virus 2* in yams. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 441–443.

Kobayashi YO, Kobayashi A, Hagiwara K, Uga H, Mikoshiba Y, Naito T, Honda Y, & Omura T. 2005. Gentian mosaic virus: a new species in the genus Fabavirus. *Phytopathology* 95(2): 192–197.

- Lakani I, Suastika G, Mattjik N, & Damayanti TA. 2010. Identification and molecular characterization of *Odontoglossum ringspot virus* (ORSV) from Bogor, Indonesia. *Hayati J. Biosci.* 17(2): 101–104.
- Lee SC & Chang YC. 2008. Performances and application of antisera produced by recombinant capsid proteins of *Cymbidium mosaic virus* and *Odontoglossum ringspot virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 122: 297–306.
- Lu HC, Chen CE, Tsai MH, Wang H, Su HJ, & Yeh HH. 2009. *Cymbidium mosaic potexvirus* isolate-dependent host movement systems reveal two movement control determinants and the coat protein is the dominant. *Virology* 388(1): 147–159.
- Miftakhurohmah, Suastika G, & Damayanti TA. 2013. Deteksi secara serologi dan PCR beberapa jenis virus yang berasosiasi dengan penyakit mosaik pada tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *J. Littri.* 19(3): 130–138.
- Naidu RA & Hughes JDA. 2003. Methods for the detection of plant viral diseases of plant viral diseases in plant virology in sub-Saharan Africa. *Proceedings of Plant Virology.* pp. 233–260. Nigeria. http://old.iita.org/cms/details/virology/pdf_files /233-260.pdf. Accessed on 2011 June 16.
- Natsuaki KT, Tomaru K, Ushiku S, Ichikawa Y, Sugimura Y, Natsuaki T, Okuda S, & Teranaka M. 1994. Characterization of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Dis.* 78(1): 1094–1097.
- Noveriza R, Suastika G, Hidayat SH, & Kartosuwondo U. 2012. *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) plants in Indonesia. *J. ISSAAS.* 18(1): 131–146.
- Putnam ML. 1995. Evaluation of selected methods of plant diagnosis. *Crop Prot.* 14(6): 517–525.
- Scholthof HB. 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* 10(8): 376–382.
- Sukanto, Rahardjo IB, & Sulyo Y. 2007. Detection of *Potyvirus* on patchouli plant (*Pogostemon cablin* BENTH) from Indonesia. *Proceeding of International Seminar on Essential Oil.* pp. 72–77. Jakarta. 7–9 November 2007.
- Sumardiyono YB, Sulandari S, & Hartono S. 1996. Penyakit mosaik kuning pada nilam (*Pogostemon cablin*). *Risalah Konggres Nasional XII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia.* pp. 912–916. Yogyakarta. 6-8 September 1996.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, & Kumar S. 2007. MEGA 4: molecular evolutionary genetic analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24(8): 1596 – 1599.