

DETEKSI KERAGAMAN VIRUS TUNGRO DARI BEBERAPA DAERAH ENDEMIS DI INDONESIA DENGAN TEKNIK PCR-RFLP

DETECTION OF VARIABILITY IN RICE TUNGRO VIRUS FROM SEVERAL ENDEMIC AREAS IN INDONESIA BY PCR-RFLP TECHNIQUE

R. Heru Praptana*

*Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta; *Loka Penelitian Penyakit Tungro, Sulawesi Selatan*

YB. Sumardiyono, Sedyo Hartono

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

I Nyoman Widiarta

Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, Bogor

Muhammad Muhsin

Balai Besar Biogen, Bogor

**Penulis untuk korespondensi. E-mail: herujuly@yahoo.com*

ABSTRACT

Tungro is one of rice disease caused by two different viruses (rice tungro virus=RTV) i.e. Rice tungro bacilliform virus (RTBV) and Rice tungro spherical virus (RTSV) that are transmitted only by green leafhopper. Tungro had become a serious problem in several rice productions centre in Indonesia. Various components of management effort have been applied but they were inefficient in preventing the tungro disease development. Resistance variety is the most efficient component to tungro disease management. Complexity interactions of tungro disease components are mayor constraint in tungro disease management. Detection of molecular variability in rice tungro virus from several endemic areas in Indonesia were conducted by using PCR-RFLP technique. Existence of RTBV and RTSV in the infected plants collected from several endemic areas were successfully detected by PCR. The RFLP analysis with restriction enzymes BstYI and HindIII showed that there were significant difference among the RTSV originated from Java, Bali and Sulawesi.

Key words: endemic areas and molecular variability in RTV, RTBV, RTSV, tungro disease

INTISARI

Tungro merupakan salah satu penyakit padi yang disebabkan oleh dua virus (*rice tungro virus* = RTV) yang berbeda yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV) yang keduanya hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau. Tungro menjadi masalah serius di beberapa sentra produksi padi di Indonesia. Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan tetapi belum dapat mencegah dan mengatasi perkembangan penyakit tungro secara efisien. Varietas tahan merupakan komponen pengendalian tungro yang paling efektif. Kompleksitas interaksi penyebab penyakit tungro merupakan kendala utama dalam usaha pengendalian penyakit tungro. Melalui pendekatan molekuler telah dilakukan deteksi dan analisis keragaman virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia. Berdasarkan analisis PCR dengan spesifik primer telah berhasil dideteksi keberadaan RTBV dan RTSV dari tanaman terinfeksi yang dikoleksi dari beberapa daerah endemis. Hasil analisis RFLP dengan enzim restriksi *BstYI* dan *HindIII* menunjukkan adanya keragaman genetik antara RTSV yang berasal dari Jawa, Bali dan Sulawesi.

Kata kunci: daerah endemis dan keragaman molekuler RTV, RTBV, RTSV, tungro

PENGANTAR

Tungro merupakan salah satu penyakit penting pada padi yang hingga saat ini masih menjadi masalah di beberapa sentra produksi padi di Indonesia. Tungro disebabkan oleh infeksi ganda dari dua virus (*rice tungro virus* = RTV) yang berbeda yaitu *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) yang mempunyai genom DNA dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV) yang mempunyai genom RNA. Kedua RTV tersebut hanya dapat ditularkan oleh wereng hijau secara semipersisten (Hibino

& Cabunagan, 1986). Kehilangan hasil akibat serangan tungro dalam kurun waktu 1996–2002 mencapai 12.078 ton/tahun atau senilai Rp. 12–15 miliar (Soetarto *et al.*, 2001). Penyebaran tungro tidak hanya di Indonesia tetapi juga di beberapa negara Asia lainnya seperti India, Malaysia, Vietnam, Filipina dan Thailand (Suranto, 2004).

Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan di antaranya dengan penerapan teknologi pengendalian penyakit tungro terpadu yang bertujuan untuk mencegah pertanaman dari

serangan tungro (*escape strategy*) dengan komponen utama waktu tanam tepat, penggunaan varietas tahan dan pergiliran varietas tahan. Penggunaan varietas tahan merupakan komponen pengendalian paling efisien yang dilakukan sampai saat ini. Namun ketahanan varietas bersifat spesifik lokasi, artinya bahwa suatu varietas akan tahan terhadap strain virus di daerah tertentu dan dapat menjadi tidak tahan terhadap strain virus di daerah lain (Baehaki & Suharto, 1985). Beberapa varietas tahan yang telah dilepas seperti Tukad Unda terbatas di Nusa Tenggara Barat dan Sulawesi Selatan dan Tukad Balian hanya dapat ditanam di Bali dan Sulawesi Selatan (Widiarta *et al.*, 2003). Hasil uji multilokasi di beberapa daerah endemis di Indonesia menunjukkan bahwa varietas Tukad Petanu hanya sesuai untuk virus tungro di Bali, Jawa Barat, dan Nusa Tenggara Barat dengan virulensi yang berbeda (Choi, 2004).

Terjadinya epidemi penyakit tungro merupakan hasil interaksi dari virus tungro, wereng hijau dan tanaman padi. Penularan efektif dari RTBV (*dependent virus*) tergantung pada RTSV (*helper virus*), tetapi RTSV dapat ditularkan ke tanaman tanpa bantuan RTBV (Hibino *et al.*, 1977). Efisiensi penularan virus tungro oleh wereng hijau sangat bervariasi dan *N. virescens* merupakan vektor terpenting karena efisiensi penularannya paling tinggi (Siwi & Suzuki, 1991). Fluktuasi intensitas penyakit tungro ditentukan oleh beberapa faktor, di antaranya ketersediaan sumber inokulum, keberadaan vektor, adanya tanaman peka serta kondisi lingkungan yang memungkinkan (Suzuki *et al.*, 1992), namun keberadaan vektor yang mengandung virus (*viruliferous vector*) merupakan faktor utama. Perbedaan geografis dan intensitas interaksi virus tungro dan wereng hijau dengan varietas menyebabkan adanya variasi genetik strain virus tungro dan biotipe wereng hijau. Variabilitas biologi dan genetik virus tungro akan mempercepat terjadinya evolusi virus dan *disease outbreak*. Kompleksitas interaksi faktor-faktor penyebab penyakit tungro menyebabkan berbagai upaya pengendalian yang telah dilakukan sering menemui kegagalan.

