

DETEKSI DINI RTBV PADA BEBERAPA GENERASI F2 PADI MELALUI UJI PCR

Rini Ismayanti^{1*}, Nur Rosida¹, Ahmad Muliadi¹

¹Loka Penelitian Penyakit Tungro, Jl. Bulu No.101 Lanrang, Sidrap, Sulawesi Selatan Telp. (0421) 93701

*Penulis untuk korespondensi: rini.ismayanti@gmail.com

ABSTRACT

Tungro is an important disease in rice plants caused by Rice tungro bacilliform virus (RTBV) and Rice tungro spherical virus (RTSV). One way of controlling tungro disease is by using tungro resistant varieties. Currently the number of tungro resistant varieties is still limited so that efforts are required to assemble new varieties through a combination of resistant genes with both conventional and non conventional crosses by applying molecular techniques. This study aims to determine the presence of RTBV on accession of tungro resistant strain crosses with tungro susceptible varieties that can detect early resistance of accession to tungro disease. The study was conducted at Lolittungro Lanrang Greenhouse and at Molecular Laboratory Balitsereal Maros using ARC 12596 as resistant parents and Setail as susceptible parents who produced 44 F2 plants. All F2 plants were inoculated with tungro virus using green leafhopper as vector for two days. After seven days, each plant discoring the severity of the tungro, then taken leaf samples for DNA isolation and PCR analysis using a specific primer to detect RTBV. The primary RTBV specific amplification target used for detection is a DNA band of approximately 430 bp. A total of 26 plants resistant and 8 plants rather than tungro based on scoring. PCR results confirm that there are 34 F2 plants that are resistant to tungro. Plants that are detected by RTBV but have a resistant score can be continued for the next breeding stage.

Keywords: molecular breeding, selection, tungro virus

ABSTRAK

Tungro merupakan penyakit penting pada tanaman padi yang disebabkan oleh *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV) dan *Rice tungro spherical virus* (RTSV). Salah satu cara pengendalian penyakit tungro adalah dengan menggunakan varietas tahan tungro. Saat ini jumlah varietas tahan tungro masih terbatas sehingga diperlukan upaya untuk merakit varietas baru melalui kombinasi gen-gen tahan dengan persilangan baik secara konvensional maupun non konvensional dengan menerapkan teknik molekuler. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keberadaan RTBV pada aksesori hasil persilangan galur tahan tungro dengan varietas rentan tungro sehingga dapat mendeteksi dini ketahanan aksesori tersebut terhadap penyakit tungro. Penelitian dilaksanakan di Rumah Kaca Lolittungro Lanrang dan di Laboratorium Molekuler Balitsereal Maros menggunakan tetua tahan ARC 12596 dan tetua rentan Setail yang menghasilkan 44 tanaman F2. Seluruh tanaman F2 diinokulasi dengan virus tungro menggunakan wereng hijau sebagai vektor selama dua hari. Setelah tujuh hari, masing-masing tanaman diskoring keparahan tungro, kemudian diambil sampel daun untuk isolasi DNA dan analisis PCR menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi RTBV. Target

amplifikasi primer spesifik RTBV yang digunakan untuk deteksi adalah pita DNA berukuran kurang lebih 430 bp. Sebanyak 26 tanaman tahan dan 8 tanaman agak tahan tungro berdasarkan skoring. Hasil PCR mengkonfirmasi bahwa ada 34 tanaman F2 yang tahan terhadap tungro. Tanaman yang terdeteksi keberadaan RTBV tetapi memiliki skor tahan dapat dilanjutkan untuk tahap pemuliaan selanjutnya.

Kata kunci: pemuliaan berbasis molekuler, seleksi, virus tungro

PENDAHULUAN

Penyakit tungro merupakan salah satu penyakit yang mendapat perhatian khusus karena dapat menyebabkan kerusakan pada tanaman padi dan mengakibatkan gagal panen. Ancaman penyakit tungro di Indonesia selalu ada setiap tahunnya dan cenderung terus meningkat. Rata-rata luas serangan penyakit tungro di Indonesia pada 2006 menurut informasi Suprihanto *et al.* (2006) mencapai 5,917 ha per tahun, sedangkan menurut Budiyanto *et al.* (2011) pada tahun 2011 luas serangan 13,868 ha dan 333 ha puso. Selanjutnya berdasarkan Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (2014) di tahun 2012 area serangan tungro seluas 7,747 ha dan meningkat menjadi 10,250 ha pada tahun 2013 yang tersebar di 24 propinsi di Indonesia.

