

**DETEKSI BEGOMOVIRUS PADA CABAI SECARA CEPAT MELALUI
ISOLASI GENOM DNA**

***RAPID DETECTION OF BEGOMOVIRUS ON CHILI PEPPER
USING ISOLATION OF DNA GENOME***

Sri Sulandari

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, UGM, Kampus Bulaksumur,
Yogyakarta.

Rusmilah Suseno Sri Hendrastuti Hidayat, Soemartono Sosromarsono

Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, IPB, Kampus Darmaga,
Bogor 16680

Jumanto Harjosudarmo

Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik
Pertanian, Jalan Tentara Pelajar, Bogor

ABSTRACT

Pepper yellow leaf curl disease has been widely spreading in Indonesia, especially in Special Province of Yogyakarta and Central Java since 2000. The disease is difficult to control because its fast spreading over in the field by the vector. To prevent epidemic of the disease, early detection method of the causal agent is needed. The aim of the research was to detect the causal agent of the pepper yellow leaf curl disease by isolating the DNA genome. Using the Guanidine-alkaline method, two specific fragments of the DNA were produced approximately at 2600 bp and 1600 bp. The DNA fragments were similar with the DNA genome of Begomovirus. The method applied in this study is faster and easier for early detection of the Begomovirus in infected crop than detection by the Polymerase chain reaction (PCR).

Keywords: *Pepper yellow leaf curl disease, Begomovirus, Guanidine-alkaline method.*

INTISARI

Penyakit daun keriting kuning pada cabai sudah tersebar luas di Indonesia khususnya di Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah sejak tahun 2000. Penyakit ini sulit dikendalikan karena penyebarannya di lapangan sangat cepat melalui serangga vektornya. Untuk mencegah timbulnya epidemi penyakit tersebut diperlukan cara deteksi dini penyebab penyakitnya.

Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi penyebab penyakit daun keriting kuning cabai secara cepat dan mudah melalui isolasi genom DNANYA. Isolasi genom DNA menggunakan metode Guanidine-alkaline diperoleh dua fragmen DNA yang berukuran

sekitar 2600 bp dan 1600 bp. Kedua fragmen DNA tersebut identik dengan genom DNA dari Begomovirus. Metode ini lebih cepat dan mudah diaplikasikan untuk deteksi dini keberadaan Begomovirus dari pada metode *Polymerase chain reaction (PCR)*.

Kata kunci: Penyakit daun keriting kuning cabai, Begomovirus, Metode Guanidin-alkalin

PENGANTAR

Penyakit daun keriting kuning pada cabai sudah tersebar luas di Indonesia khususnya di Daerah Istimewa Yogyakarta dan Jawa Tengah sejak tahun 2000. Gejala yang ditimbulkan mirip dengan gejala penyakit cabai yang ditemukan di daerah Jawa Barat pada tahun 1998 (Hidayat *et al.*, 1999) dan Yogyakarta pada tahun 2000 yang disebabkan oleh geminivirus (Sulandari *et al.*, 2001). Geminivirus merupakan salah satu kelompok virus yang banyak menimbulkan kerusakan pada berbagai tanaman yang dibudidayakan di daerah tropik maupun subtropik (Polston & Anderson, 1997; Brown, 1997). Selain menyerang berbagai tanaman pertanian, geminivirus juga dapat menginfeksi berbagai gulma (Rojas *et al.*, 1993; Roye *et al.*, 1997; Salati *et al.*, 2002).

Famili Geminiviridae terdiri atas empat genus yaitu *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Begomovirus* dan *Topocuvirus* (Fauquet *et al.* 2000). Perbedaan genus tersebut berdasarkan struktur genom (bipartit atau monopartit), jenis serangga vektor (wereng atau kutukebul) dan inangnya (monokotil atau dikotil). *Begomovirus* atau yang sebelumnya tergolong dalam subkelompok III kebanyakan memiliki genom yang terdiri atas dua molekul DNA (bipartit) yang terpisah yaitu DNA-A dan DNA-B yang masing-masing berukuran

sekitar 2,7 – 3 kb dan hanya ditularkan oleh serangga vektor yaitu *Bemisia tabaci* Genn.

Anggota famili Geminiviridae akan memperbanyak diri di dalam inang melalui mekanisme *rolling circle* dengan menggunakan *replicative forms* (ds-DNA) sebagai *template* dalam proses replikasinya (Gutierrez, 2000). Oleh karena anggota Geminiviridae mempunyai kandungan genom DNA yang relatif lebih stabil sifatnya dibandingkan genom RNA maka saat ini banyak dilakukan penelitian secara molekuler untuk karakterisasi maupun usaha pengendaliannya. Geminivirus yang menyebabkan penyakit daun keriting kuning cabai yang ditularkan oleh *B. tabaci* masuk dalam kelompok Begomovirus.

