

Peranan Bioteknologi dalam Pengelolaan Penyakit Tungro

R. Heru Praptana dan M. Yasin¹

Ringkasan

Tungro merupakan salah satu penyakit penting tanaman padi yang menjadi penghambat dalam peningkatan stabilitas produksi padi. Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan, di antaranya dengan penerapan teknologi pengendalian penyakit tungro terpadu yang bertujuan untuk mencegah atau menghindarkan pertanaman dari penularan tungro dengan komponen utama waktu tanam tepat, penggunaan varietas tahan, dan pergiliran varietas tahan. Namun demikian, teknologi tersebut kurang sesuai untuk daerah dengan pola tanam tidak serempak, sehingga dikembangkan strategi pengendalian penyakit tungro dengan eliminasi RTSV. Perkembangan bioteknologi berbasis biologi molekuler dapat digunakan untuk membantu dalam pengendalian penyakit tungro melalui pendekatan biologi, ekologi, dan epidemiologi penyakit tungro. 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 infektif, identifikasi dan karakterisasi strain virus tungro dan biotipe wereng hijau, pemantauan terjadinya resistensi wereng hijau terhadap suatu varietas, munculnya strain virus tungro dan biotipe wereng hijau yang baru, karakterisasi ketahanan varietas terhadap virus tungro dan wereng hijau, perakitan varietas tahan berdasarkan sifat ketahanannya terhadap virus tungro dan wereng hijau serta perakitan varietas transgenik tahan virus tungro. Hal tersebut merupakan tantangan sekaligus peluang bagi para peneliti bioteknologi di Indonesia.

Tungro merupakan penyakit penting tanaman padi yang menjadi masalah dalam peningkatan stabilitas produksi padi nasional dan ancaman bagi ketahanan pangan (Widiarta *et al.* 2003). Tungro disebabkan oleh infeksi ganda dari dua virus yang berbeda, yaitu *rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *rice tungro spherical virus* (RTSV) yang keduanya ditularkan oleh wereng hijau *Nephotettix virescens* secara semipersisten (Hibino and Cabunagan 1986). Potensi hasil varietas padi tidak akan tercapai apabila tanaman tertular virus tungro, bahkan tidak akan diperoleh hasil apabila infeksi virus tungro terjadi sejak awal vegetatif atau tahap persemaian (Hasanuddin 2002). Penyebaran tungro tidak hanya di Indonesia, tetapi juga di beberapa negara

¹ Peneliti pada Loka Penelitian Penyakit Tungro, Lanrang, Sulawesi Selatan

Asia lainnya seperti India, Malaysia, Vietnam, Filipina, dan Thailand (Ling 1979, Suranto 2004). Di Indonesia, kehilangan hasil padi akibat penyakit tungro dalam kurun waktu 1996-2002 mencapai 12.078 t/tahun atau senilai Rp 12-15 milyar (Soetarto *et al.* 2001).

Berbagai usaha pengendalian telah dilakukan, di antaranya dengan penerapan teknologi pengendalian penyakit tungro secara terpadu yang bertujuan untuk mencegah atau menghindarkan pertanaman dari ancaman tungro (*escape strategy*) dengan komponen utama waktu tanam tepat, penggunaan varietas tahan, dan pergiliran varietas tahan. Namun demikian, tidak semua komponen dapat diterapkan, waktu tanam tepat kurang sesuai untuk daerah dengan pola tanam tidak serempak, ketersediaan varietas tahan masih terbatas, sehingga tidak mencukupi untuk pewilayahan dan distribusi berdasarkan sifat ketahanan spesifik lokasi. Perbedaan geografis dan intensitas interaksi virus tungro dan wereng hijau dengan varietas menyebabkan adanya variasi genetik strain virus tungro dan biotipe wereng hijau. Oleh karena itu, pengendalian penyakit tungro harus dilakukan secara komprehensif dengan memperhatikan berbagai aspek, seperti tingkat ketahanan varietas, kepadatan populasi dan efisiensi penularan oleh wereng hijau, penyebaran virus, ketersediaan sumber inokulum, kondisi lingkungan dan sosioekonomi petani (Hasanuddin *et al.* 2001).

Implementasi bioteknologi berbasis biologi molekuler sangat membantu pengendalian penyakit tungro berdasarkan aspek biologi, ekologi dan epidemiologi penyakit. Kemajuan di bidang biologi molekuler telah melahirkan berbagai teknik yang dapat dimanfaatkan dalam pengelolaan penyakit tungro, di antaranya (1) diagnosis penyakit tungro, (2) deteksi dini infeksi virus tungro dan vektor infeksi (mengetahui keberadaan sumber inokulum dan penularannya), (3) identifikasi dan karakterisasi strain virus tungro dan biotipe wereng hijau (keragaman genetik virus tungro dan biotipe wereng hijau berdasarkan perbedaan virulensi virus tungro, efisiensi penularan oleh wereng hijau dan perbedaan geografis), (4) pemantauan resistensi wereng hijau terhadap suatu varietas dan munculnya strain virus tungro dan biotipe wereng hijau yang baru, (5) karakterisasi ketahanan varietas terhadap virus tungro dan wereng hijau (keragaman genetik varietas berdasarkan tingkat ketahanannya), dan (6) perakitan varietas tahan berdasarkan sifat ketahanannya terhadap virus tungro dan wereng hijau (varietas tahan spesifik lokasi) serta perakitan varietas transgenik tahan virus tungro.

