

## DETEKSI DAN DIFERENSIASI VIRUS KERDIL PISANG DENGAN TEKNIK PCR-RFLP

### *DETECTION AND DIFFERENTIATION OF BUNCHY TOP VIRUS IN BANANA BY PCR-RFLP TECHNIQUES*

Rahma Ayu Priani\*, Susanto Somowiyarjo, Sedyo Hartono, dan Siti Subandiyah

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

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

#### **ABSTRACT**

Banana bunchy top disease (BBTD) can be caused by the infection of two different viruses, Banana bunchy top virus (BBTV) or Abaca bunchy top virus (ABTV). Both viruses can be transmitted persistently by aphid *Pentalonia nigronervosa* Coq. The research was conducted to detect and to differentiate the virus by polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism (PCR – RFLP) techniques. Infected plants were collected from Yogyakarta (Sleman, Yogyakarta city, Bantul, Gunung Kidul, and Kulon Progo). Nucleon Phytopure DNA Extraction Kit method was used to extract the total DNA of infected plants. Universal primers of Common DNA region (S-CRF and S-CRR) and specific primers DNA-R (CI-CRF and CI-CRR) were used for PCR amplification. PCR products were analyzed by RFLP technique using the restriction enzyme of *Dra I*. The results reconfirm previous reports that bunchy top disease of banana in Yogyakarta is caused by BBTV. The ABTV was not detected in this present study. Based on the RFLP analysis it was concluded that BBTV collected in this study could be divided into three groups. Group 1 consisted of BBTV isolate from Sleman and Yogyakarta city with two fragments DNA of 400 and 388 bp. Group 2 consisted of isolate BBTV from Kulon Progo and Gunung Kidul with three fragments DNA of 400, 388, and 323 bp. Group 3 consisted of isolate from Bantul with two fragments DNA of 723 and 376 bp. Further study on the complete characteristics of these groups is still needed.

Key words: Abaca bunchy top virus, Banana bunchy top virus, bunchy top disease, DNA extraction, PCR, RFLP

#### **INTISARI**

Penyakit kerdil pisang dapat disebabkan oleh infeksi virus yang berbeda yaitu *Banana bunchy top virus* (BBTV) atau *Abaca bunchy top virus* (ABTV). Kedua virus tersebut ditularkan secara persisten oleh kutu daun *Pentalonia nigronervosa* Coq. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan membedakan virus dengan *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP). Tanaman terinfeksi dikoleksi dari Yogyakarta (Sleman, Kota Yogyakarta, Bantul, Gunung Kidul, dan Kulon Progo). Metode *Phytopure DNA Extraction Kit* dan CTAB digunakan untuk mengisolasi DNA total. Primer universal *Common DNA region* (S-CRF/S-CRR) dan primer spesifik DNA-R BBTV (CI-CRF dan CI-CRR) digunakan dalam amplifikasi dengan PCR. Produk PCR BBTV dianalisis dengan teknik RFLP menggunakan enzim restriksi *Dra I*. Hasil penelitian memperkuat laporan sebelumnya bahwa penyakit kerdil pisang di Yogyakarta disebabkan oleh BBTV, dan belum ditemukan ABTV. Berdasarkan analisis RFLP, BBTV dapat dibedakan menjadi tiga kelompok. Kelompok 1 yaitu BBTV isolat Sleman dan Kota Yogyakarta dengan dua fragmen DNA berukuran sekitar 400 dan 388 bp. Kelompok 2 yaitu BBTV isolat Kulon Progo dan Gunung Kidul dengan tiga fragmen DNA berukuran sekitar 400, 388, dan 323 bp. Kelompok 3 yaitu BBTV isolat Bantul dengan dua fragmen DNA berukuran sekitar 723 dan 376 bp. Penelitian tentang karakterisasi dari ketiga kelompok tersebut masih diperlukan.