Pengendalian penyakit akibat serangan Begomovirus sangat sulit dilakukan sampai saat ini. Salah satu cara untuk mencegah penyakit ini adalah dengan melakukan deteksi dini. Deteksi Begomovirus yang sudah umum dilakukan adalah dengan *PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Melalui teknik PCR telah berhasil mendeteksi Begomovirus pada tanaman inang dalam waktu singkat (Rojas *et al.*, 1993, Polston & Anderson, 1997; Samretwanich *et al.*, 2000). Selain pada tanaman, adanya virus dalam serangga dan sebaran virus di dalam tubuh serangga vektornya juga dapat dideteksi dengan teknik PCR (Mehta *et al.*, 1994; Rosell *et al.*, 1999).

Deteksi cara ini apabila diterapkan di Indonesia masih mempunyai banyak kendala antara lain diperlukan mesin PCR, reagen yang dibutuhkan harganya mahal dan keterbatasan teknisi sehingga belum semua laboratorium siap dengan teknologi tersebut.

Melalui pendekatan biologi molekuler dengan melakukan isolasi genom DNA Begomovirus dari tanaman sakit menggunakan metode Guanidin-alkalin (GA methods) diharapkan dapat dilakukan secara cepat, praktis dan biaya lebih murah dibanding dengan deteksi molekuler yang lain, misalnya dengan teknik PCR. Cara ini telah berhasil digunakan untuk mendeteksi anggota *Geminiviridae* yaitu *Wheat dwarf virus* (Bendahmane *et al.*, 1995). Menggunakan metode GA hasil ekstraksi DNA dari tanaman yang terinfeksi akan langsung dapat diamati adanya fragmen DNA tanpa melakukan perbanyakan (amplifikasi DNA) dengan mesin PCR.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan deteksi secara cepat dan mudah melalui isolasi genom DNA Begomovirus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai menggunakan metode Guanidin-alkalin.

BAHAN DAN METODE

Tempat dan Waktu Penelitian. Penelitian dilakukan di laboratorium Virologi, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fak. Pertanian IPB, dan rumah kaca Balai Penelitian Bioteknologi Pertanian (Balitbio) di Cimanggu, Bogor. Penelitian dilakukan mulai bulan Mei -

September 2003.

Perbanyak Sumber Inokulum

Sumber inokulum berasal dari tanaman cabai yang menunjukkan gejala penyakit daun keriting kuning. Pada penelitian ini digunakan empat isolat yang berasal dari lokasi yang berbeda yaitu: Segunung, Cugenang, Lembang dan Yogyakarta. Masing-masing isolat diambil dari kultivar cabai rawit di lapangan yang menunjukkan gejala daun keriting dan berwarna kuning, tulang daun menebal, serta helaian daun yang tumbuh berikutnya kecil-kecil dan kaku.

Isolat-isolat tersebut selanjutnya diisolasi dengan cara ditularkan ke tanaman tomat menggunakan kutukebul tembakau hasil perbanyakan (*rearing*) di rumah kaca. Penularan ke tanaman tomat dilakukan dengan memberi perlakuan periode akuisisi serangga vektor selama 48 jam pada tanaman cabai sakit dan periode inokulasi pada tanaman tomat sehat selama 24 jam. Penularan masing-masing isolat menggunakan 10 ekor kutu kebul. Selain penularan ke tomat juga dilakukan penularan ke *N. Benthamiana* dengan perlakuan yang sama.

Isolasi ds-DNA menggunakan metode Guanidin-alkalin (GA method). Ds-DNA atau *replicative form* dari Begomovirus diisolasi secara langsung dari daun terinfeksi menggunakan metode Guanidin-alkalin (Bendahmane *et al.*, 1995). Untuk bahan ekstraksi DNA total tanaman selain cabai juga digunakan tanaman tomat dan *N. Benthamiana*.

Bahan tanaman sakit sebanyak 50 – 100 mg digerus dalam nitrogen cair sampai menjadi serbuk, kemudian ditambah 150µl larutan penyangga ekstraksi (*guanidine thiocyanate* 4 M, *sodium acetate* 25 mM, pH 5,2, *laurylsarcosine* 0,5% dan *dithiothreiole* 0,1%) dan diinkubasikan pada suhu kamar. Setelah 10 menit kemudian ditambah 300 µl larutan alkali (NaOH 0,2 N, SDS 1%), dan diinkubasikan pada suhu kamar selama 10 menit. Selanjutnya pada campuran tersebut ditambah 225 µl KoAc 3 M, pH 4,8 dan diinkubasi dalam es selama 10 menit, kemudian disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit pada 4 °C . Supernatan ditambah larutan fenol: kloroform: alkohol isoamil = (25:24:1) dengan volume yang sama, kemudian divorteks dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Perlakuan ini diulang sebanyak 2 kali. Supernatan yang diperoleh ditambah 0,1 volume NaOAc 3 M , pH 5,2 dan 2,5 volume etanol absolut bersuhu – 20 °C, kemudian divorteks dan diinkubasikan pada suhu – 20°C selama 2 jam. Larutan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, kemudian pelet ditambah dengan 500 µl etanol 70 % bersuhu – 20 °C dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Pada tahapan ini dilakukan sebanyak 2 kali. Pelet yang diperoleh dikeringkan dalam vakum selanjutnya diresuspensi dengan 50µl akuades steril dan siap dielektroforesis atau disimpan pada suhu –20 °C.