Beberapa teknik molekuler atau teknologi DNA yang banyak digunakan dalam penelitian dan pengelolaan hama dan penyakit tanaman dan pengembangan pemuliaan tanaman di antaranya (1) *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) yaitu markah berdasarkan hibridisasi DNA, (2) *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPD) dan *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), yaitu markah yang diidentifikasi menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan menggunakan sekuens-sukuens

nukleotida sebagai primer (Garcia *et al.* 2004) dan 3) *sequence tagged sites* (STS), *sequence characterized amplified regions* (SCARs), *simple sequence repeat* (SSRs) atau mikrosatelit (*microsatellites*) dan *single nucleotide polymorphism* (SNPs), yaitu markah berdasarkan PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik pada DNA target (Azrai 2005). Berdasarkan tujuan, target, efisiensi, dan efektifitasnya, terdapat beberapa modifikasi teknik PCR, di antaranya *reversed transcription-PCR* (RT-PCR), *repetitive-PCR* (Rep-PCR), *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP), dan RT-LAMP (Mori *et al.* 2006). Perkembangan rekayasa genetika melalui metode kloning DNA dan teknologi rekombinan DNA memungkinkan gen tunggal dari suatu varietas dapat ditransfer ke varietas yang lain (teknologi varietas transgenik).

Diagnosis Penyakit Tungro

Tanaman padi yang terinfeksi dua jenis virus tungro akan menunjukkan gejala yang kompleks. Apabila hanya terinfeksi oleh RTBV maka gejala yang ditimbulkan lebih ringan, sedangkan apabila hanya terinfeksi oleh RTSV maka tanaman tidak menunjukkan gejala (Hibino 1987). Secara visual, gejala penyakit tungro sering dikacaukan dengan penyakit yang disebabkan oleh virus yang lain atau akibat kekurangan unsur hara. Diagnosis yang benar akan menentukan ketepatan rekomendasi pengendalian dan bermanfaat dalam kegiatan survei penyakit tungro. Terdapat beberapa metode diagnosis penyakit tungro, baik secara konvensional maupun modern. Metode diagnosis secara konvensional seperti teknik biologi sudah jarang dilakukan karena selain kurang akurat juga memerlukan waktu yang relatif lama. Metode diagnosis yang berkembang saat ini adalah teknik serologi dan hibridisasi asam nukleat. Metode diagnosis secara molekuler berdasarkan hibridisasi asam nukleat menggunakan PCR membuktikan bahwa bahan genetik yang diekspresi dan produk ekspresi gen dapat diisolasi. PCR merupakan salah satu teknik diagnosis secara molekuler dengan prinsip penggandaan DNA secara *in vitro*. Proses PCR berjalan berdasarkan cara replikasi DNA dengan bantuan enzim DNA polimerase dan perubahan sifat fisik DNA terhadap suhu yang terjadi secara simultan dari primer yang komplementer dengan DNA target (Innis *et al.* 1990). Diagnosis secara molekuler mempunyai spesifisitas tinggi terhadap patogen (genus, spesies, strain, patogen baru), akurat, efektif, dan efisien (Gurr *et al.* 1992). Penggunaan teknik PCR dengan spesifik primer untuk virus tungro akan mempercepat proses diagnosis penyakit tungro dan menghasilkan data yang akurat.

Deteksi Virus Tungro

Ketersediaan sumber inokulum merupakan faktor penyebab terjadinya serangan tungro. Eradikasi sumber inokulum pada tahap pascapanen sampai pratanam diperlukan untuk menekan sumber inokulum primer sekecil mungkin dan menghindari infeksi awal virus tungro. Selain berkembang pada ratun tanaman padi yang sebelumnya tertular tungro, virus tungro juga dapat berkembang pada beberapa gulma (Widiarta *et al.* 2004). Eradikasi gulma di areal pertanaman dan sekitarnya akan mengeliminasi perkembangan virus tungro dan menghilangkan tempat bertahan hidup vektor setelah tidak tersedia pertanaman padi. Tingkat infeksi awal penyakit tungro ditentukan oleh populasi wereng hijau infeksius yang migrasi ke pertanaman, sedangkan perkembangan selanjutnya ditentukan oleh tingkat infeksi awal dan kepadatan wereng hijau generasi pertama. Umumnya, gejala tungro belum muncul pada tahap persemaian, namun mulai terlihat pada 21-30 hari setelah tanam (Raga *et al.* 2004). Oleh karena itu, deteksi dini virus tungro pada ratun tanaman padi, gulma di sekitar lahan, persemaian, dan wereng hijau yang ada di wilayah tersebut harus dilakukan sebagai usahaantisipasi perkembangan virus tungro di pertanaman. Deteksi virus tungro pada persemaian dan wereng hijau 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).