Kata kunci: *Abaca bunchy top virus*, *Banana bunchy top virus*, ekstraksi DNA, penyakit kerdil, PCR, RFLP

#### **PENGANTAR**

Pisang (*Musa* sp.) merupakan tanaman hortikultura asal Asia Tenggara yang telah tersebar luas ke seluruh dunia termasuk Indonesia. Salah satu kendala biologis dalam budidaya pisang dan pisang abaca di Indonesia adalah adanya penyakit kerdil pisang (*bunchy top*) yang disebabkan oleh *Banana bunchy top virus* (BBTV) dan di Filipina disebabkan oleh dua virus yaitu BBTV dan *Abaca bunchy top virus* (ABTV).

BBTV merupakan anggota genus Babuvirus, famili Nanoviridae, sedangkan ABTV merupakan anggota baru dari genus yang sama. ABTV mempunyai komponen genom yang sama dengan enam komponen genome BBTV dan juga menginfeksi *Musa* di Asia Tenggara (Thomas, 2008). BBTV dan ABTV ditularkan oleh kutu daun pisang *Pentalonia nigronervosa* Coquerel dan tersebar luas terutama terbawa pada saat pengangkutan bibit pisang (Furuya *et al.*, 2006).

Penyakit kerdil pisang pertama kali dilaporkan di Fiji pada tahun 1891. Di Australia penyakit ini masuk pada tahun 1913 kemudian meluas dengan cepat dan menyebabkan kematian sekitar 90 % per-tanaman pisang pada tahun 1927. Selain pada pi-sang, penyakit ini juga terdapat pada abaca (*Musa textilis* Nee) yang ditanam oleh satu perkebunan swasta di Banyuwangi (Semangun, 2004).

Penyakit kerdil pada abaca menjadi masalah serius di Filipina sekitar 40 tahun yang lalu, ditemukan pertama kali di Silang, Cavite tahun 1915 dan menyebar ke negara bagian tempat petani menanam abaca. Hasil identifikasi menunjukkan virus yang ditemukan pada abaca mempunyai karakter yang sama dengan BBTV dan termasuk dalam kelompok Asia (Furuya *et al.*, 2006). Pertanyaan muncul mengenai benar atau tidaknya kerdil abaca atau kerdil pisang disebabkan oleh virus yang sama atau berbeda. Terdapat indikasi bahwa penya-kit pada abaca (ABTV) tidak dapat ditularkan ke pisang (Simmonds, 1959). Di Indonesia belum ada klarifikasi mengenai keberadaan ABTV sebagai pe-nyebab kerdil pisang.

Untuk mengetahui penyebab penyakit kerdil pisang secara jelas diperlukan teknik deteksi yang akurat. Deteksi penyebab penyakit kerdil pisang di Indonesia yang pernah dilakukan antara lain dengan uji penularan melalui vektor (*P. nigronevosa* Coq.) (Agustina, 2000), *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) dan *polymerase chain reaction* (PCR) (Furuya *et al.*, 2004). Penelitian ini bertujuan untuk memastikan penyebab kerdil pisang dan mengetahui adanya perbedaan dari isolat virus yang terkumpul.

## BAHAN DAN METODE

### *Koleksi Daun Pisang Bergejala Penyakit Kerdil*

Pengambilan sampel dilakukan di beberapa da-erah di Yogyakarta yaitu Sleman, Kota Yogyakarta, Bantul, Gunung Kidul, dan Kulon Progo. Daun ba-gian pangkal nomor 2 atau 3 dari tanaman pisang diambil menggunakan pisau, kemudian dimasukkan kotak pendingin agar daun tetap segar. Sebelum di-proses, sampel disimpan dalam *freezer* suhu -20°C atau dalam keadaan kering segar (*fresh dry*) dengan menggunakan silika gel sebagai absorban.