Analisis Hasil. DNA hasil ekstraksi

divisualisasi langsung dengan melakukan elektroforesis dengan agaros 1% dalam buffer 0,5 x TBE (Tris borat-EDTA), selanjutnya diamati menggunakan UV setelah dicat dengan etidium bromida (Maniatis *et al.*, 1982).

Hasil eketroforesis kemudian diamati ada tidaknya fragmen DNA yang terisolasi. Fragmen DNA tersebut diukur menggunakan marker 1 Kb DNA ladder. Ukuran fragmen DNA yang diperoleh kemudian dibandingkan dengan ukuran fragmen DNA sirkuler Begomovirus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penularan ke berbagai tanaman yang digunakan untuk bahan ekstraksi DNA. Gejala yang muncul tidak berbeda pada inang yang sama untuk untuk masing-masing isolat (Segunung, Cugenang, Lembang dan Yogyakarta). Hasil inokulasi pada cabai menunjukkan gejala helaian daun berwarna kuning cerah, melengkung ke atas dan tulang daun menebal. Daun yang tumbuh berikutnya menjadi kecil-kecil dan malformasi. Inokulasi pada tanaman tomat menghasilkan gejala helai daun menggulung ke atas dan tulang daun menebal. Tepi daun berwarna kuning dan helai daun muda yang tumbuh menjadi kecil dan malformasi. Gejala yang timbul pada *N. benthamiana* adalah helai daun menggulung ke atas sampai membentuk struktur seperti mangkuk (*cupping*). Tulang daun menebal secara tidak beraturan dan urat daunnya menonjol sehingga permukaan bawah daun sangat kasar. Helai daun muda yang tumbuh

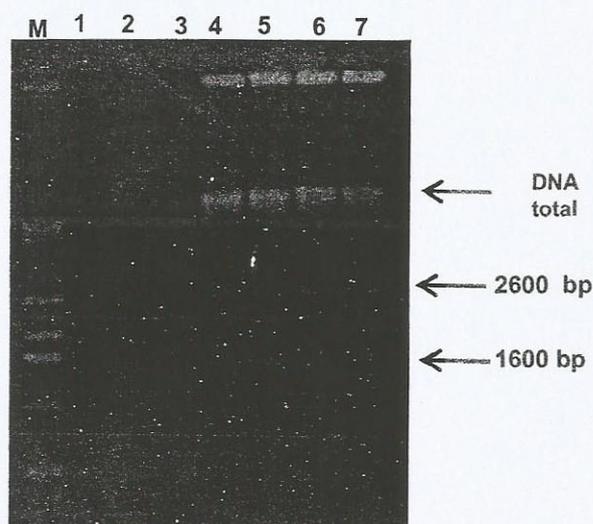


Gambar 1. Hasil inokulasi penyebab penyakit daun keriting kuning cabai pada *N. benthamiana* (10 hari setelah inokulasi)

mengecil dan malformasi.(Gambar 1).

Isolasi ds-DNA menggunakan metode Guanidin-alkalin (*GA method*). Ekstraksi DNA total tanaman menggunakan metode GA berhasil mengisolasi dua fragmen DNA berukuran 2600 bp dan 1600 bp. (Gambar 2). Fragmen DNA yang berukuran 2600 bp (2,6 kb) tersebut merupakan ds-DNA yang merupakan bentuk *replicative form* (RF) Begomovirus yang berbentuk sirkuler, sedangkan yang berbentuk linier mempunyai ukuran sekitar 1600 bp (1,6 kb). *Replicative form* banyak dibentuk selama proses replikasi berlangsung di dalam inang. Selama proses replikasi selain bentuk RF yang berbentuk sirkuler juga banyak terbentuk ss-DNA yang berbentuk linier. Deteksi molekuler dengan mengisolasi ds-DNA yang merupakan *replicative form* Begomovirus dengan cara mengekstraksi jaringan tanaman sakit

dengan metode Guanidin Alkalin merupakan suatu pilihan yang tepat untuk diaplikasikan. Fragmen DNA yang dihasilkan membuktikan bahwa Begomovirus dapat diidentifikasi secara langsung dari tanaman sakit tanpa melakukan amplifikasi menggunakan mesin PCR. Deteksi geminivirus menggunakan PCR walaupun mempunyai banyak keunggulan, tetapi untuk aplikasinya terdapat banyak kendalanya antara lain biayanya mahal, perlu alat khusus dan tenaga terlatih. Metode Guanidin Alkalin (*GA methods*) dapat digunakan untuk mengatasi kendala tersebut. Identifikasi menggunakan metode GA ini mempunyai prospek yang baik untuk alat deteksi Begomovirus secara molekuler karena lebih cepat, mudah dan biayanya lebih murah dibandingkan dengan deteksi menggunakan PCR.