Identifikasi Strain Virus Tungro dan Biotipe Wereng Hijau

Terdapat variasi virulensi virus tungro dan koloni wereng hijau dari berbagai daerah endemis tungro berdasarkan intensitas penyakit yang ditimbulkan (Widiarta dan Kusdianan 2002), sehingga ketahanan suatu varietas bersifat spesifik lokasi. 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 tungro dan wereng hijau dengan tanaman menyebabkan adanya variasi strain virus dan biotipe wereng hijau yang baru. Virulensi strain virus tungro di Asia Tenggara (Indonesia dan Filipina) berbeda dengan Asia Selatan (India) (Azzam and Chancellor 2002).

Saat ini, markah molekuler (*molecular markers*) telah banyak dimanfaatkan dalam analisis keragaman genetik organisme karena lebih efisien, ketepatannya tinggi, dan lebih terpercaya dibanding markah fenotipe (Hanarida *et al.* 2004). Keragaman strain virus tungro dan wereng hijau dapat teridentifikasi

berdasarkan perbedaan sekuen DNA melalui penelusuran markah molekuler. Identifikasi keragaman genetik virus tungro dan wereng hijau secara molekuler akan memberikan informasi tentang keberadaan gen dan hubungan kekerabatan genotipe. Pemantauan perkembangan biotipe wereng hijau dan strain virus tungro secara molekuler dapat berlangsung cepat, sehingga dapat dilakukan pewilayahan distribusi varietas berdasarkan keberadaan biotipe wereng hijau dan strain virus tungro dalam rangka pengendalian penyakit tungro spesifik lokasi. Hasil penelitian menunjukkan, teknik RFLP dapat digunakan untuk membedakan adanya RTBV yang diisolasi dari varietas FK 135 dan TN1 di Filipina (Cabauatan *et al.* 1995). 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 dan biotipe wereng hijau dari berbagai daerah di Indonesia serta pemetaan penyebaran berdasarkan letak geografi dan hubungan kekerabatannya.

Patogenesis Penyakit Tungro dan Penularan

Virus tungro oleh wereng hijau

Penyakit tungro merupakan proses interaksi yang sangat kompleks antara dua jenis virus yang berbeda, yaitu virus bentuk batang (RTBV) dan virus bentuk bulat (RTSV), wereng hijau sebagai vektor spesifik, dan tanaman padi. Kedua jenis virus tersebut tidak memiliki kekerabatan serologi dan dapat menginfeksi satu sel tanaman secara bersama-sama tanpa mengakibatkan proteksi silang antara keduanya (Mukhopadhyay 1995). Virus tungro hanya ditularkan oleh wereng hijau secara semipersisten, tidak terjadi multiplikasi virus dalam tubuh vektor dan tidak terbawa pada keturunannya (Hibino and Cabunagan 1986). Dalam penularan virus tungro, RTBV merupakan virus dependen, sedangkan RTSV sebagai virus pembantu (*helper virus*). Wereng hijau dapat menularkan RTSV dan RTBV secara bersama-sama dari sumber inokulum yang mengandung kedua virus. Penularan RTBV hanya terjadi apabila vektor telah menghisap RTSV terlebih dahulu, sedangkan penularan RTSV dapat terjadi tanpa bantuan RTBV (Hibino *et al.* 1977, Sumardiyono *et al.* 2004). Di dalam suatu populasi di lapangan, terdapat wereng hijau sebagai penular aktif (*active transmitter*) dan nonaktif (*non active transmitter*). Keberadaan populasi penular aktif di pertanaman akan meningkatkan efisiensi dan efektivitas penularan virus tungro.

Pendekatan biologi molekuler diharapkan dapat digunakan untuk mempelajari patogenesis virus tungro, mekanisme patogenesis penyakit tungro, dan proses penularannya. Penggabungan teknik molekuler dan biologi dapat digunakan untuk mengetahui gen-gen penyusun genom virus tungro (struktur

genom virus tungro) yang bertanggung jawab dalam proses infeksi, replikasi, dan perpindahan virus dari sel ke sel tanaman, mekanisme RTBV sebagai virus yang bertanggung jawab terhadap munculnya gejala, mekanisme RTSV sebagai virus pembantu di dalam penularan RTBV, retensi virus tungro di dalam tubuh vektor, perbedaan genetik antara penular aktif dan nonaktif, serta mekanisme ketahanan tanaman terhadap vektor dan virus tungro.

