

Deteksi Virus Bilur Kacang Tanah dari Biji Kacang Tanah menggunakan Teknik Hibridisasi Nonradioaktif

Ifa Manzila¹, R. Suseno², S. Hendrastuti H.², dan J. Harjosudarmo¹

¹Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan, Bogor

²Institut Pertanian Bogor

ABSTRAK

Teknik hibridisasi menggunakan DNA berciri digoxigenin (Dig-sistem) telah dilakukan untuk mendeteksi virus bilur kacang tanah (*Peanut Stripe Virus*, PStV) dari benih kacang tanah. Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa Dig-sistem dapat mendeteksi PStV dari contoh daun kacang tanah, tetapi ketika diadopsi untuk mendeteksi virus di dalam benih, PStV tidak dapat terdeteksi. Menggunakan bufer yang telah dimodifikasi, yaitu 1 M Tris-HCl, pH 7,6, mengandung 200 mM LiCl, 2% SDS, dan 20 mM EDTA yang diikuti dengan perlakuan pemberian fenol/kloroform dan ditambah 1/10 M sodium asetat, reaksi positif dapat terlihat. PStV dapat terdeteksi sampai 100 kali lipat lebih peka ketika deteksi menggunakan penciri yang digandakan menggunakan PCR dengan pasangan primer PST-1 - PST-2 atau PST-1 - PST-4. Tidak semua biji yang dihasilkan oleh tanaman terinfeksi akan menghasilkan biji terinfeksi PStV.

Kata kunci: Nonradioaktif, hibridisasi, PCR, PStV

ABSTRACT

Non-radioactive hybridization technique using digoxigenin (Dig-System) was employed to detect Peanut Stripe Virus (PStV) from groundnut seeds. In the previous report, the Dig-system was able to detect PStV from the leaf samples, but failed to detect the virus from the seeds. By using a modified extraction buffer containing only 1 M Tris-HCl, pH 7.6, 200 mM LiCl, 2% SDS, and 20 mM EDTA followed by treating with phenol/chloroform and adding of 1/10 M of sodium acetate, a positive signal was obtained. When detected using probe generating by PCR with pairs of primers PST-1 - PST-2 or PST-1 - PST-4, the sensitivity of detection was improved by 100 times. Not all of the seeds produced by infected plants, were contaminated by PStV.

Key words: Non-radioactive, hybridization PCR, PStV

PENDAHULUAN

Penggunaan teknik DNA komplementer yang diberi ciri untuk mendeteksi virus tanaman sudah lama dilaporkan. Virus bilur kacang tanah (*Peanut Stripe Virus*, PStV) merupakan patogen penting pada tanaman kacang-kacangan di Asia Tenggara, RRC, dan India (Teycheney dan Dietzgen, 1994). PStV dapat menimbulkan gejala bercak-bercak hijau tua yang tidak beraturan dan mosaik pada daun tanaman kacang tanah. Penyakit tersebut tersebar hampir di seluruh pertanaman kacang tanah di Indonesia (Saleh *et al.*, 1989).

Menurut Demski *et al.* (1984), PStV dapat ditularkan secara mekanik oleh se-rangga dan dapat terbawa biji tanaman sakit. Di RRC penularan PStV melalui biji bervariasi antara 1-8%, tergantung fase pertumbuhan tanaman pada waktu terinfeksi (Xu, 1989). Di Indonesia, intensitas penularan PStV melalui biji berkisar antara 2,7-4,0% bergantung pada kultivar kacang tanah (Sudarsono *et al.*, 1997). Selain menginfeksi kacang tanah, PStV dapat pula menginfeksi tanaman kacang-kacang-an lain, seperti *Glycine max*, *Lupinus albus*, *Nicotiana benthamiana*, *Trifolium incarnatum*, *T. subterreneus*, *T. vesiculosum*, *Vigna unguiculata*, *V. radiata*, *Crotalaria incana*, *Desmodium trifolium*, *Indigofera amoena*, *Peuralia phaseoloides*, *Stylosanthes capitata*, dan *S. scraba* (Natural *et al.*, 1989; Wongkaew, 1989; Demski *et al.*, 1984).