Kemajuan di bidang biologi molekuler telah melahirkan berbagai teknik yang dapat dimanfaatkan dalam pengelolaan penyakit tungro di antaranya diagnosis penyakit tungro, deteksi dini infeksi virus tungro dan vektor infeksi serta identifikasi dan karakterisasi strain virus tungro dan biotipe wereng hijau (Praptana & Yasin, 2008). Metode deteksi yang berkembang saat ini adalah teknik serologi dan analisis DNA. Metode deteksi

secara molekuler berdasarkan amplifikasi DNA dengan teknik PCR membuktikan bahwa bahan genetik yang diekspresi dan produk ekspresi suatu gen dapat diisolasi (Innis *et al.*, 1990). Deteksi secara molekuler mempunyai spesifitas tinggi terhadap patogen (genus, spesies, strain, patogen baru), akurat, efektif dan efisien (Gurr *et al.*, 1992). Oleh karena itu, di dalam penelitian ini dilakukan analisis keragaman secara molekuler terhadap RTV dari beberapa daerah endemis tungro di Indonesia, agar diperoleh peta keragaman penyakit tungro yang lebih akurat sebagai dasar penyusunan strategi pengendalian terpadu penyakit tungro berdasarkan pendekatan spesifik lokasi.

BAHAN DAN METODE

Survei dan Koleksi Sampel Tanaman

Survei dan koleksi sampel tanaman dilakukan di beberapa daerah endemis tungro yaitu Jawa Barat, Jawa Tengah, Daerah Istimewa Yogyakarta (DIY), Bali, Nusa Tenggara Barat (NTB), Sulawesi Selatan, Sulawesi Barat, dan Sulawesi Tengah. Secara visual dilihat kompleks gejala yang terjadi pada pertanaman yang terserang. Intensitas penyakit tungro ditentukan dengan menghitung jumlah tanaman terinfeksi (bergejala) dalam petak pertanaman terserang seluas 10 m x 10 m dan diulang sebanyak empat kali dengan jarak antar petak 200 m. Sampel daun dikoleksi dari rumpun tanaman padi terinfeksi. Semua sampel dibawa ke laboratorium dan disimpan pada suhu -20°C yang selanjutnya dianalisis secara molekuler dengan teknik PCR-RFLP.

Ekstraksi DNA dan RNA Total

Penyakit tungro disebabkan oleh infeksi dua jenis virus tungro dengan genom yang berbeda maka setiap sampel diekstraksi dengan dua metode yang berbeda.

Ekstraksi DNA total. Ekstraksi DNA total ditujukan untuk memperoleh *double stranded* DNA (dsDNA) RTBV dan DNA tanaman karena RTBV mempunyai genom DNA. Ekstraksi dilakukan sesuai dengan metode CTAB (Deng *et al.*, 1995) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan pada volume buffer CTAB yang digunakan dan tanpa tahap pemurnian DNA. Sebanyak 0,1 g dari masing-masing sampel digerus dalam 800 µl buffer CTAB (3% CTAB, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Na₂EDTA, 1,4 M NaCl dan 1% β-mercaptoetanol) yang sebelumnya sudah diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Sap yang diperoleh dimasukkan ke dalam tabung mikro 1,5

ml kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 60 menit dan pada setiap 10 menit dilakukan penggojogan. Pemurnian DNA dilakukan dengan menambahkan 500 µl buffer purifikasi yang terdiri dari kloroform dan isoamil alkohol (CIAA) dengan perbandingan 24:1 dan digojog selama 1 menit. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung mikro yang baru kemudian ditambahkan 2/3 volume isopropanol 10 mM amonium asetat dan digojog perlahan-lahan hingga terlihat benang-benang putih (DNA). Campuran disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Endapan DNA dicuci dengan 500 µl buffer pencuci (70% etanol) dalam sentrifugasi 12000 rpm selama 5 menit kemudian dikeringanginkan. Endapan DNA diresuspensi dengan 50 µl bufer TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA pH 8,0) dan siap dianalisis secara molekuler.

Ekstraksi RNA total. Ekstraksi RNA total ditujukan untuk memperoleh *single stranded* RNA (ssRNA) RTSV (RTSV mempunyai genom RNA). Ekstraksi dilakukan menggunakan *Isogen RNA Extraction Kit* (Amersham Pharmacia) dengan sedikit dimodifikasi. Modifikasi yang dilakukan adalah tidak digunakan nitrogen cair untuk ekstraksi sampel tetapi langsung digunakan buffer ekstraksi. Sebanyak 0,1 g sampel digerus dalam 1 ml buffer isogen. Sap yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 5 menit. Ke dalam tabung tersebut ditambahkan 200 µl kloroform, digojog selama 2 menit dan kemudian disentrifugasi pada 12.000 g selama 15 menit. Supernatan yang diperoleh dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 ml yang baru, ditambahkan 4/5 volume isopropanol dingin kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Campuran disentrifugasi pada 12.000 g selama 10 menit. Pellet (endapan RNA total) yang diperoleh ditambahkan 100 µl etanol 70% dingin kemudian disentrifugasi pada 7.500 g selama 5 menit. Pelet dikeringanginkan dan diresuspensi dengan 40 µl buffer TE pH 8 dan siap dianalisis secara molekuler.