Gen-gen utama penyusun genom virus adalah gen mRNA yang mengimbas pembentukan RNA komplementer oleh RNA *polymerase* tanaman untuk replikasi virus, gen *coat protein* (CP) yang mengimbas pembentukan *coat protein*, dan gen *movement protein* (MP) yang mengimbas pembentukan *movement protein* oleh tanaman, sehingga virus dapat berpindah dari sel ke sel tanaman. RTBV mempunyai empat *open reading frames* (ORF) yang mengkode empat protein masing-masing 24, 12, 194, dan 46 kDa. ORF3 mengkode poliprotein P194 yang mengandung empat gen fungsional, yaitu CP (37 kDa), *aspartate protease*, *reverse transcriptase*, dan *ribonuclease H* (Hull, 1996), sedangkan RTSV hanya terdiri atas satu ORF dengan 3.473 asam amino (Shen *et al.* 1993). Identifikasi genetik RTSV dan RTBV serta proses interaksinya dengan wereng hijau dan tanaman secara molekuler dapat dilakukan untuk mengetahui mekanisme kerja komponen pembantu (*helper component*), sehingga RTSV berperan sebagai virus pembantu. Dengan teknik molekuler dapat diketahui mekanisme ketahanan tanaman terhadap vektor dan virus tungro, di antaranya ekspresi gen antibiosis terhadap vektor, penghambatan proses translasi virus, degradasi protein virus oleh proteinase, dan penghambatan poliprotein oleh *proteolytic processing*. Identifikasi penular aktif dan non aktif dapat dilakukan melalui uji penularan strain virus tungro yang sama dengan koloni wereng hijau yang sama terhadap suatu varietas. Berdasarkan gejala yang ditimbulkan dan deteksi secara molekuler terhadap virus, dapat diketahui vektor yang berperan sebagai penular aktif dan nonaktif, yang selanjutnya dapat dianalisis perbedaan genetik di antara keduanya sebagai dasar pemantauan populasi vektor infeksi di lapangan.

Karakterisasi ketahanan terhadap penyakit tungro

Ketahanan varietas terhadap penyakit tungro merupakan kompleksitas ketahanan terhadap wereng hijau dan virus tungro. Dalam usaha perbaikan ketahanan varietas terhadap penyakit tungro, perlu tersedia sumber gen ketahanan yang dapat diperoleh melalui proses hibridisasi interspesifik atau intergenerik antarplasma nutfah (Daradjat *et al.* 2004). Nilai suatu plasma nutfah akan meningkat apabila dilengkapi dengan data keragaman morfologi dan karakterisasi genotipe serta responsnya terhadap cekaman biotik dan abiotik (Virk *et al.* 1995). Oleh karena itu diperlukan karakterisasi dan penelusuran sifat ketahanan pada plasma nutfah sebagai calon tetua dan pengelompokannya berdasarkan sifat ketahanan terhadap penyakit tungro.

Karakterisasi plasma nutfah dapat dilakukan secara langsung dengan pengamatan fenotipik. Karakterisasi dapat dilakukan dengan bantuan markah molekuler yang mempunyai akurasi dan efisiensi lebih tinggi, tidak terpengaruh oleh lingkungan dan dapat dilakukan pada awal pertumbuhan tanaman (Hittalmani *et al.* 1995). Teknik RFLP dan RAPD banyak digunakan dalam analisis keragaman genetik yang berhubungan dengan ketahanan terhadap suatu penyakit pada berbagai jenis tanaman termasuk padi (Ronald *et al.* 1992, Ishak dan Dwimahyani 1999).

Teknik biologi molekuler pada tanaman padi di Indonesia dapat dimanfaatkan untuk karakterisasi dan perbaikan ketahanan terhadap cekaman biotik dan abiotik seperti toleransi terhadap kekeringan (Puslitbang Tanaman Pangan 2002). Karakterisasi ketahanan virus tungro dan wereng hijau secara molekuler dapat dilakukan untuk mengetahui keberadaan gen ketahanan dan keragaman genetik untuk mendukung usaha perbaikan dan perakitan varietas tahan penyakit tungro.

Telah dilakukan pemetaan kromosom pada varietas ARC 11554 dengan teknik RFLP dan RAPD dan diketahui bahwa asosiasi gen tahan terhadap wereng hijau dan RTSV pada segmen kromosom tunggal terletak pada ujung kromosom 4 (Sebastian *et al.* 1996). Pemetaan kromosom dengan teknik RFLP juga telah dilakukan pada galur rekombinan hasil persilangan dari ARC 10313 (tahan terhadap wereng hijau) dengan TN65 (peka terhadap wereng hijau), hasilnya menunjukkan bahwa *quantitative trait loci* (QTL) sifat antibiosis terhadap wereng hijau terletak pada kromosom 3, 5, 11, dan 12 (Wang *et al.* 2004). Karakterisasi secara molekuler dapat dilakukan pada berbagai varietas dan galur tahan penyakit tungro, hasil persilangan dan seleksi (*screening*) berdasarkan pengamatan fenotipik (*scoring*). Gen ketahanan yang telah teridentifikasi secara molekuler selanjutnya dapat diketahui sekuen nukleotidanya untuk dibuat primer spesifik yang digunakan sebagai marker dalam proses seleksi ketahanan selanjutnya, atau dapat dipindahkan ke genotipe yang lain untuk mempelajari mekanisme ketahanan pada individu dengan latar belakang genetik yang berbeda.