Saat ini, pendekatan untuk mengatasi serangan PStV dilakukan melalui pengendalian terpadu, antara lain penggunaan varietas tahan. Hasil skrining 11.000 genotipe kacang tanah koleksi ICRISAT yang dilakukan di Indonesia menunjukkan bahwa semua genotipe rentan terhadap PStV (Baliadi dan Saleh, 1989). Alternatif lain pengendalian yang murah dan mudah adalah penggunaan benih bebas virus dengan tujuan menghindari atau menghilangkan sumber infeksi dan penular virus. Saleh *et al.* (1991) melaporkan bahwa penggunaan benih sehat dapat menurunkan laju perkembangan penyakit, sedangkan penggunaan insektisida, penyiangan, dan pencabutan tanaman sakit kurang efektif untuk mengendalikan PStV pada kacang tanah.

Upaya melakukan deteksi dini PStV penting dilakukan. Teknik *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) banyak dilakukan untuk mendeteksi virus tanaman dan hasilnya cukup memuaskan karena dapat dilakukan secara massal. Teknik deteksi molekuler dengan cara hibridisasi DNA komplementer sangat memberikan harapan, karena kebanyakan virus telah diketahui sekuen DNANYA. Berdasarkan data sekuen tersebut dapat didisain primer-primer yang dapat digunakan untuk membentuk DNA komplementer baik menggunakan DNA polimerase atau PCR. Pada waktu pertama kali dikembangkan, DNA komplementernya diciri dengan zat yang radioaktif (Saldarelli *et al.*, 1996; Fouly *et al.*, 1992). Kemudian dikembangkan penciri yang tidak radioaktif, misalnya menggunakan biotin, zat fluoresen ataupun digoxigenin. Dietzgen *et al.* (1994) telah berhasil mendeteksi PStV dari tanaman sakit, tetapi belum berhasil mendeteksi PStV dari ekstrak biji yang berasal dari tanaman sakit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan teknik deteksi yang dapat digunakan untuk mendeteksi PStV dalam benih kacang tanah dengan memodifikasi resep bufer yang digunakan untuk ekstraksi sampelnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan April sampai dengan Desember 1998 di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Bioteknologi Tanaman Pangan Bogor.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tanaman kacang tanah bergejala bilur kacang tanah berasal dari Bogor, Pasuruan, dan Jombang. Tanaman indikator *Chenopodium amaranticolor* dan *Phaseolus vulgaris* (*Top Crop*), kacang tanah varietas Gajah umur 1, 2, 3, dan 4 minggu, dan bahan untuk pengujian hibridisasi nonradioaktif DNA-terciri.

Isolasi PStV dari Contoh Tanaman yang Terinfeksi di Lapang

Isolat yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Bogor, Pasuruan, dan Jombang. Tanaman *C. amaranticolor* dan *P. vulgaris* cv *Top Crop* digunakan sebagai tanaman indikator untuk memisahkan virus PStV dengan PMoV. Sebagai sumber inokulum digunakan daun muda kacang tanah yang berasal dari lapang dan diduga terinfeksi PStV. Daun digerus dalam bufer ekstraksi (0,05 M bufer potasium fosfat/K-PB, pH 7,0) dengan perbandingan 1 : 2 g/v. Selanjutnya cairan tersebut digunakan untuk menginokulasi secara mekanik pada daun *C. amaranticolor* dan *P. vulgaris* yang telah ditaburi carborundum 600 mesh. Setelah 7-14 hari gejala lesio lokal biasanya akan muncul. Gejala lesio lokal pada *C. amaranticolor* diambil dan digunakan untuk keperluan selanjutnya.

Pembuatan Probe (DNA-terciri) Digoxigenin

Pada dasarnya prosedur pembuatan probe mengikuti petunjuk dari pabrik pembuatnya (Boehringer Mannheim). Pasangan primer yang digunakan adalah PST-1 - PST-2 atau PST-1 - PST-4. Mesin thermal cyclernya diprogram sebagai berikut:

1. Denaturasi pada suhu 95°C selama 3 menit, dilakukan hanya sekali.
2. Siklus berikutnya dilakukan 35 kali dengan suhu 95°C 45 detik, 55°C 45 detik, dan 72°C selama 90 detik.
3. Kemudian diberikan waktu pemanjangan pada suhu 72°C selama 10 menit.
4. Terakhir 15°C hingga digunakan selanjutnya.