### *Deteksi Virus dengan Teknik Polymerase Chain Reaction*

Sampel daun yang digunakan yaitu seberat ± 0,1 gram untuk ekstraksi DNA dengan menggunakan metode *Nucleon PhytoPure DNA Extraction Kit* (Amersham Biosciences Inc.). Daun digerus dalam

mortar berisi 600 µl *reagent 1*, kemudian 200 µl *reagent 2* ditambahkan. Setelah itu, ekstrak tanaman diinkubasi dalam penangas air pada suhu 65°C selama 10 menit kemudian dalam es selama 20 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan 500 µl kloroform dingin dan 100 µl *Nucleon PhytoPure DNA extraction* ditambahkan, lalu dikocok selama 10 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi pada 4300 rpm selama 10 menit. Supernatan hasil sentrifugasi dipindahkan ke tabung yang baru, kemudian isopropanol dingin (1:1) ditambahkan. Setelah itu, supernatan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit dan didapatkan pelet. Pelet dicuci dengan etanol 70% dan disentrifugasi pada 15.000 rpm selama 5 menit. Pelet dikeringanginkan selama 10 menit di suhu ruang, kemudian disuspensikan dengan bufer TE sebanyak 30–50 µl, diaduk sampai pelet DNA tersuspensi secara sempurna.

Primer yang digunakan pada analisis ini terdiri dari dua pasang primer. Primer S-CRF (5'-GGGGCTTATTATTACCCCGAGC-3') dan S-CRR (5'-AGCGCTTACCTGGCGC AGCACTAACT-3') yang mencetak atau memperbanyak *stem-loop Common Region* (CR-SL) dari BBTV dan ABTV yang menghasilkan pita DNA dengan ukuran sama sebesar sekitar 1100 bp. Kemudian primer C1-CRF (5'-CAGGCGCACACCTTGAGAAACGAAAG GGAA-3') dan C1-CRR (5'-GGAAGAAGCC TCT CATCTGCTTCAGAGAGC-3') yang mencetak DNA-1 yang hanya terdapat pada BBTV dengan ukuran pita DNA sekitar 1100bp (Su, 1999). Apabila sampel teramplifikasi dengan primer S-CR maka sampel positif terinfeksi BBTV atau ABTV, apabila sampel teramplifikasi dengan primer C1-CR maka sampel positif terinfeksi BBTV dan apabila tidak teramplifikasi maka sampel positif terinfeksi ABTV.

Amplifikasi dilakukan dengan mesin PCR (GeneAmp PCR System 9700). Reaksi PCR menggunakan KOD polymerase (Novagen) dan dilakukan dengan 30 siklus. Untuk primer C1-CRF/C1-CRR, denaturasi pada 94°C selama 4 menit dan suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* 56°C selama 30 detik, *extension* pada 72°C selama 1 menit dan 72°C selama 10 menit. Untuk primer S-CRF/S-CRR, denaturasi pada 94°C selama 4 menit dan pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada 60°C selama 30 detik, *extension* pada 72°C selama 1 menit dan 72°C selama 10 menit (Su, 1999). Hasil amplifikasi DNA selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis dalam *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* 6% (PAGE), dengan target DNA fragmen sebesar 1111 bp.

### ***Analisis DNA dengan Restriction Fragment Length Polymorphism***

Hasil amplifikasi PCR pada tiap sampel dipindahkan sebanyak 5  $\mu$ l ke tabung baru, kemudian DNA dipotong dengan menggunakan enzim restriksi *Dra* I. Campuran reaksi berupa 5  $\mu$ l DNA ditambah 1  $\mu$ l enzim restriksi dan 1,5  $\mu$ l bufer enzim (10 $\times$ ). Volume campuran reaksi ditambahkan akuades sampai 15  $\mu$ l dan diinkubasi pada 37°C selama 2–3 jam di dalam penangas air (Yasmin *et al.*, 2005). Hasil amplifikasi DNA selanjutnya divisualisasi dengan elektroforesis dalam PAGE 6%.