Perakitan varietas tahan penyakit tungro

Penanaman varietas tahan virus tungro dan wereng hijau merupakan komponen yang paling efektif dalam pengendalian tungro (Sama 1985, Loebenstein and Gera 1993, Daradjat *et al.* 1999). Ketahanan varietas terhadap virus tungro akan menekan intensitas penyakit dan ketahanan terhadap wereng hijau akan menekan penularan virus tungro. Namun demikian, varietas tahan tidak boleh ditanam terus-menerus karena dapat meningkatkan tekanan seleksi vektor dan memungkinkan berkembangnya wereng hijau biotipe baru (Daradjat *et al.* 1999). Durabilitas ketahanan varietas terhadap wereng hijau dan virus tungro dipengaruhi oleh variasi biotipe wereng hijau dan virulensi virus tungro (Widiarta

dan Kusdianman 2002). Keragaman ketahanan genetik varietas akan meningkatkan durabilitas ketahanan varietas, menurunkan tekanan seleksi wereng hijau dan virus tungro, serta mencegah terjadinya epidemi penyakit tungro. Oleh karena itu, perakitan varietas berdasarkan sumber gen tahan dan strain virus tungro harus terus-menerus dilakukan (Hasanuddin *et al.* 2001). Pengembangan varietas saat ini lebih ditekankan pada perakitan varietas tahan virus terutama RTSV karena dapat menghambat penyebaran RTBV, oleh wereng hijau, sehingga tidak terjadi infeksi ganda (Widiarta *et al.* 2004).

Di Indonesia, telah dilepas beberapa varietas tahan tungro seperti Tukad Unda, Tukad Petanu, Tukad Balian, Kalimas, dan Bondoyudo (Daradjat *et al.* 2004) dan telah diperoleh pula 29 galur tahan tungro (Muliadi dan Praptana 2005). Varietas dan galur tersebut merupakan hasil seleksi berdasarkan pengamatan fenotipik dengan berbagai tingkat ketahanan. Pada masa mendatang diperlukan identifikasi pada tingkat molekuler untuk memperoleh informasi keberadaan gen tahan yang menunjukkan suatu varietas atau galur mempunyai sifat ketahanan sebagai tetua dalam persilangan selanjutnya. Varietas ARC 11554, Utri Merah, Habiganj DW8, dan Utri Rajapan merupakan sumber ketahanan terhadap RTSV dan RTBV (Choi 2004). Utri Merah memiliki sejumlah gen yang mampu menghambat perkembangan partikel RTBV dan dua gen resesif yang mengendalikan ketahanan terhadap RTSV. Salah satu gen resesif dari Utri Merah bersifat alelik dengan gen ketahanan yang bersifat resesif pada Utri Rajapan (Shahjahan *et al.* 1990).

Uji kesesuaian tetua tahan terhadap penyakit tungro perlu dilakukan dengan adanya keragaman strain virus tungro dan biotipe wereng hijau. Hasil penelitian menunjukkan varietas ARC 15544, Utri Merah, dan Utri Rajapan tahan terhadap strain virus tungro dari Sulawesi Selatan, Sulawesi Tengah, Sulawesi Barat, dan Sulawesi Tenggara (Praptana *et al.* 2005). Telah diketahui pula 10 varietas padi lokal dari Nusa Tenggara Barat tahan terhadap penyakit tungro (Praptana dan Muliadi 2006). Perakitan varietas dengan sumber tetua tahan penyakit tungro dan varietas yang disukai di suatu daerah perlu dilakukan untuk memperoleh varietas tahan spesifik lokasi. Pemanfaatan teknik molekuler dalam penelusuran sifat ketahanan varietas dan seleksi dalam persilangan sangat mendukung percepatan perakitan varietas tahan penyakit tungro.

Perakitan varietas padi transgenik tahan virus tungro

Pemuliaan tanaman padi berdasarkan sifat ketahanan terhadap penyakit tungro diarahkan pada perakitan varietas baru dengan spektrum ketahanan yang lebih luas dan durabilitas yang lebih tinggi. Perakitan varietas tahan wereng hijau dapat dilakukan dengan penumpukan (*pyramiding*) gen ketahanan untuk meningkatkan durasi ketahanan dengan memanfaatkan markah molekuler (Wang *et al.* 2004). Perkembangan teknologi rekombinan DNA membuka

peluang perakitan tanaman tahan virus tungro melalui rekayasa genetik. Berdasarkan faktor patogenisitas virus tungro dan penyakit tungro diharapkan dapat dilakukan perakitan varietas transgenik tahan virus tungro melalui teknologi transformasi. Perakitan varietas transgenik dapat dilakukan dengan mentransfer gen dari virus ke tanaman yang umum dinamakan dengan *pathogen-derived resistance* (PDR). PDR yang dapat digunakan dalam perakitan varietas transgenik di antaranya adalah *coat protein-mediated resistance* (CP-MR), *replicase protein-mediated resistance* (Rep-MR), *movement protein-mediated resistance* (MP-MR), *satellite RNA* (sat RNA) dan *defective-interfering viral nucleic acids* (Dasgupta et al. 2003).

Biologi molekuler sangat diperlukan dalam perakitan varietas transgenik, di antaranya dalam konstruksi dan rekonstruksi plasmid, konfirmasi keberadaan transgen dan ekspresi dari gen yang ditransfer, serta kestabilannya dalam genom tanaman target (Bahagiawati 2004). Terdapat dua teknik transformasi yang telah umum digunakan yaitu transformasi langsung melalui *Agrobacterium tumifaciens* dengan mikroinjeksi, elektroporasi, dan penembakan partikel. Sistem transformasi dengan *A. tumifaciens* lebih banyak digunakan karena relatif lebih murah, efisien dan stabil dalam mengintroduksi suatu gen (Siemens and Schieder 1996). Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam proses transformasi dengan *A. tumifaciens* adalah transfer T-DNA ke dalam inti target, integrasi T-DNA pada genom tanaman target, dan ekspresi gen yang ditransfer (Sheng and Citovsky 1996).