Penyakit tungro disebabkan oleh virus RTBV dan RTSV yang dibawa oleh wereng hijau sebagai vektor penularan. RTSV adalah virus utas tunggal (RNA) yang termasuk dalam familia *Sequiviridae*, sedangkan RTBV adalah virus utas ganda (DNA) yang termasuk dalam familia *Caulimoviridae* dinyatakan oleh Latif *et al.* (2013). RTSV memainkan peranan penting dalam membantu wereng hijau memindahkan RTBV. Uda *et al.* (2014) mengatakan infeksi RTSV akan menyebabkan gejala ringan atau tidak jelas, sedangkan terjadinya koinfeksi dengan RTBV akan menyebabkan gejala kerdil, kuning sampai oranye pada warna daun muda dan berkurangnya jumlah anakan.

Pengendalian terpadu penyakit tungro menurut Praptana dan Yasin (2008) terdiri dari beberapa komponen yaitu pengaturan waktu tanam, pergiliran varietas, penggunaan varietas tahan, kultur teknis, penggunaan pestisida sesuai dengan kondisi tertentu dan pengelolaan penyakit tungro melalui pendekatan bioteknologi. Hal tersebut didukung oleh pernyataan Thamrin dan Marpaung (2012) bahwa sistem budidaya masyarakat yang tidak menggunakan varietas tahan dan melakukan penanaman yang tidak serentak dapat mengakibatkan meledaknya penyakit tungro. Muliadi *et al.* (2010) juga mengatakan bahwa varietas tahan tungro adalah komponen pengendalian penyakit tungro yang murah, efektif dan efisien serta tidak mengganggu kelestarian lingkungan.

Informasi dari Ladja dan Nyoman (2012) menyatakan jumlah varietas yang tahan penyakit tungro saat ini masih terbatas. Dari 244 varietas padi yang telah dilepas oleh badan Litbang Pertanian dari tahun 1943 sampai 2010 baru 5 varietas yang tahan terhadap penyakit tungro yaitu Tukad Unda, Tukad Petanu, Tukad Balian, Kalimas, dan Bondoyudo dan tambahan 3 varietas lagi hingga 2009 yaitu Inpari 7 Lanrang, Inpari 8, Inpari 9 Elo. Gunawan (2017) menginfokan bahwa pada tahun 2015, Badan Litbang Pertanian melepas dua varietas tahan tungro yaitu Inpari 36 Lanrang dan Inpari 37 Lanrang.

Tahap awal dalam merakit varietas yang tahan terhadap penyakit tungro membutuhkan seleksi atau skrining. Rahim dan Nasrudin (2010) mengatakan

proses skrining untuk penyakit tungro sulit dilakukan karena gejalanya hampir mirip dengan penyakit padi lainnya yang disebabkan oleh virus. Skrining yang umumnya dilakukan adalah dengan melakukan inokulasi buatan dan menurut Muhsin dan Widiarta (2009) virus tungro dapat dideteksi dengan menggunakan yodium, ELISA, PCR (*Polimerase Chain Reaction*).

Penelitian bertujuan untuk mengetahui keberadaan RTBV sebagai salah satu penyebab penyakit tungro pada beberapa generasi F2 hasil persilangan varietas tahan dengan varietas rentan tungro sebagai bentuk seleksi ketahanan aksesi tersebut terhadap penyakit tungro. Aksesi yang tahan tungro akan dilanjutkan pada tahap pemuliaan selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Pembentukan Populasi

Persilangan dilakukan di rumah kaca menggunakan galur tahan penyakit tungro yaitu ARC 12596 sebagai tetua tahan dan Setail sebagai varietas rentan. Hasil persilangan pertama (F1) ditanam kembali untuk memperoleh F2 (44 biji).