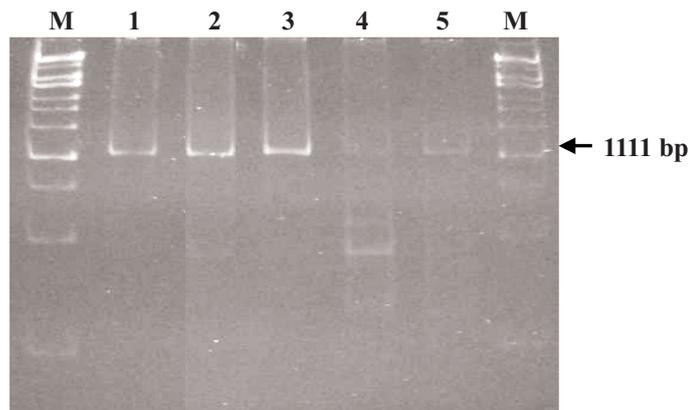
## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### ***Deteksi BBTV dan /atau ABTV dengan PCR***

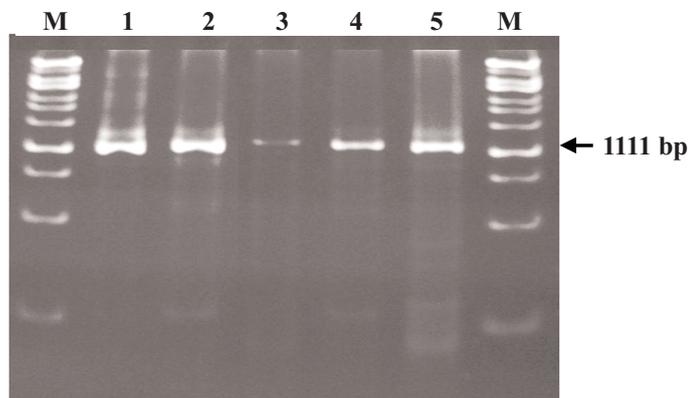
Hasil amplifikasi PCR menunjukkan bahwa penyakit kerdil pisang di daerah Yogyakarta

disebabkan oleh BBTV. Pita DNA berukuran sekitar 1111 bp berhasil teramplifikasi menggunakan pasangan primer S-CRF/S-CRR dan C1-CRF/C1-CRR dari semua sampel (Gambar 1 dan Gambar 2). Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Furuya *et al.* (2004), yang meneliti pisang yang bergejala kerdil di Kebun Plasma Nutfah Pisang Yogyakarta dan sesuai dengan ukuran genom DNA-1 (DNA-R) BBTV sebesar 1111 bp (Vishoi, *et al.*, 2009). ABTV belum terdeteksi pada pisang bergejala kerdil di Yogyakarta, kemungkinan karena masih terbatasnya jumlah sampel yang diuji. Sampel yang diuji hanya satu untuk tiap wilayah Yogyakarta.

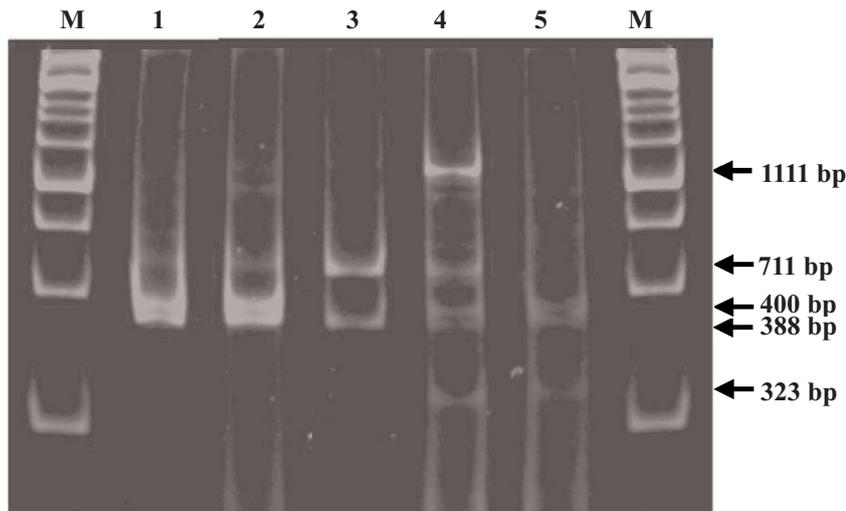
Mengingat PCR memiliki tingkat sensitivitas dan ketelitian yang tinggi, maka metode ini mempunyai harapan untuk dikembangkan lebih lanjut sebagai alat deteksi BBTV dalam rangka pengelolaan penyakit tersebut.