Beberapa tahapan dalam perakitan varietas transgenik tahan virus dengan transformasi melalui *A. tumifaciens* adalah: (a) mengkonstruksi plasmid (plasmid yang sudah tersedia, *Ti-vector*) dengan mentransfer gen CP beserta *promotor* dan *terminator*; (b) menyeleksi plasmid terkonstruksi dengan marker; (c) mentransfer plasmid ke *A. tumifaciens*; (d) transformasi oleh *A. tumifaciens* pada *embryogenic tissue* dengan metode *liquid-phase wounding*; dan (e) seleksi *putative transformed somatic embryos* sehingga diperoleh *putative transgenic*. Penggunaan teknik PCR untuk mendeteksi keberadaan *transgene* pada *putative transgenic* dengan primer spesifik menghasilkan *putative transgenic* sebagai materi pengujian. Selanjutnya dilakukan inokulasi virus dan pengamatan fenotipik berdasarkan waktu kemunculan gejala dan persentase *putative transgenic* yang bergejala. Kemungkinannya akan diperoleh *putative transgenic* dengan berbagai tingkatan ketahanan yaitu peka, tahan, sangat tahan, dan *immune*. Teknik DAS-ELISA dapat digunakan untuk mendeteksi virus pada *putative transgenic*. Tingkat ekspresi *transgene* dianalisis dengan teknik Western-blot dan Northern-blot. Akumulasi gen CP yang tertranskripsi dalam nukleus berkorelasi dengan tingkat protein yang terekspresi. Analisis segregasi dilakukan untuk mengetahui pewarisan *transgene* dengan menyilangkan tanaman transgenik R1 dengan tanaman nontransgenik (Bau et al. 2003). Selanjutnya diperlukan perbaikan tanaman transgenik melalui persilangan tanaman transgenik dengan galur yang mempunyai sifat agronomis baik. Markah molekuler RFLP dan RAPD dapat

digunakan dalam proses seleksi keturunan tanaman transgenik yang dihasilkan (Bahagiawati 2004).

CP-MR merupakan pendekatan inovatif dalam pengendalian virus tanaman melalui perakitan varietas transgenik dengan mentransfer gen CP virus (Beachy 1990). Di IRRI telah dilakukan perakitan varietas transgenik dengan mentransfer gen CP, polimerase, protease, RNase H, dan antisens RNA dari RTBV pada varietas IR64, TN1, Taipei 309, dan Kinuhikari dengan promotor RTBV dan *Cauliflower mosaic virus* (35S), namun tanaman yang dihasilkan belum dapat mencegah atau mengurangi infeksi RTBV (Azzam *et al.* 1999). Perakitan pepaya transgenik tahan *Papaya ringspot virus* (PRSV) dengan mentransfer gen CP dari strain kuat lokal Taiwan (PRSV YK) dengan *A. tumefaciens* menghasilkan pepaya transgenik yang bersifat *broad spectrum resistance* (Bau *et al.* 2003). Hal ini membuka peluang dalam eksplorasi strain virus tungro berdasarkan virulensinya di seluruh daerah endemis penyakit tungro di Indonesia untuk memperoleh strain kuat virus tungro yang selanjutnya dapat digunakan sebagai materi perakitan varietas transgenik tahan virus tungro. Tanaman padi transgenik yang dirakit berdasarkan pendekatan Rep-MR, CP-MR, dan MP-MR menunjukkan ketahanan yang bersifat *broad spectrum* dan mempunyai durabilitas yang tinggi (Azzam and Chancellor 2002). Pemanfaatan varietas padi transgenik yang mengandung gen tahan virus di Indonesia diharapkan dapat mencegah penyebaran virus dan mengendalikan penyakit tungro dalam skala yang luas, sehingga sesuai untuk pengendalian penyakit tungro berdasarkan konsep epidemiologi. Namun demikian, jalan yang harus ditempuh masih sangat panjang, sehingga tidak dapat diharapkan dalam waktu 5-10 tahun ke depan, mengingat proses perakitan varietas transgenik membutuhkan waktu yang relatif lama dan hal yang paling penting adalah varietas transgenik harus memenuhi persyaratan uji keamanan hayati dan keamanan pangan.

Kesimpulan

Bioteknologi dengan memanfaatkan biologi molekuler dapat berperan dalam pengelolaan penyakit tungro berdasarkan aspek biologi, ekologi, dan epidemiologi. Berbagai teknik molekuler berpeluang untuk dimanfaatkan dalam pengelolaan penyakit tungro, di antaranya diagnosis penyakit tungro, deteksi virus tungro, identifikasi strain virus tungro dan biotipe wereng hijau, patogenisitas virus tungro dan patogenesis penyakit tungro serta penularannya, karakterisasi ketahanan varietas terhadap virus tungro dan wereng hijau, perakitan varietas tahan virus tungro dan wereng hijau serta perakitan tanaman transgenik tahan virus tungro. Berbagai teknik molekuler perlu dimanfaatkan oleh peneliti bioteknologi di Indonesia.