Untuk keperluan analisis RTSV, RNA total (sebagai *template*) harus diubah terlebih dahulu menjadi *complementary-DNA* (cDNA) menggunakan primer oligo d(T) (RTSV termasuk dalam golongan virus poli-A). Pembentukan cDNA dilakukan menggunakan *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas) sesuai dengan petunjuk pabrikan.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Analisis PCR dilakukan untuk mendeteksi keberadaan virus baik RTBV maupun RTSV di dalam tanaman terinfeksi. PCR dilakukan menggunakan dua pasang primer yang didesain berdasarkan sekuen genom RTBV dan RTSV yang telah ada di GenBank Database. Primer untuk RTBV adalah AAA CGG TCA TTG TGG GAG GT (F) dan CAG GCC CAG CAA CGA CAT AA (R) sedang primer untuk RTSV adalah: GCA GAA CAG AAC TCT AAG GC (F) dan GTC TAA GGC TCA TGC TGG AT (R). Volume reaksi PCR sebanyak 25 µl dengan komposisi 22 µl *Ready to Go PCR Kit* (GE Healthcare), 1 µl masing-masing primer, 1 µl DNA/cDNA *template*. Mesin PCR yang digunakan adalah GeneAmp PCR System 9700. Program PCR untuk deteksi RTBV yaitu: satu siklus predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 50 detik, *annealing* pada suhu 55°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 1 menit, dan satu siklus akhir pada 72°C selama 5 menit kemudian proses dihentikan pada suhu 4°C. Program PCR untuk deteksi RTSV yaitu: satu siklus predenaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, 35 siklus yang terdiri dari denaturasi pada 94°C selama 50 detik, *annealing* pada suhu 53°C selama 50 detik, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 50 detik, dan satu siklus akhir pada 72°C selama 7 menit kemudian proses dihentikan pada suhu 4°C. Hasil PCR divisualisasi pada polyacrylamide (PAGE 6%) dan dielektroforesis di dalam buffer tris-boricacid-EDTA (TBE). Hasil elektroforesis diwarnai dengan etidium bromide dan divisualisasi pada UV transilluminator.

Analisis Keragaman RTV

Analisis keragaman RTSV dilakukan dengan metode *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Analisis RFLP dilakukan terhadap DNA RTSV hasil PCR. Enzim restriksi yang digunakan adalah *Bst*YI dan *Hind*III. Volume reaksi RFLP sebanyak 15 µl dengan komposisi 5 µl DNA hasil PCR, 1,5 µl buffer restriksi, 1 µl enzim restriksi dan 7,5 µl dH₂O. Campuran diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Hasil RFLP divisualisasi pada PAGE 6% dan dielektroforesis di dalam buffer TBE. Hasil elektroforesis kemudian diwarnai dengan etidium bromida dan divisualisasi pada UV transilluminator. Pita-pita DNA yang terbentuk dari hasil analisis RFLP diterjemahkan ke dalam data biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan nilai 1 untuk adanya pita pada satu posisi yang sama dari

beberapa isolat yang dibandingkan. Keragaman genetik dinilai dari posisi isolat pada dendrogram yang dihasilkan dari analisis program NTSYS-pc 2.1 dan pengelompokan berdasarkan analisis *the unweighted pairgroup mean arithmetic* (UPGMA).

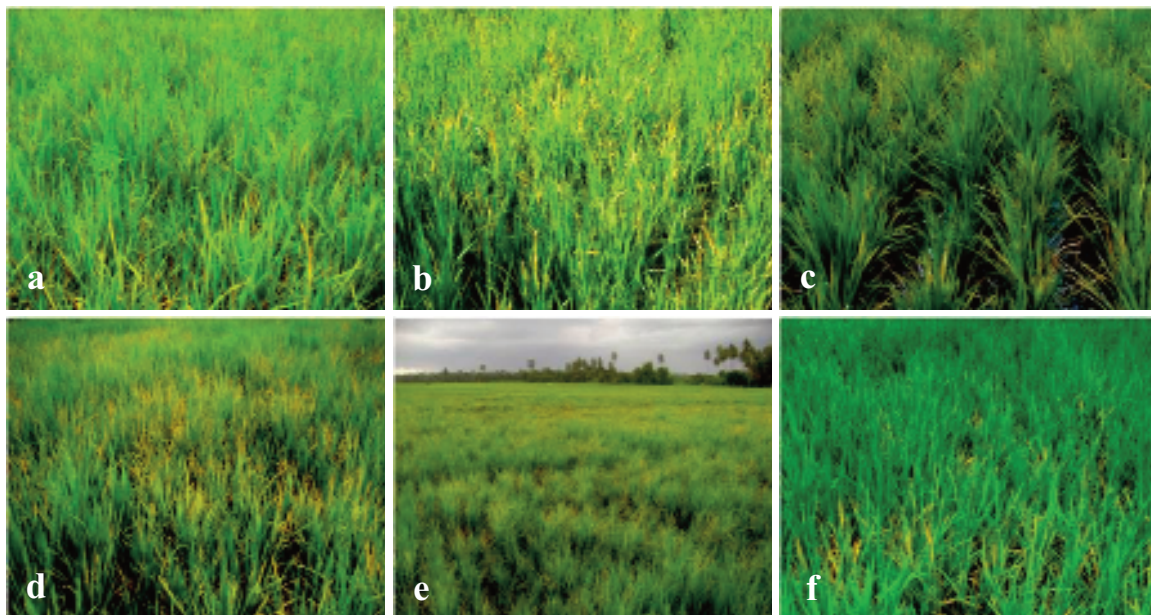
HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala penyakit tungro di masing-masing daerah endemis berupa daun yang berwarna kuning oranye dan terpelintir, tanaman kerdil dan kurang anakan. Gejala serangan virus tungro sangat jelas terlihat karena pertanaman masih dalam fase vegetatif antara 20 sampai dengan 45 hari setelah tanam (HST) (Gambar 1). Diduga sumber inokulum tungro berasal dari pertanaman yang terserang sebelumnya. Gejala tungro di pertanaman mulai terlihat pada 21–30 hari setelah tanam (Raga *et al.*, 2004). Peningkatan intensitas penyakit tungro terjadi sejak tiga minggu pertama yang merupakan hasil penularan dari persemaian dan satu atau dua minggu berikutnya akan tetap atau sedikit meningkat setelah terjadi penularan sekunder dan pada minggu-minggu selanjutnya akan terjadi peningkatan lagi (Sumardiyono *et al.*, 2004).