Pengambilan Contoh Biji

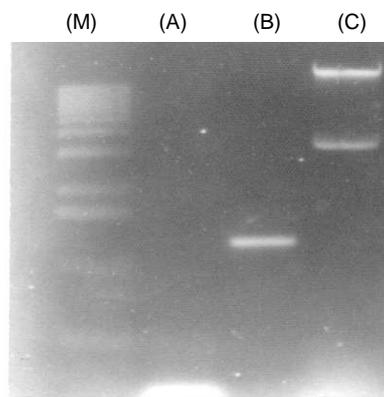
Contoh biji yang akan digunakan berasal dari masing-masing biji perlakuan. Tiap biji diambil sebagian kecil (irisian kecil) yang akan digunakan dalam pendeteksian biji tersebut. Sebagian potongan biji lainnya ditanam di dalam pot berisi tanah steril untuk ditumbuhkan. Kemudian dilakukan pengamatan gejala pada tanaman di tiap-tiap pot tersebut. Pengamatan ini dikonfirmasi dengan hasil deteksi terhadap biji yang sama.

Ekstraksi Contoh Biji

Empat macam bufer ekstraksi yang digunakan dalam pendeteksian, yaitu (a) bufer yang mengikuti prosedur standar menurut Dietzgen *et al.* (1994), (b) Bijaisoradat dan Khun (1988), (c) Varsha Wesley (ICRISAT Training Course), (d) Angelika/Tony Muran (komunikasi dengan Reddy). Pada penelitian pendahuluan, semua hasil deteksi negatif, hanya perlakuannya dengan bufer C yang memberikan hasil positif. Oleh karena itu, hanya bufer ekstraksi C yang digunakan dalam pen-deteksi-an selanjutnya. Tahapan proses deteksi adalah 0,2 g jaringan biji dilumat-kan dalam 0,5 ml bufer ekstraksi C (1 M Tris-HCl, pH 7,6; 200 mM LiCl, 2% SDS, 20 mM EDTA) dan ditambahkan 450 fenol/kloroform, inkubasi 5 menit pada suhu 65°C. Sebanyak 350 µl supernatan dipindahkan dalam tabung eppendorf lain dan dengan volume yang sama ditambahkan fenol/kloroform dan disentrifugasi. Pada 300 µl supernatan ditambahkan 3 M natrium asetat, 600 µl etanol kemudian disimpan selama 2 jam pada suhu -20°C dan disentrifugasi 20 menit pada suhu 4°C. Pelet dikeringkan dengan pompa vakum dan diresuspensi dalam 500 µl D₂O, kemudian diteteskan pada membran nilon.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Amplifikasi penanda menggunakan pasangan primer PST-1 dan PST-2 setelah diamati pada gel elektroforesis 1% memperoleh pita DNA dengan ukuran 234 bp. Apabila amplifikasi menggunakan pasangan primer PST-1 dan PST-4, diperoleh pita DNA dengan ukuran 1,2 kb (Gambar 1). Penggunaan pasangan primer ini sangat penting, karena sangat berpengaruh terhadap kepekaan hasil deteksi. Pasangan primer ini dirancang agar dapat komplementer dengan bagian-bagian tertentu dari genom PSTV. Primer PST-1

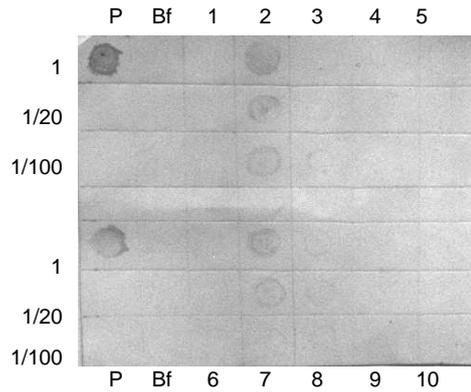


M = markah 1 kb DNA ladder, A = PST-1 dan PST-2, B = PST-1 dan PST-4, C = plasmid pHS 4,2 kb

Gambar 1. Hasil amplifikasi PCR DNA tercuri nonradio-aktif dengan pasangan primer

komplementer dengan bagian 3'UTR (*untranslated region*) PST-2 yang homolog dengan bagian 3' sistron CP, dan PST-4 homolog dengan bagian 3' sistron Nib. Urutan nukleotida tersebut merupakan susunan spesifik untuk genom PStV. Dari hasil penelitian Lindbo *et al.* (1992), diketahui bahwa bagian tengah dari CP kelompok potyvirus sama, hanya pada ujung amino (N) dan karboksi (C) sangat bervariasi dari virus yang satu dengan virus lainnya.