Inokulasi Virus

Wereng hijau yang digunakan sebagai vektor virus tungro dan sumber inokulum (tanaman sakit) berasal dari koleksi rumah kaca Lolittungro. Wereng hijau dewasa diinfestasikan pada tanaman sakit selama 48 jam untuk *acquisition feeding*. Selanjutnya tanaman F2 yang berumur 10 hari disungkup dan diinokulasi dengan wereng hijau yang membawa virus. Tanaman yang telah diinokulasi ditumbuhkan sampai umur 21 hari kemudian diskoring tingkat ketahanannya dan diambil sampel daun untuk isolasi DNA. Skoring tingkat keparahan tungro berdasarkan metode SES untuk padi menurut IRRI (2002), yaitu:

Skor 1 = tidak ada gejala serangan

Skor 3 = tinggi tanaman lebih pendek 1–10%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye tidak nyata

Skor 5 = tinggi tanaman lebih pendek 11–30%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye tidak nyata

Skor 7 = tinggi tanaman lebih pendek 31–50%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye nyata

Skor 9 = tinggi tanaman > 50%, perubahan warna daun dari kuning ke kuning oranye nyata

Kriteria ketahanan tungro:

1 – 3 = tahan

4 – 6 = agak tahan

7 – 9 = rentan

Isolasi DNA

Isolasi DNA menggunakan CTAB mengikuti metode George *et al.* (2004) dengan modifikasi yaitu tidak menggunakan nitrogen cair. Sebanyak 0.1-0.2 g daun muda F2 diambil dari setiap tanaman kemudian dipotong-potong dan digerus dengan *buffer* CTAB, kemudian ditambahkan 2-mercaptoetanol sebanyak 10 µL. Hasil gerusan diinkubasi pada suhu 65 °C selama 60 menit kemudian disentrifus selama 5 menit dengan kecepatan 11,000 rpm. Supernatan DNA dipisahkan lalu ditambahkan chloroform-isoamilalkohol (24:1) kemudian dihomogenkan.

Presipitasi DNA dengan isopropanol 500 μ L kemudian didiamkan, setelah itu disentrifus untuk memperoleh pellet DNA. Pellet DNA dicuci dengan etanol 70% dan dilarutkan dalam *buffer* TE selama satu malam dalam suhu ruang sebagai stok DNA.

Deteksi RTBV dengan PCR

Stok DNA diencerkan sehingga setara dengan 10 ng sebagai *working solution*, kemudian sebanyak 1 μ L digunakan untuk reaksi PCR. Primer yang digunakan untuk mendeteksi RTBV sama dengan yang digunakan oleh Praptana *et al.* (2009) yaitu AAA CGG TCATTG TGG GAG GT (F) dan CAG GCC CAG CAA CGA CAT AA (R). *Mix* PCR untuk satu reaksi terdiri atas 6.25 μ L buffer PCR KAPA-2G FAST Ready Mix, masing-masing 0.5 μ L primer RTBV (untuk F dan R) dan 2.25 μ L nano pure water. Amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus, yang dimulai pada suhu 94 °C selama 2 menit sebagai denaturasi awal, kemudian 94 °C selama 30 detik sebagai denaturasi siklus pertama, suhu *annealing* 55 °C selama 1 menit, kemudian elongasi pada suhu 72 °C selama 1 menit, *final extention* 72 °C selama 5 menit. Produk PCR dielektroforesis dengan gel poliakrilamid 8% (*PAGE*) menggunakan buffer TBE 1 M pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Pewarnaan gel menggunakan silver mengikuti metode Benbouza *et al.* (2006). Pengambilan gambar dilakukan dengan cara meletakkan gel hasil elektroforesis di atas meja terang.

HASIL

Hasil pengamatan dari kedua populasi menunjukkan beberapa gejala tungro yang beragam, mulai dari skor 1 sampai skor 9 yang menunjukkan gejala kekerdilan dan daun yang menguning dan menggulung.