Varietas yang ditanam berperan penting terhadap terjadinya serangan karena umumnya di setiap daerah telah menerapkan pola tanam serempak kecuali di Magelang dan Lombok Tengah. Serangan tungro terjadi pada varietas Ciherang dan IR 64. Berdasarkan gen ketahanannya, varietas IR 64

mempunyai gen Glh5 yang berhubungan dengan ketahanan terhadap wereng hijau (Widiarta *et al.*, 2004). Hal tersebut mengindikasikan bahwa di beberapa daerah endemis telah ada atau muncul wereng hijau biotipe baru sehingga terjadi infeksi virus tungro. Diketahui bahwa wereng hijau sangat mudah beradaptasi terhadap varietas tahan apabila berhasil terbentuk hingga enam generasi (Siwi & Suzuki, 1991). Durabilitas ketahanan varietas terhadap wereng hijau secara bertahap akan menurun karena intensitas dan frekuensi interaksi wereng hijau dengan varietas tersebut di lapangan dan ada indikasi bahwa terdapat variasi virulensi virus tungro terhadap varietas tahan (Widiarta & Kusdianan, 2002). Di dalam satu wilayah terserang, ada kemungkinan terdapat variasi biologi dan genetik virus tungro, sehingga suatu varietas yang ditanam secara seragam dan terus-menerus menyebabkan durabilitas ketahanan varietas terhadap virus lebih cepat menurun (Azzam & Cancellor, 2002).

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa rata-rata intensitas penyakit tungro baik di Jawa maupun luar Jawa berkisar antara 40% hingga 100% (Tabel 1). Intensitas penyakit tungro di Jabar merupakan hasil penularan buatan dengan metode *test tube* pada varietas IR 64 dan Cisadane menggunakan wereng hijau hasil perbanyakan di rumah kaca sedangkan intensitas penyakit tungro di Sulsel merupakan serangan tungro pada pertanaman bulanan di kebun

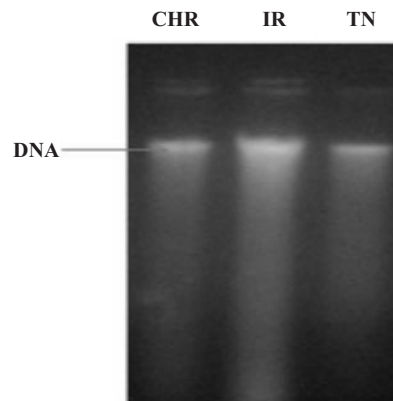


Gambar 1. Gejala serangan virus tungro: a) Magelang (Jateng), b) Sleman (DIY), c) Tabanan (Bali), d) Sidrap (Sulsel), e) Donggala (Sulteng), dan f) Lombok Tengah (NTB)

Tabel 1. Intensitas penyakit tungro di beberapa daerah endemis.

Varietas	Intensitas Penyakit Tungro (%)							
	Jabar*)	Jateng	DIY	Bali	Sulsel	Sulbar	Sulteng	NTB
Ciherang	-	-	-	60	-	80	90	40
IR 64	100	90	60	-	-	-	-	-
TN1	-	-	-	-	60	-	-	-
Cisadane	100	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: *) Hasil penularan buatan di rumah kaca



Gambar 2. Hasil ekstraksi DNA total dengan metode CTAB dari daun padi terinfeksi virus tungro: CH= Ciherang; IR= IR64 dan TN= TN1

percobaan Lokatungro Lanrang. Intensitas penyakit tungro berbeda di setiap daerah endemis walaupun infeksi terjadi pada varietas yang sama. Hal ini menunjukkan bahwa ada indikasi terjadi variasi virulensi virus tungro. Penyebaran serangan tungro di lapangan sangat dipengaruhi oleh kepadatan populasi vektor, keberagaman varietas dan waktu tanam.

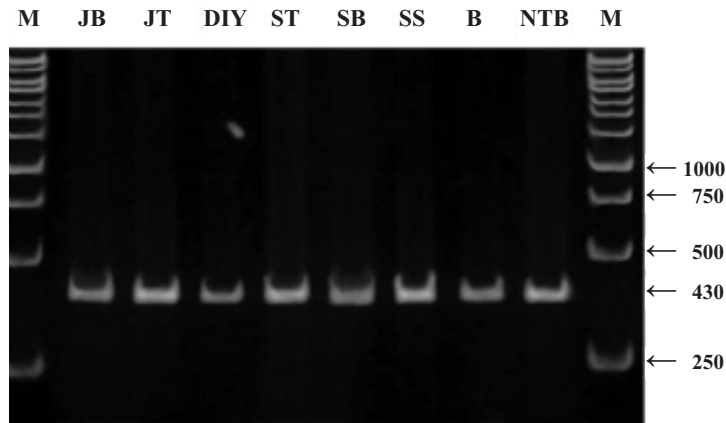
Analisis PCR untuk Deteksi RTBV dan RTSV

Optimasi ekstraksi DNA total telah berhasil dilakukan dengan metode CTAB yang dimodifikasi yang ditunjukkan oleh intensitas pita DNA dari masing-masing sampel (Gambar 2). Optimasi ekstraksi RNA total juga telah berhasil dilakukan menggunakan *Isogen RNA Extraction Kit* dari masing-masing sampel.