Deteksi dengan teknik hibridisasi nonradioaktif menggunakan CP-DNA yang dilabel digoxigenin (DIG-cDNA) menunjukkan bahwa ketiga isolat PStV dapat bereaksi positif terhadap PStV pada daun tanaman yang terinfeksi. Dengan menggunakan metode ekstraksi Dietzgen (1997), tingkat kemampuan deteksi pada daun mencapai pengenceran 1/2500 (Gambar 2), tetapi negatif untuk biji. Dari modifikasi bufer ekstraksi deteksi tersebut menunjukkan bahwa benih yang berasal dari tanaman yang terinfeksi pada umur tanaman 1, 2, 3, dan 4 minggu yang diuji bereaksi positif. Pada penggunaan bufer ekstraksi tersebut virus pada benih dapat terdeteksi sampai pengenceran 100 kali. Dari hasil modifikasi bufer ekstraksi diketahui bahwa Tris-HCl merupakan pelarut organik, LiCl dan SDS dapat mengikat partikel virus dan mengendapkan nukleotida, serta fenol/kloroform membantu mengurangi/mengeliminir kandungan lemak pada biji. Hal tersebut didukung hasil penelitian yang dilakukan oleh Harper dan Creamer (1995), yaitu deteksi yang dilakukan terhadap virus gemini (*squash leaf curl geminivirus*, *beet curly top geminivirus*, *beet yellows closterovirus*, dan *lettuce infectious yellows*) menunjukkan bahwa untuk mendapatkan efektifitas pendeteksian diperlukan bufer ekstraksi tertentu. Selain itu, dapat diketahui pula bahwa dengan metode dot blot hibridisasi ini mampu membedakan sifat infektivitas dari masing-masing isolat (strain). Isolat Bogor lebih lemah dibandingkan dengan isolat Pasuruan dan Jombang, hal ini ditunjukkan dengan lemah kuatnya signal pada membran. Keberhasilan pengembangan metode ini kemudian digunakan untuk melakukan pengujian terhadap 10 biji yang berasal dari tanaman induk terinfeksi PStV. Ternyata dari 10 biji yang diuji hanya dua biji yang bereaksi positif dengan menampilkan signal pada membran. Hal ini membuktikan bahwa tidak semua biji yang dihasilkan tanaman induk terinfeksi PStV terinfeksi (Gambar 3). Pada biji yang terinfeksi, virus dapat terdeteksi sampai pengenceran 1/100 kali dengan pengenceran awal 0,2 g/500 µl bufer.

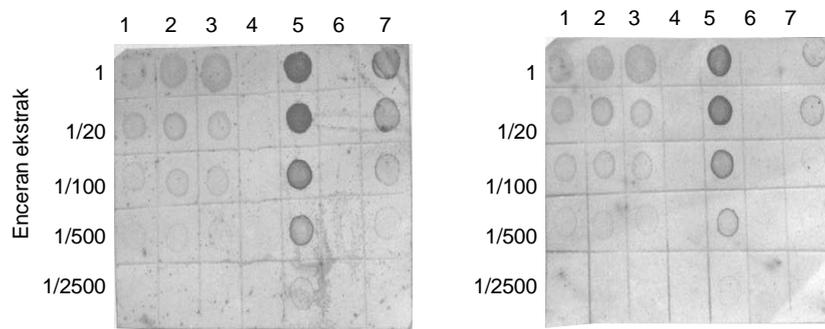


2 dan 7 = positif terinfeksi PSTV, P = kontrol positif, Bf = kontrol negatif

Gambar 3. Deteksi biji dengan metode hibridisasi nonradioaktif DNA terciri

KESIMPULAN

1. Metode hibridisasi nonradioaktif dengan penanda DNA dapat digunakan untuk mendeteksi PSTV di dalam benih kacang tanah dengan bufer ekstraksi C.
2. Kepekaan metode hibridisasi nonradioaktif untuk mendeteksi PSTV dari daun mencapai enceran 2500 kali, sedangkan dari dalam benih kacang



A = DNA terciri dengan primer PST-1 dan PST-2, B = DNA terciri dengan primer PST-1 dan PST-4; (1, 2, 3, dan 4) berturut-turut isolat Bogor, Pasuruan, Jombang, daun sehat, 5 = kontrol positif pHS/AU, 6 = kontrol negatif bufer, 7 = kontrol positif pHS/IN10⁻⁵ ug

Gambar 2. Hasil deteksi isolat PSTV pada daun dengan DNA terciri nonradioaktif

tanah hanya mencapai 100 kali.