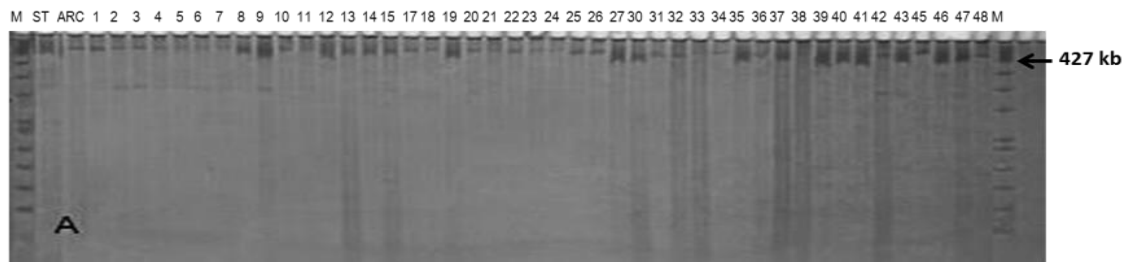
Tabel 1. Tabel skor tingkat keparahan tungro

No	Skor	Tanaman
1	Skor 1	26 (2-10, 12, 14, 15, 18, 19, 21, 24-27, 33-35, 39, 40, 43, 46)
2	Skor 3	8 (1, 20, 22, 30, 31, 32, 37, 38)
3	Skor 5	2 (41, 47)
4	Skor 7	2 (11, 48)
5	Skor 9	6 (13, 17, 23, 36, 42, 45)
Total		44

Pada populasi F2 terdapat sekitar 20% tanaman yang rentan terhadap tungro (skor 5-9). Gejala tungro paling parah yang ditemukan berupa daun yang berwarna kuning hingga oranye yang disertai daun muda yang terpelintir serta tinggi tanaman yang menjadi lebih pendek. Namun demikian, terdapat juga tanaman yang tahan yang memperlihatkan daun yang tetap berwarna hijau dan tidak menggulung (skor 1 dan 3). Tanaman yang tergolong tahan ada 34.

Analisis PCR untuk deteksi RTBV dalam penelitian ini dilakukan karena genom RTBV merupakan DNA, sehingga dari DNA total tanaman dapat langsung digunakan sebagai *template*, sedangkan deteksi RTSV yang memiliki genom RNA menurut Praptana *et al.* (2009) jarang dilakukan karena tingkat kesulitannya yang tinggi. Seleksi yang dilakukan dalam penelitian ini dibantu dengan marka molekuler berbasis PCR dan tidak memerlukan fasilitas khusus untuk uji biologi. Penggunaan

marka molekuler dianjurkan oleh Lukman *et al.* (2013) untuk mempersingkat waktu deteksi.



Gambar 1. Elektroforesis hasil analisis PCR pada dua populasi menggunakan primer spesifik RTBV pada F2 hasil persilangan Setail x ARC 12596

Tabel 2. Keberadaan pita RTBV dan gejala penyakit tungro

No	Keterangan	Jumlah	Arti
1	Ada pita + ada gejala tungro	10	Tanaman rentan tungro
2	Ada pita + tidak ada gejala tungro	34	Tanaman tahan tungro
Total		44	

Deteksi RTBV menggunakan teknik PCR telah dilakukan oleh Dasgupta *et al.* (1996) dan teknik ini dinyatakan dapat digunakan untuk skrining ketahanan tungro pada padi oleh Periasamy *et al.* (2006). Di antara teknik yang digunakan untuk deteksi virus tungro, PCR merupakan teknik yang paling sensitif. Takahashi *et al.* (1993) melaporkan bahwa sensitivitas PCR adalah 10^4 - 10^5 kali lipat lebih tinggi dari ELISA untuk mendeteksi virus tungro pada tanaman yang telah diinokulasi maupun pada vektor tungro, wereng hijau.