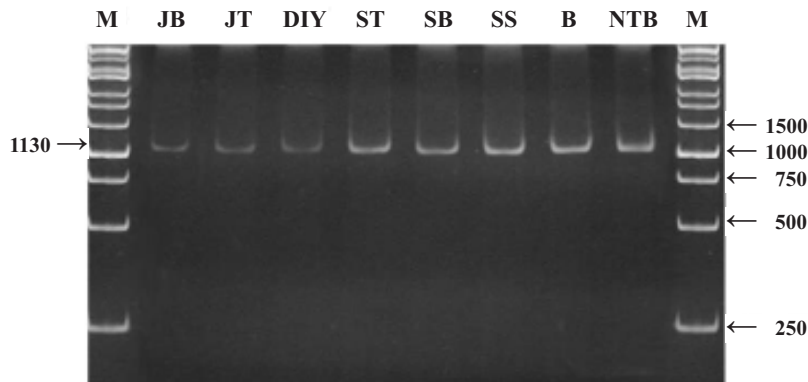
Analisis PCR untuk deteksi RTBV dari tanaman terinfeksi telah banyak dilakukan karena genom RTBV adalah DNA, sehingga DNA total hasil ekstraksi dapat langsung digunakan sebagai *template*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan teknik PCR telah berhasil dideteksi adanya RTBV pada semua tanaman padi terinfeksi yang dikoleksi dari beberapa daerah endemis tungro di Indonesia. Hal tersebut sesuai dengan kondisi pertanaman di lapangan bahwa gejala tanaman padi terinfeksi oleh RTBV berupa daun menguning

hingga oranye. RTBV merupakan virus yang berperan dalam kemunculan gejala, sedangkan RTSV berperan dalam penularan (Dahal *et al.*, 1990). Hasil PCR ditunjukkan dengan adanya satu pita DNA yang sangat jelas dengan ukuran sekitar 430 bp yang secara konsisten teramplifikasi dari semua sampel (Gambar 3). Berdasarkan primer spesifik yang digunakan, target amplifikasi primer adalah sekuen basa nukleotida pada *open reading frames* (ORF) II di dalam genom RTBV. Genom RTBV berukuran sekitar 8 kbp, mempunyai empat ORF yang mengkode empat protein masing-masing 24 kDa, 12 kDa, 194 kDa, dan 46 kDa (Herzog *et al.*, 2000). Berdasarkan sekuen lengkap RTBV di GenBank Database, target amplifikasi primer adalah sekuen basa nukleotida antara 576–1006 (430 bp). Target tersebut sesuai dengan posisi pita DNA pada gel elektroforesis, menunjukkan bahwa teknik PCR dengan spesifik primer sangat sensitif dalam mendeteksi keberadaan RTBV di dalam tanaman terinfeksi.

Deteksi molekuler RTSV di Indonesia belum pernah dilakukan sebelumnya. Diketahui bahwa genom RTSV adalah RNA, sehingga teknis pelaksanaannya lebih sulit dilakukan dari pada RTBV. Pembentukan cDNA menggunakan *First Strand cDNA Synthesis Kit* dari RNA total sebagai *template* telah berhasil dilakukan. Dengan teknik



Gambar 3. Pita DNA Rice tungro bacilliform virus (RTBV) hasil amplifikasi PCR: M= Marker (1 kb DNA Ladder); JB= Subang (Jabar); JT= Magelang (Jateng); DIY= Sleman; ST= Donggala (Sulteng); SS= Sidrap (Sulsel); SB= Polman (Sulbar); B= Tabanan (Bali); Lombok Tengah (NTB)



Gambar 4. Pita DNA Rice tungro spherical virus (RTSV) hasil amplifikasi PCR: M= Marker (1 kb DNA Ladder); JB= Subang (Jabar); JT= Magelang (Jateng); DIY= Sleman; ST= Donggala (Sulteng); SS= Sidrap (Sulsel); SB= Polman (Sulbar); B= Tabanan (Bali); Lombok Tengah (NTB)

RT-PCR telah berhasil dideteksi adanya RTSV dari tanaman terinfeksi yang sebelumnya sudah terdeteksi adanya RTBV. Hal tersebut menunjukkan bahwa dalam satu tanaman terinfeksi RTBV dan RTSV. Sesuai dengan kondisi gejala serangan di lapangan bahwa apabila tanaman terinfeksi RTSV dan RTBV maka gejala yang ditimbulkan lebih parah dari pada hanya terinfeksi oleh salah satu virus saja yaitu daun menguning terpelintir, tanaman kerdil dan jumlah anakan berkurang. Hasil RT-PCR ditunjukkan dengan adanya satu pita DNA berukuran kurang lebih 1130 bp yang secara konsisten teramplifikasi pada semua sampel (Gambar 4). Berdasarkan primer spesifik yang digunakan, target amplifikasi primer adalah sekuen basa nukleotida penyandi *coat protein* 1 dan 2 (CP1 dan CP2) dalam genom RTSV. Genom RTSV meliputi beberapa *coding region* CP1, CP2, CP3, *nucleotide triphosphate* (NTP), *protease* (PRO),

dan *polymerase* (POL) (Azzam & Chancellor, 2002). Berdasarkan sekuen lengkap RTSV di GenBank Database, target amplifikasi primer adalah sekuen basa nukleotida antara 2494–3608 (1114 bp). Target tersebut sesuai dengan posisi pita DNA pada gel elektroporesis, menunjukkan bahwa teknik RT-PCR dengan spesifik primer sangat sensitif dalam mendeteksi keberadaan RTSV di dalam tanaman terinfeksi. Analisis gen CP RTSV telah digunakan dalam deteksi keragaman genetik RTSV yang berasal dari Bangladesh, India, Malaysia, Thailand, dan Philipina (Zhang *et al.*, 1997).

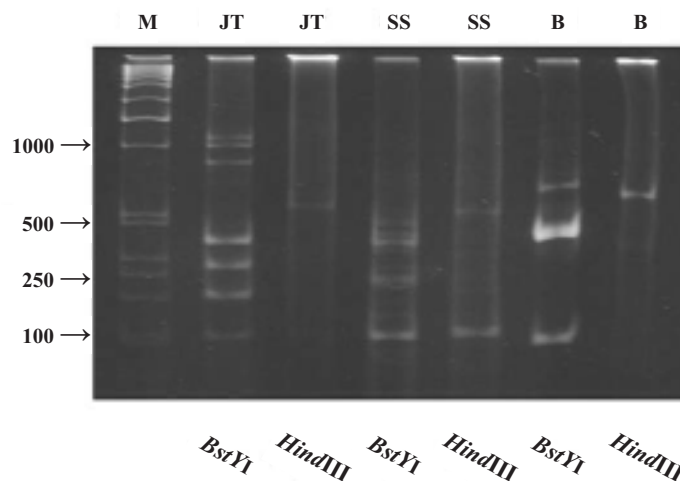
Analisis Keragaman RTV

Teknik molekuler telah banyak dimanfaatkan dalam analisis keragaman genetik organisme karena lebih efisien, ketepatannya tinggi dan lebih terpercaya. Keragaman strain virus tungro dapat teridentifikasi berdasarkan perbedaan sekuen DNA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa teknik RFLP