3. Tidak semua biji yang berasal dari tanaman kacang tanah yang terinfeksi PSTV mengandung PSTV.

DAFTAR PUSTAKA

- Baliadi, Y. dan N. Saleh. 1989.** Pendugaan kehilangan hasil akibat serangan *peanut stripe virus* pada tanaman kacang tanah. *Dalam* Risalah Seminar Tahunan Hasil Penelitian Tanaman Pangan. Balittan Malang. hlm. 328-336.
- Bijaisoradat, M. and C.W. Khun. 1988.** Detection of two viruses in peanut seeds by complementary DNA hybridisation tests. *Plant Disease* 72:956-959.
- Demski, D.V.R. Reddy, S. Wongaew, M. Kameva-Iwaki, N. Saleh, and Z. Xu. 1984.** Peanut stripe a new seed borne potyvirus from China infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* 78(7):708-711.
- Dietzgen, R.G. 1997.** Detection of groundnut viruses by molecular hybridization with nonradioactive DNA probe. Queensland Agricultural Biotechnology Centre. Australia. p. 1-6.
- Dietzgen, R.G., Z. Xu, and P.Y. Teycheney. 1994.** Digoxigenin-labeled cRNA probe for the detection of two potyviruses infecting peanut (*Arachis hypogaea*). *Plant Disease* 78:708-711.
- Fouly, H.M., L.L. Domier, and C.J. D'Arcy. 1992.** A rapid chemiluminescent detection methode for barley yellow dwarf virus. *J. Virol. Meth.* 39:291-298.
- Harper, K. and R. Creamer. 1995.** Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probe. *Plant Disease* 79:563-567.
- Lindbo, J.A., L. Silva-Rosales, and W.G. Dougherty. 1992.** Pathogen divise resistance to potyvirus: working, but why? Department of Microbiology. Oregon State University.
- Natural, M.P., F.L. Mangaban, and L.D. Valencia. 1989.** Groundnut virus research in the Phillipines. *In* Summary Proceeding of 2nd Coordinators Meeting on Peanut Stripe Virus. 1-4 August 1989. ICRISAT, India. p. 12.
- Saleh, N., K.J. Middleton, Y. Baliadi, N. Horn, and D.V.R. Reddy. 1989.** Research on peanut stripe virus in Indonesia. *In* Summary Proceeding of 2nd Coordinators Meeting on Peanut Stripe Virus. 1-4 August 1989. ICRISAT, India. p. 9-10.

- Saleh, N., Y. Baliadi, A. Munif, S. Karsono, Riwanodja, dan Suwono. 1991.** Pengendalian *peanut stripe virus* pada kacang tanah dengan cara kultur teknis dan insektisida. *Dalam* Risalah Seminar Tahunan Hasil Penelitian Tanaman Pangan. Balittan Malang. hlm. 193-198.
- Saldarelli, P., L. Barbarossa, F. Grieco, and D. Gallitelli. 1996.** Digoxigenin-labeled riboprobes applied to phytosanitary certification of tomato in Italy. *Plant Disease* 80:1343-1346.
- Sudarsono, S. Tumbelaka, dan S. Ilyas. 1997.** Penurunan hasil akibat *peanut stripe virus* dan penularan virus lewat benih pada kacang tanah. *Hayati* 4(3):55-58.
- Teycheney, P.Y. and R.G. Dietzgen. 1994.** Cloning and sequence analysis of the coat protein genes of and Australia Strain of peanut motile an Indonesia "blotch" strain of peanut stripe potyvirus. *Virus Research* 31:235-244.
- Wongkaew, S. 1989.** Groundnut virus research in Thailand. *In* Summary Proceedings of 2nd Coordinators Meeting Peanut Stripe Virus. 1-4 August 1989. ICRISAT, India. p. 18-19.
- Xu, Z. 1989.** Research on peanut stripe virus in people's Republic of China. *In* Summary Proceedings of 2nd Coordinators Meeting on Peanut Stripe Virus. 1-4 August 1989. ICRISAT, India. p. 7.