Gambar 1. Visualisasi fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer S-CRF & S-CRR pada PAGE 6%. M: DNA marker 1 kb *ladder*, Line 1: Sleman, Line 2: Kota Yogyakarta, Line 3: Bantul, Line 4: Kulon Progo, dan Line 5: Gunung Kidul  
Tanda panah menunjukkan pita DNA hasil amplifikasi



Gambar 2. Visualisasi fragmen DNA hasil amplifikasi PCR menggunakan primer C1-CRF & C1-CRR pada PAGE 6%. M: DNA marker 1 kb *ladder*, Line 1: Sleman, Line 2: Kota Yogyakarta, Line 3: Bantul, Line 4: Kulon Progo, dan Line 5: Gunung Kidul  
Tanda panah menunjukkan pita DNA hasil amplifikasi



Gambar 3. Visualisasi pita DNA BBTV hasil pemotongan menggunakan enzim *Dra* I pada PAGE 6% M: DNA marker 1 kb *ladder*, Line 1: Sleman, Line 2: Kota Yogyakarta, Line 3: Bantul, Line 4: Kulon Progo, dan Line 5: Gunung Kidul  
Tanda panah menunjukkan pita DNA hasil pemotongan dengan enzim *Dra* I

Keberhasilan teknik PCR dalam mendeteksi virus pada tanaman pisang menunjukkan bahwa teknik tersebut dapat dipilih sebagai alat deteksi dini dalam rangka diagnosis BBTV. Keberhasilan dan keakuratan diagnosis penyakit tanaman akan sangat menentukan keberhasilan dalam penentuan strategi pengendalian penyakit. Akhir-akhir ini perbanyak tanaman pisang dilakukan dengan teknik kultur jaringan, sehingga penggunaan eksplan bebas virus hasil skrining dengan teknik PCR akan sangat berguna dalam penyediaan sumber bibit sehat dan mengurangi sumber inokulum awal bagi penularan penyakit di lapangan.

#### **Diferensiasi isolat BBTV di Yogyakarta**

Teknik RFLP dapat digunakan untuk mengetahui hubungan kekerabatan maupun variasi genetik dari beberapa isolat BBTV yang ditemukan. Berdasarkan runutan nukleotida segmen DNA-R dari isolat BBTV asal Kanpur (India) terdapat dua situs pemotongan dengan enzim *Dra* I (TTT↓AAA) yang menghasilkan tiga potongan pita DNA masing-masing berukuran sekitar 404, 386, dan 321 bp (Raj & Vishnoi, 2006).

Analisis RFLP DNA BBTV dengan enzim *Dra* I pada sampel penelitian yang berasal dari Yogyakarta menghasilkan tiga kelompok berdasarkan pola potongan DNA. Kelompok I terdiri dari BBTV isolat Sleman dan Kota madya Yogyakarta dengan dua fragmen DNA masing-masing berukuran sekitar 400 dan 388 bp. Kelompok 2 terdiri dari isolat Kulon Progo dan Gunung Kidul dengan tiga

fragmen DNA masing-masing berukuran sekitar 400, 388, dan 323 bp. Sedangkan kelompok 3 hanya terdiri dari BBTV isolat asal Bantul dengan dua fragmen DNA masing-masing sekitar 723 dan 376 bp. Pada isolat Kulon Progo terdapat pita DNA BBTV berukuran 1111 bp, pita tersebut merupakan DNA yang tidak terpotong oleh enzim *Dra* I. Selain pita DNA yang tidak terpotong, terdapat pita berukuran sekitar 700 bp, pita tersebut tidak termasuk ke dalam pola potongan DNA BBTV melainkan pita DNA tanaman atau DNA lain. Hal ini menunjukkan bahwa hasil PCR tidak murni karena masih terdapat pita DNA *non-target*.