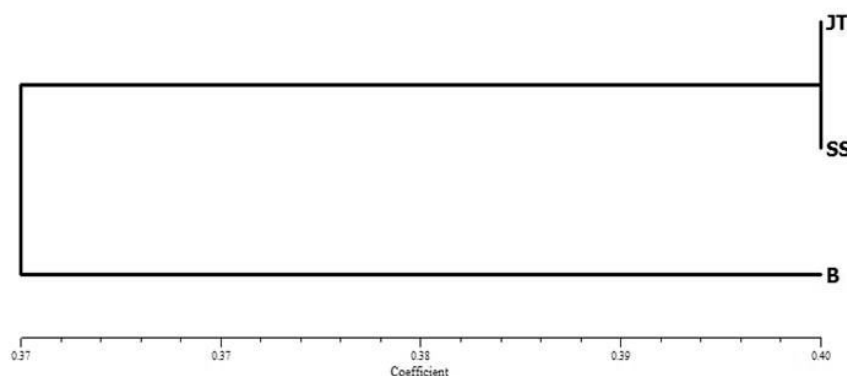
dapat digunakan untuk membedakan adanya empat strain RTBV di Filipina. Strain G1, G2, Ic, dan L dapat dibedakan berdasarkan pola potongan pita DNA setelah dianalisis dengan enzim restriksi *EcoRI* dan *EcoRV* (Cabauatan *et al.*, 1998). Melalui analisis sekuen DNA didapatkan tiga kelompok strain RTBV yaitu: Serdang; G1 dan Ic; serta Phi-1, Phi-2, Phi-3, dan G2. Variasi sekuen kelompok strain RTBV tersebut menunjukkan adanya rekombinasi sebagai akibat dari proses mutasi DNA melalui mekanisme *substitutions*, *insertions* atau *deletions* pada urutan nukleotida (Cabauatan *et al.*, 1999). Teknik PCR-RFLP telah digunakan untuk mengetahui variabilitas RTBV dari berbagai daerah di India serta menunjukkan adanya infeksi campuran antara strain RTBV dalam satu daerah yang sama (Joshi *et al.*, 2003). Perbedaan strain RTSV-Vt6 dengan RTSV-A-Shen berdasarkan virulensinya pada varietas tahan RTSV (TKM6) dapat diketahui secara molekuler (Isogai *et al.*, 2000). Dengan teknik molekuler dapat

dilakukan identifikasi keragaman genetik strain virus tungro dari berbagai daerah di Indonesia serta pemetaan penyebaran berdasarkan letak geografi dan hubungan kekerabatannya. Di dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis RFLP terhadap RTBV karena ukuran DNA hasil amplifikasi PCR sangat pendek. Hasil analisis RFLP terhadap RTSV menunjukkan bahwa pita DNA dapat dipotong dengan enzim *BstYI* dan *HindIII* (Gambar 5).

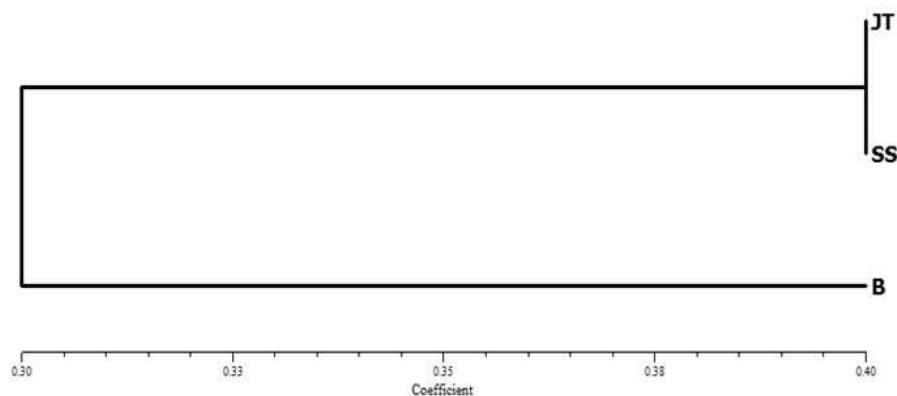
Analisis RFLP dilakukan terhadap isolat Magelang (Jateng), Sidrap (Sulsel), dan Tabanan (Bali). Hal tersebut untuk mengetahui secara garis besar adanya keragaman RTSV di Jawa dan luar Jawa. Hasil analisis RFLP menggunakan enzim *BstYI* menunjukkan bahwa ketiga isolat dapat dipotong dan menghasilkan pita DNA dengan jumlah dan ukuran yang berbeda. Demikian juga hasil analisis RFLP menggunakan enzim *HindIII*. Namun demikian hasil potongan dengan enzim *BstYI* lebih kompleks dari pada hasil potongan dengan enzim *HindIII*. Pola potongan pita DNA



Gambar 5. Pita potongan DNA RTSV hasil analisis RFLP dengan enzim *BstYI* dan *HindIII*: M= Marker (1 kb DNA Ladder); JT= Magelang (Jateng); SS= Sidrap (Sulsel); B= Tabanan (Bali)



Gambar 6. Dendrogram hubungan kekerabatan RTSV isolat Jawa (JT), Bali (B) dan Sulawesi (SS) berdasarkan analisis RFLP menggunakan enzim *BstYI*



Gambar 7. Dendrogram hubungan kekerabatan RTSV isolat Jawa (JT), Bali (B) dan Sulawesi (SS) berdasarkan analisis RFLP menggunakan enzim *HindIII*

yang terbentuk menunjukkan adanya keragaman isolat RTSV. Hubungan kekerabatan antara RTSV dari Jawa dan luar Jawa diketahui berdasarkan keragaman genetiknya. Hasil analisis kekerabatan menunjukkan bahwa RTSV isolat asal Jawa sekerabat dengan isolat asal Sulawesi dan keduanya berbeda dengan isolat asal Bali (Gambar 6 dan 7).