Pustaka

- Azrai, M. 2005. Pemanfaatan markah molekuler dalam proses seleksi pemuliaan tanaman. *Jurnal Agrobiogen* 1(1):26-37.
- Azzam, O., A. Kloti, F. Sta. Cruz, J. Rutterer, E.L. Coloquio, I. Potrykus, and R. Hull. 1999. Genetic engineering of rice for tungro resistance. *Proc. Whorkshop Rice Tungro Disease Management*. Los Banos, Philippines, 9-11 November 1989.
- Azzam, O. and T.C.B. Chancellor. 2002. The biology, epidemiology and management of rice tungro disease in Asia. *Plant Disease* 86:88-100.
- Bahagiawati, A. 2004. Perakitan tanaman transgenik tahan hama. *Jurnal Litbang Pertanian* 23(1):1-7.
- Bau, H.J., Y.H. Cheng, T.A. Yu, J.S. Yang, and S.D. Yeh. 2003. Broad-spectrum resistance to different geographic strains of *Papaya ringspot virus* in coat protein gene transgenic papaya. *Phytopathology* 93:112-120.
- Beachy, R.N. 1990. Coat protein mediated resistance in transgenic plants. *Proc. Symposium on Viral Genes and Plant Pathogenesis*. Lexington, Ky.
- Cabauatan, P.Q. R.C. Cabunagan and H. Koganezawa. 1995. Biological variants of rice tungro viruses in the Philippines. *Phytopathology* 85(1): 77-81.
- Choi, R.I. 2004. Current status of rice tungro disease research and future program. *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7-8 September 2004.
- Daradjat, A. A., I.N. Widiarta, dan A. Hasanuddin. 1999. Breeding for rice tungro virus resistance in Indonesia. *Rice Tungro disease management*. IRRI.
- Daradjat, A.A., I.N. Widiarta, dan Jumanto. 2004. Prospek perbaikan varietas padi tahan virus tungro dan serangga wereng hijau. *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7-8 September 2004.
- Dasgupta, I., V.G. Malathi, and S.K. Mukherjee. 2003. Genetic engineering for virus resistance. *Current Science* 84(3):341-354.
- Garcia, A.A.F., L.L. Benchimol, A.M.M. Barbosa, I.O. Geraldi, C.L. Souza Jr., and A.P. de Souza. 2004. Comparison of RAPD, RFLP, AFLP, and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. *Genetics and Molecular Biology* 27(4): 579-588.

- Gurr, S.J., M.J. McPherson, and D.J. Bowles. 1992. Molecular plant pathology. Vol. I. A practical approach. Oxford Univ. Press, New York. 213 p.
- Hanarida, I., H. Kurniawan, and Minantyorini. 2004. The prospect of Indonesian sweetpotato germplasm collection: the application of RAPDs analysis. *Agrobio* 6(2):58-63.
- Hasanuddin, A., I.N. Widiarta, dan M. Muhsin. 2001. Penelitian teknik eliminasi sumber inokulum RTSV: suatu strategi pengendalian tungro. Laporan Riset Unggulan Terpadu IV. Kantor Menristek dan DRN. Jakarta.
- Hasanuddin, A. 2002. Pengendalian penyakit tungro terpadu: strategi dan implementasi. Orasi pengukuhan Ahli Peneliti Utama (APU). Badan Litbang Pertanian. Jakarta.
- Hibino, H., N. Saleh, and M. Roechan. 1977. Transmission of two kinds of rice tungro associated viruses by insect vectors. *Phytopathology* 69:1266-8.
- Hibino, H. and R.C. Cabunagan. 1986. Rice tungro associated viruses and their relation to host plants and vector leafhopper. *Trop. Agr. Res. Ser.* 19:173-182.
- Hibino, H. 1987. Rice tungro virus disease: current research and prospects. *Proc. of the Workshop on Rice Tungro Virus*. Maros Research Institute for Food Crops. 2-6p.
- Hittalmani, S., M.R. Foolad, T. Mew, R.I. Rodriguez, and N. Huang. 1995. Development of a PCR-based marker to identify rice blast resistance-gene, *Pi-2(t)*, in a segregating population. *Theor. Appl. Genet.* 91:9-14.
- Hull, R. 1996. Molecular biology of rice tungro viruses. *Ann. Rev. Phytopathol.* 34:275-297.
- Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White. 1990. PCR protocols, A guide to methods and applications. T.J. White (Ed.). Academic Press, Inc. USA.
- Ishak and I. Dwimahyani. 1999. Genetic and molecular analysis of rice waxy mutant line using RAPD marker. *Annales Bogoriense* 6:27-36.
- Isogai, M., P.Q. Cabauatan, C. Masuta, I. Uyeda, and O. Azzam. 2000. Complete nucleotide sequence of rice tungro spherical virus genome of the highly virulent strain Vt6. *Virus Genes* 20(1):79-85.
- Ling, K.C. 1979. Rice virus disease. IRRI, Los Banos, Philippines. 142p.
- Loebenstein, G. and A. Gera. 1993. The local lesion response to viruses possibilities for engineering resistant plants. *Biotechnology in plant disease control*. Wiley-liss, Inc. p.105-113.