Perbedaan pola potongan pita DNA BBTV pada beberapa isolat Yogyakarta dapat diakibatkan adanya mutasi gen. Jika mutasi terjadi pada situs pemotongan maka akan menyebabkan situs pemotong tersebut berubah. Selain itu *genetic rearrangement* dapat menyebabkan situs tersebut tidak lagi dikenali oleh enzim, atau enzim restriksi akan memotong daerah lain yang berbeda. Proses ini menyebabkan terbentuknya fragmen-fragmen DNA yang berbeda ukurannya dari satu organisme ke organisme lainnya. Polimorfisme ini selanjutnya digunakan untuk membuat pohon filogeni/dendogram kekerabatan kelompok (Suryanto, 2003).

Adanya bukti awal BBTV di Yogyakarta dan sekitarnya dapat dikelompokkan menjadi tiga kelompok mengisyaratkan perlunya kajian lanjutan tentang karakterisasi ketiga kelompok virus tersebut.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Project ACIAR dengan judul *Integrated Crop Production of Banana in Indonesia and Australia* bagian aktivitas *Validate and Confirm Mitigation Strategies for the Management of BBDP*, nomor project HORT/2008/040 yang telah membiayai sebagian dari penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, L. 2000. *Pengaruh Makan Inokulasi Berantai Pentalonia nigronervosa (Homoptera: Aphididae) terhadap Penularan Penyakit Kerdil Pisang (Bunchy Top)*. Skripsi. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Furuya, N., S. Somowiyarjo, & K.T. Natsuaki. 2004. Virus Detection from Lokal Banana Cultivars and The First Molecular Characterization of Banana Bunchy Top Virus in Indonesia. *Journal of Agricultural Science* 49: 75–81.
- Furuya, N., T.O. Dizon, & K.T. Natsuaki. 2006. Molecular Characterization of Banana Bunchy Top Virus and Cucumber Mosaic Virus from Abaca (*Musa textilis* Nee). *Journal of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture* 51: 92–101.
- Raj, S.K. & R. Vishnoi. 2006. *Banana Bunchy Top Virus Isolate Kanpur Segment DNA-1, Complete Sequence*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, modified 8/01/10.
- Simmonds, N.W. 1959. *Bananas*. John Wiley & Sons Inc, New York. 466 p.
- Su, H.-J. (1999) Development and Application of Molecular Diagnostic Probes for Detection, Characterization, and Management of Banana Viruses. p. 35–51. In A.B. Molina & V.N. Roa (eds.), *Advancing Banana and Plantain R&D in Asia and the Pacific: Proceedings of the 9th INIBAP-ASPNET regional Advisory Committee meeting held at South China Agricultural University, Guangzhou, China, 2–5 November 1999*, INIBAP, Montpellier, France.
- Sulandari, S., Sumardiyono, S. Somowiyarjo, Triharso & Ambarwati H. 1994. *Inventarisasi Penyakit Virus pada Tanaman Pisang di Daerah Istimewa Yogyakarta*. Laporan Penelitian, Yogyakarta. 27 p.
- Sunarjono, H. 2002. *Budidaya Pisang dengan Bibit Kultur Jaringan*. Penebar Swadaya, Jakarta. 96 p.
- Suryanto, D. 2003. *Melihat Keanekaragaman Organisme Melalui Beberapa Teknik Genetika Molekuler*. <http://library.usu.ac.id/download/fmipa/biologi-dwis.pdf>, modified 20/4/10. 12 p.
- Thomas, J.E. 2008. *Banana Bunchy Top Virus*. p. 94–100. In Mahy B.W.J & M.H.V. Van Regenmortel (eds.), *Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology*. Elsevier Ltd, London.
- Vishnoi, R, S. Krishna R, & Vivek P. 2009. Molecular characterization of an Indian isolate of Banana bunchy top virus based on six genomic DNA components. *Virus Genes* 38: 334–344.
- Yasmin, T., S.M. Saqlain Naqvi, H.Shah, & S.Khalid. 2005. RFLP-based Relationship of Pakistani Isolate of Banana Bunchy Top Virus with South Pacific Virus Group. *Pakistan Journal of Botany* 37: 399–406.