Penggunaan teknik PCR dengan primer spesifik untuk virus tungro akan mempercepat dalam deteksi penyakit tungro serta menghasilkan data yang lebih akurat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa deteksi virus tungro pada persemaian dan wereng hijau yang dilakukan menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik untuk virus tungro terutama RTBV menunjukkan sensitivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan deteksi menggunakan teknik *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (Takahashi *et al.*, 1993). Deteksi keberadaan RTBV dan RTSV dari satu tanaman secara simultan dengan teknik multipleks RT-PCR terhadap cDNA dari RNA total hasil ekstraksi merupakan teknik terbaru yang lebih efisien dalam deteksi virus tungro (Periasamy *et al.*, 2006).

Berdasarkan intensitas penyakit yang ditimbulkan telah diketahui adanya variasi virulensi virus tungro dan koloni wereng hijau dari berbagai daerah endemis di Indonesia (Widiarta & Kusdianan, 2002). Variasi virulensi virus tungro dan tekanan seleksi koloni wereng hijau merupakan kompleksitas penyebab terjadinya epidemi penyakit tungro. Perbedaan virulensi dan efisiensi penularan menunjukkan adanya keragaman strain virus tungro dan biotipe wereng hijau. Perbedaan geografis dan intensitas interaksi virus dan vektor dengan tanaman menyebabkan adanya variasi strain virus tungro. Virulensi strain virus tungro umumnya bersifat

spesifik lokasi. Virulensi strain virus tungro di Asia Tenggara berbeda dengan di Asia Selatan (Azzam & Chancellor, 2002). Virulensi virus ditentukan oleh keberadaan gen-gen yang bertanggung jawab terhadap patogenisitas, sehingga perbedaan virulensi menunjukkan adanya variasi genetik. Berdasarkan teknik RFLP dan analisis sekuen partial, RTBV di Asia dibagi menjadi dua kelompok yaitu *India Subcontinent* dan *Southeast Asia Continent* (Fan *et al.*, 1996). Analisis sekuen terhadap dua isolat RTSV dari daerah yang berbeda di India menunjukkan bahwa keduanya berhubungan erat dengan RTSV-Vt6 dari Philipina (Verma & Dasgupta, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa keberadaan RTBV dan RTSV di dalam tanaman terinfeksi telah berhasil dideteksi dengan teknik PCR. Keragaman genetik RTSV dapat diketahui dengan teknik RFLP terhadap DNA hasil PCR. Dengan adanya keragaman genetik tersebut, diduga terdapat perbedaan strain RTSV. Berdasarkan adanya variasi strain virus tungro, keberadaan varietas padi berdasarkan sifat ketahanan terhadap virus tungro sangat berperan dalam perkembangan epidemi penyakit tungro. Epidemi akan terjadi apabila penanaman suatu varietas tidak sesuai dengan strain virus daerah setempat, artinya bahwa suatu varietas tertentu hanya sesuai ditanam di daerah tertentu. Pemantauan perkembangan strain virus tungro dapat dengan cepat dilakukan secara molekuler sehingga dapat dilakukan pewilayahan distribusi varietas berdasarkan keberadaan strain virus tungro dalam rangka pengendalian penyakit tungro spesifik lokasi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Litbang Pertanian Deptan RI yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Kerjasama Kemitraan Penelitian Pertanian dengan Perguruan Tinggi (KKP3T).

DAFTAR PUSTAKA

- Azzam, O. & T.C.B. Chancellor. 2002. The Biology, Epidemiology, and Management of Rice Tungro Disease in Asia. *Plant Disease* 86: 88–100.
- Baehaki, S.E. & H. Suharto. 1985. *Penyakit Tungro*. Makalah Temu Lapang Pengendalian Penyakit Tungro di Banyumas, 18–19 September 1985. 48 p.
- Cabauatan, P.Q., M. Arboleda, & O. Azzam. 1998. Differentiation of Rice Tungro Bacilliform Virus Strains by Restriction Analysis and DNA Hybridization. *Journal of Virological Methods* 76: 121–126.
- Cabauatan, P.Q., U. Melcher, K. Ishikawa, T. Omura, H. Hibino, H. Koganezawa, & O. Azzam. 1999. Sequence Changes in Six of Rice Tungro Bacilliform Virus and their Phylogenetic Relationships. *Journal of General Virology* 80: 2229–2237.
- Choi, R.I. 2004. Current Status of Rice Tungro Disease Research and Future Program. p. 3–14. In A. Hasanuddin, I.N. Widiarta & Sunihardi (eds.), *Strategi Pengendalian Penyakit Tungro: Status dan Program. Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7–8 September 2004.
- Dahal, G., H. Hibino, & R. C. Saxena. 1990. Association of Leafhopper Feeding Behavior with Transmission of Rice Tungro to Susceptible and Resistant Rice Cultivars. *Phytopathology* 80: 371–377.
- Deng, Z.N., A. Gentile, E. Nicolosi, E. Domina, A. Vardi, & E. Tribulato. 1995. Identification on *in vivo* and *in vitro* Lemon Mutants by RAPD Markers. *Journal of Horticultural Science* 70: 117–125.
- Fan, Z., Dahal, G., Dasgupta, I., Hay, J., & Hull, R. 1996. Variation in the Genome of Rice Tungro Bacilliform Virus: Molecular Characterization of Six Isolates. *Journal of General Virology* 77: 847–854.
- Gurr, S.J., M.J. McPherson, & D.J. Bowles. 1992. *Molecular Plant Pathology. Vol. I. A Practical Approach*. Oxford University Press, New York. 213 p.
- Herzog, E., O. Guerra-Peraza, & T. Hohn. 2000. The Rice Tungro Bacilliform Virus Gene II Product Interacts with the Coat Protein Domain of the Viral Gene III Polyprotein. *Journal of Virology* 74: 2073–2083.
- Hibino, H., N. Saleh, & M. Roechan. 1977. Transmission of Two Kinds of Rice Tungro Associated Viruses by Insect Vectors. *Phytopathology* 69: 1266–1268.
- Hibino, H. & R.C. Cabunagan. 1986. Rice Tungro Associated Viruses and their Relation to Host Plants and Vector Leafhopper. *Tropical Agricultural Research Series* 19: 173–182.
- Innis, M.A. & D.H. Gelfald. 1990. Optimization of PCRs. p. 3–12. In Innis, M.A., D.H. Gelfald, J.J. Sninsky, & T.J. White (eds.), *PCR Protocols-A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, Inc, USA.
- Isogai, M., P.Q. Cabauatan, C. Masuta, I. Uyeda, & O. Azzam. 2000. Complete Nucleotide Sequence of Rice Tungro Spherical Virus Genome of the Highly Virulent Strain Vt6. *Virus Genes* 20: 79–85.
- Joshi, R., V. Kumar, & I. Dasgupta. 2003. Detection of Molecular Variability in Rice Tungro Bacilliform Viruses from India Using Polymerase Chain Reaction-/restriction Fragment Length Polymorphism. *Journal of Virological Methods* 109: 89–93.
- Periasamy, M., F.R. Niazi, & V.G. Malathi. 2006. Multiplex RT-PCR, A Novel Technique for the Simultaneous Detection of the DNA and RNA Viruses Causing Rice Tungro Disease. *Journal of Virological Methods* 134: 230–236.
- Praptana, R.H. & M. Yasin. 2008. Peranan Bioteknologi dalam Pengelolaan Penyakit Tungro. *Iptek Tanaman Pangan* 3: 98–111.
- Raga, I.N., W. Murdita, M.P.L. Tri, S.W. Edi, & Oman. 2004. Sistem Surveillance Antisipasi Ledakan Penyakit Tungro di Indonesia. p. 49–59. In A. Hasanuddin, I.N. Widiarta, & Sunihardi (eds.), *Strategi Pengendalian Penyakit Tungro: Status dan Program, Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7–8 September 2004.
- Siwi, S.S. & Y. Suzuki. 1991. The Green Leafhopper (*Nephotettix* spp.): Vector of Rice Tungro Virus Disease in Southeast Asia, Particularly in Indonesia and its Management. *Indonesian Agricultural Research and Development Journal* 13: 8–15.