Keberadaan RTBV ditunjukkan oleh satu pita DNA yang teramplifikasi pada beberapa aksesori dengan ketebalan pita yang berbeda tetapi konsisten berada posisi kurang lebih 427 bp (Gambar 1). Praptana *et al.* (2013) mengatakan bahwa kesesuaian antara posisi pita DNA pada PAGE dengan ukuran target amplifikasi (430 bp) menunjukkan bahwa analisis PCR menggunakan primer spesifik sangat sensitif dalam mendeteksi keberadaan RTBV dalam tanaman yang terinfeksi. Hasil PCR menunjukkan bahwa semua tanaman terdeteksi RTBV, baik tanaman dengan skor tahan maupun tanaman dengan skor rentan.

PEMBAHASAN

Tanaman yang terlihat tahan secara morfologi (hasil skoring) disebabkan karena ketahanan dari aksesori itu sendiri atau disebabkan karena RTBV tidak berhasil dipindahkan. Deteksi menggunakan PCR selanjutnya digunakan untuk memastikan apakah inokulasi buatan berhasil atau tidak, sehingga tanaman yang tidak menunjukkan gejala tungro dapat dipastikan karena ketahanannya, bukan karena gagal inokulasi.

Primer spesifik yang digunakan memiliki target amplifikasi sekuen basa pada posisi *open reading frame* II (ORF2) di dalam genom RTBV. Genom RTBV sendiri menurut Herzog *et al.* (2000) memiliki berat molekul 8 kbp dan terdiri dari 4 ORF yang mengkode empat macam protein dengan berat molekul masing-masing 24 kDa, 12 kDa, 194 kDa, dan 46 kDa. Menurut sekuen lengkap RTBV dalam

GeneBank Database, hasil penelitian Praptana *et al.* (2009) target amplifikasi primer spesifik adalah 576–1006 sekuen basa nukleotida atau sekitar 430 bp.

Visualisasi hasil PCR menunjukkan semua tanaman telah terinfeksi oleh RTBV, ditandai dengan munculnya pita RTBV pada semua tanaman. Meskipun semua tanaman memunculkan pita RTBV, tetapi tidak semua tanaman menunjukkan gejala tungro. Hal ini disebabkan karena aksesi tersebut mewarisi sejumlah gen tahan dari tetua Utri Merah yang mampu menghambat perkembangan RTBV dan dua gen resesif yang mengendalikan ketahanan terhadap RTSV menurut Praptana dan Yasin (2008). Ladja dan Nyoman (2012) mengatakan gen tahan virus tungro bekerja dengan cara menekan terjadinya infeksi, menghambat proses replikasi dan penyebaran virus serta mengurangi akumulasi partikel virus dengan menghambat perakitan dan stabilitas virus.

Seleksi secara genotipik dengan menggunakan primer spesifik untuk virus tungro, selain lebih cepat dalam proses seleksi awal ketahanan, juga menjadi langkah klarifikasi yang mampu menganalisis sampel dalam jumlah yang lebih besar dalam waktu yang relatif singkat. Klarifikasi sangat dibutuhkan terutama bagi yang belum terbiasa mengamati gejala tungro secara fenotipik untuk meyakinkan bahwa tanaman tersebut benar terserang tungro, bukan karena kekurangan hara atau karena penyakit lainnya. Beberapa ciri kekurangan hara menunjukkan gejala yang mirip dengan tungro, sehingga menyebabkan kesalahan dalam pemberian skor tingkat keparahan penyakit tungro.

KESIMPULAN

Hasil deteksi menyimpulkan bahwa proses inokulasi berhasil 100%. Tanaman tahan tungro pada populasi hasil persilangan adalah 34 tanaman. Tanaman yang terdeteksi keberadaan RTBV tetapi memiliki skor tahan dapat dilanjutkan untuk tahap pemuliaan selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada teknisi lolitungro M. Haiqal dan Yusran, serta Laboratorium Molekuler Balitsereal yang telah membantu dalam proses PCR. Penelitian ini didanai oleh DIPA 2016.

DAFTAR PUSTAKA

- Benbouza, H., J. Jacquemin, J. Baudoin, Haryati. 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10(2):77-81.
- Budiyanto, E., M. Nurhidayat, Suparni, Haryati. 2011. *Perlindungan tanaman untuk menekan kehilangan hasil padi* 1st ed. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Bogor.
- Dasgupta, I., B.K. Das, P.S. Nath, S. Mukhopadhyay, F.R. Niazi, A. Varma .1996. Detection of rice tungro bacilliform virus in field and glasshouse samples from India using the polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods.* 58:53-58.