- Mori, Y., T. Hirano, and T. Notomi. 2006. Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotech* 6:3.
- Mukhopadhyay, A.N. 1995. Rice Tungro. *In*: U.S. Sing, A.N. Mukhopadhyay, J. Kumar, and H.S. Chaube (Eds.). *Plant disease of international importance*. Vol. 1. Disease of Cereals and Pulse. Prentice may. New Jersey.
- Muliadi, A. dan R.H. Praptana. 2005. Evaluasi ketahanan galur padi sawah terhadap penyakit tungro. *Berita Puslitbangtan* No. 32, Juni 2005.
- Pusat Penelitian Tanaman Pangan. 2002. Deskripsi varietas unggul padi dan palawija 2001-2002. Pusat Penelitian Tanaman Pangan, Bogor. p. 9-10.
- Praptana, R.H., F.T. Ladja, dan A. Muliadi. 2005. Kesesuaian tetua padi tahan virus tungro. Makalah pada Diklat Fungsional Peneliti Tingkat Pertama Angkatan XVII. Depok, 1-21 Desember 2005.
- Praptana, R.H. dan A. Muliadi. 2006. Ketahanan 10 padi lokal Nusa Tenggara Barat (NTB) terhadap tungro. Prosiding Seminar dan Pertemuan Tahunan PEI dan PFI Cab. Makassar dan HPTI Komda Sulsel. Makassar, 22 November 2005.
- Raga, I.N., W. Murdita, M.P.L. Tri, S.W. Edi, dan Oman. 2004. Sistem surveillance antisipasi ledakan penyakit tungro di Indonesia. Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional. Makassar, 7-8 September 2004.
- Ronald, P.C., B. Albano, R. Tabien, L. Abenes, K.S. Wu, S. McCouch, and S.D. Tanksley. 1992. Genetic and phisycal analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, Xa21. *Mol. Gen. Genet.* 236:113-120.
- Sama, S. 1985. Penerapan konsep pergiliran varietas dalam pengelolaan penyakit tungro. Makalah Temu Lapang Pengendalian Penyakit Tungro. Banyumas, 18-19 September 1985.
- Sebastian, L.S., R. Ikeda, N. Huang, T. Imbe, W.R. Coffman, and S.R. McCouch. 1996. Molecular mapping of resistance to rice tungro spherical virus and green leafhopper. *Phytopathology* 86:25-30.
- Shahjahan, M.B., S. Jalani, A.H. Zakri, T. Imbe, and O. Othman. 1990. Inheritance of tolerance to rice tungro bacilliform virus (RTBV) in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 80:513-517.
- Shen, P., M. Kaniewska, C. Smith, and R.N. Beachy. 1993. Nucleotide sequence and genomic organisation of rice tungro spherical virus. *Virology* 193: 621-630.
- Sheng, J. and V. Citovsky. 1996. Agrobacterium-plant cell DNA transport: Have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell.* 8: 1699-1710.

- Siemens, J. and O. Schieder. 1996. Transgenic plants: genetic transformation-recent developments and state of the art. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 2(2):66-75.
- Soetarto, A., Jasis, S.W.G. Subroto, M. Siswanto, dan E. Sudiyanto. 2001. Sistem peramalan dan pengendalian OPT dalam mendukung sistem produksi padi berkelanjutan. *Dalam: Irsal Las et al. (Eds.): Implementasi kebijakan strategi untuk peningkatan produksi padi berwawasan agribisnis dan lingkungan*. Puslitbang Tanaman Pangan. Bogor.
- Sumardiyono, Y.B., S. Hartono, dan I. Suswanto. 2004. Interaksi RTV dengan wereng hijau dan penyakit tungro pada padi. *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. *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7-8 September 2004.
- Takahashi, Y., F.R. Tiongco, P.Q. Cabauatan, H. Koganezawa, H. Hibino, and 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.
- Virk, P.S., H.J. Newbury, M.T. Jackson, and B.V. Ford-Lloyd. 1995. The identification of duplicate accession within a rice germplasm collection using RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.* 90:1049-1055.
- Wang, C., H. Yasui, A. Yoshimura, H. Zhai, and J. Wan. 2004. Inheritance and QTL mapping of antibiosis to green leafhopper in rice. *Crop Science*. 44: 389-393.
- Widiarta, I.N. dan D. Kusdaman. 2002. Identifikasi strain virus tungro. *Laporan Hasil Penelitian*. Balai Penelitian Tanaman Padi, Sukamandi.
- Widiarta, I.N., Yulianto, dan A. Hasanuddin. 2003. Pengendalian terpadu penyakit tungro dengan strategi eliminasi peranan virus bulat. *Kebijakan Perberasan dan Inovasi Teknologi Padi*. Balitpa. Sukamandi. p.513-527.
- Widiarta, I.N., Burhanuddin, A.A. Daradjat, dan A. Hasanuddin. 2004. Status dan program penelitian pengendalian terpadu penyakit tungro. *Prosiding Seminar Nasional Status Program Penelitian Tungro Mendukung Keberlanjutan Produksi Padi Nasional*. Makassar, 7-8 September 2004.