- Soetarto, A., Jasis, S.W.G. Subroto, M. Siswanto, & E. Sudiyanto. 2001. Sistem Peramalan dan Pengendalian OPT dalam Mendukung Sistem Produksi Padi Berkelanjutan. p. 35–48. In I. Las, Suparyono, A.A. Daradjat, H. Pane, U.S. Nugraha, H.M. Toha, A. Tyasdjaya, & O.S. Lesmana (eds.), *Prosiding Lokakarya Padi: Implementasi Kebijakan Strategi untuk Peningkatan Produksi Padi Berwawasan Agribisnis dan Lingkungan*. Puslitbang Tanaman Pangan Bogor.
- Sumardiyono, Y.B., S. Hartono, & I. Suswanto. 2004. Interaksi RTV dengan Wereng Hijau dan Daur Penyakit Tungro pada Padi. p. 37–47. In A. Hasanuddin, I.N. Widiarta, & Sunihardi (eds.), *Strategi Pengendalian Penyakit Tungro: Status dan Program, Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7–8 September 2004.
- Suranto. 2004. Pengelolaan Virus Tungro Melalui Pendekatan Bioteknologi. Status dan Program Penelitian Pengendalian Terpadu Penyakit Tungro. p. 15–25. In A. Hasanuddin, I.N. Widiarta, & Sunihardi (eds.), *Strategi Pengendalian Penyakit Tungro: Status dan Program, Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7–8 September 2004.
- Suzuki, Y., I.G.N. Astika, I.K.R. Widrawan, I.G.N. Gede, I.N. Raga, & Soeroto. 1992. Rice Tungro Disease Transmitted by Green Leafhoppers: its Epidemiology and Forecasting. *JARQ* 26: 98–104.
- Takahashi, Y., F.R. Tiongco, P.Q. Cabauatan, H. Koganezawa, H. Hibino, & T. Omura. 1993. Detection Rice Tungro Bacilliform Virus by Polymerase Chain Reaction for Assessing Mild Infection of Plants and Viruliferous Vector Leafhoppers. *Phytopathology* 83: 655–659.
- Verma, V. & I. Dasgupta. 2007. Sequence Analysis of the Complete Genomes of Two Rice Tungro Spherical Virus Isolates from India. *Archives of Virology* 152: 645–648.
- Widiarta, I.N. & D. Kusdianan. 2002. Identifikasi Strain Virus Tungro, p. 61–62. In H.M. Toha, Satoto, A. Setyono, Sudir, & O.S. Lesmana (eds.), *Laporan Tahunan 2002*. Balai Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi.
- Widiarta, I.N., Yulianto, & A. Hasanuddin. 2003. Pengendalian Terpadu Penyakit Tungro dengan Strategi Eliminasi Peranan Virus Bulat. Kebijakan Perberasan dan Inovasi Teknologi Padi. p. 513–527. In B. Suprihatno, A.K. Makarim, I.N. Widiarta, Hermanto, & A.S. Yahya. *Buku 2: Kebijakan Perberasan dan Inovasi Teknologi Padi*. Puslitbangtan.
- Widiarta, I.N., Burhanuddin, A.A. Daradjat, & A. Hasanuddin. 2004. Status dan Program Penelitian Pengendalian Terpadu Penyakit Tungro. p. 61–89. In A. Hasanuddin, I.N. Widiarta, & Sunihardi (eds.), *Strategi Pengendalian Penyakit Tungro: Status dan Program, Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7–8 September 2004.
- Zhang, S., G. Lee, J.W. Davies, & R. Hull. 1997. Variation in Coat Protein Genes among Five Geographically Different Isolates of Rice Tungro Spherical Virus. *Archives of Virology* 142: 1873–1879.