- George, M.L.C., E. Regalado, M. Warburton, S. Vasal, D. Hoisington. 2004. Genetic diversity of maize inbred lines in relation to downy mildew. *Euphytica*. 135:145-155.
- Gunawan, A. 2017. Inpari 36 Lanrang primadona baru petani Sulawesi Selatan. <http://www.litbang.pertanian.go.id/berita/one/2861/>.
- 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(5):2073–83.
- Ladja, F.T., I.N. Widiarta. 2012. Varietas unggul baru padi untuk mengantisipasi ledakan penyakit tungro. *Iptek Tanaman Pangan*. 7(1):18-24.
- Latif, M.A., M.M. Rahman, M.E. Ali, S. Ashkani, M.Y. Rafii. 2013. Inheritance studies of SSR and ISSR molecular markers and phylogenetic relationship of rice genotypes resistant to tungro virus. *Comptes Rendus Biologies*. 336(3):125-133.
- Lukman, R., A. Afifuddin, Hoerussalam. 2013. Pemanfaatan teknologi molecular breeding dalam pemuliaan ketahanan tanaman terhadap hama dan penyakit. *Jurnal Agroteknos*. 3(2):101-108.
- Muhsin, M., I.N. Widiarta. 2009. Pato sistem, strategi, dan komponen teknologi pengendalian tungro pada tanaman padi. *Iptek Tanaman Pangan*. 4(2):202-221.
- Muliadi, A., Burhanuddin, Hasanuddin. 2010. Observasi daya hasil sejumlah galur harapan padi tahan penyakit tungro. *Dalam: Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Padi 2009*. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Badan Litbang Pertanian. Kementerian Pertanian.
- Periasamy, M., F.R. Niazi, V.G. Malathi. 2006. Multiplex RT-PCR, a novel technique for 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(1):98-103.
- Praptana, R.H., Y. Sumardiyono, Y. Trisyono. 2013. Patogenisitas virus tungro pada varietas tetua padi tahan tungro. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 9(6):186-192.
- Praptana, R.H., Y. Sumardiyono, S. Hartono, I.N. Widiarta, M. Muhsin. 2009. Deteksi keragaman virus tungro dari beberapa daerah endemis di Indonesia dengan teknik PCR-RFLP. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 15(1):29-38.
- Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian. 2014. Statistik iklim organisme pengganggu tanaman dan dampak perubahan iklim. Sekretariat Jenderal-Kementerian Pertanian. Jakarta.
- Rahim, M. Danial, A. Nasruddin. 2010. Deteksi molekuler rice tungro bacilliform virus di Sulawesi selatan dengan menggunakan PCR genomik dan optimalisasinya. *Fitomedika*. 7(1):55–61.
- Suprihanto, I.N. Widiarta, D. Kusdianan. 2010. Evaluasi virulensi virus tungro dari beberapa daerah endemi dan uji ketahanan plasma nutfah padi. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 16(1):33-41.
- Takahashi, Y., E.R. Tiongco, P.Q. Cabauatan, H. Koganezawa, H. Hibino, T. Omura. 1993. Detection of rice tungro bacilliform virus by polymerase chain reaction for assessing mild infection of plants and viruliferous vector leafhoppers. *The American Phytopathological Society*. 83(6):655-659

- Thamrin, T., I.S. Marpaung, Syahri. 2012. Produktivitas dan ketahanan galur harapan padi terhadap penyakit tungro di Sumatera Selatan. *Jurnal Lahan Suboptimal*. 1(2):130-137.
- Uda, M.N.A., C.M. Hasfalina, A.A. Samsuzana, S. Faridah, I. Zamri, B.S. Noraini, W.N. Sabrina, U. Hashim. 2014. Comparison study of two different isolation and purification method for rice tungro bacilliform virus (RTBV). *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2:107-112.