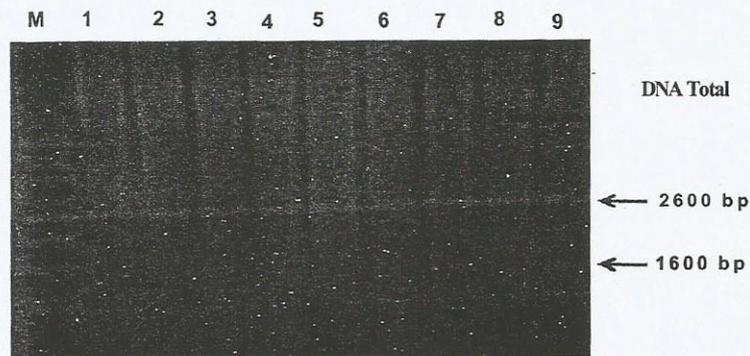


Gambar 2. Fragmen DNA tanaman *N. benthamiana* diinokulasi penyebab penyakit daun keriting kuning cabai dan diekstraksi dengan metode Guanidin-alkalin.

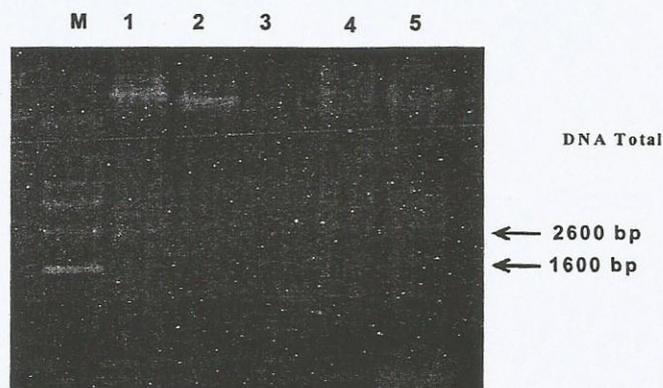
Keterangan : M: marker 1 kb; 1-3: sampel tanaman sehat; 4 -7: sampel tanaman sakit (4: isolat Segunung, 5: isolat Yogyakarta, 6: isolat Cugenang dan 7: isolat Lembang).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada tanaman cabai, tomat dan *N. Benthamiana* yang digunakan sebagai inang perbanyakan dapat terdeteksi fragmen DNA. Untuk masing-masing isolat (Segunung, Cugenang, Lembang dan Yogyakarta) yang diekstraksi dari daun *N. Benthamiana* mempunyai ketebalan fragmen DNA yang hampir sama dan tampak lebih jelas dibandingkan dengan hasil ekstraksi menggunakan inang lain yaitu cabai dan tomat. Fragmen DNA yang diekstraksi dari berbagai jenis tanaman ternyata berbeda ketebalan fragmen DNANYA, hal ini erat kaitannya dengan konsentrasi virus di dalam tanaman uji tersebut. Fragmen DNA yang terbentuk terlihat lebih tipis pada tanaman cabai dan tomat dibandingkan dengan yang

diekstraksi dari *N. benthamiana* (Gambar 3 dan 4). *N. benthamiana* sangat cocok sebagai inang perbanyakan berbagai virus karena merupakan inang yang rentan dan sedikit kandungan inhibitorynya (Dijkstra & de Jager, 1998). Keunggulan lain dari *N. benthamiana* tersebut juga telah dibuktikan dengan memanfaatkannya sebagai inang perbanyakan untuk bahan pemurnian *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLC) (Hamilton *et al.*, 1981). Selain menggunakan tanaman *N. benthamiana* segar untuk ekstraksi DNA total, tanaman tersebut juga dapat digunakan setelah dikeringkan dengan CaCl_2 ataupun disimpan dalam freezer tanpa mengurangi kualitas hasilnya (Rojas *et al.*, 1993).



Gambar 3. Fragmen DNA tanaman tomat diinokulasi penyebab penyakit daun keriting kuning cabai dan diekstraksi dengan metode Guanidin-alkalin
 M: marker 1 kb; 1-4: sampel tanaman cabai sakit langsung diambil dari lapang (pita DNA sangat tipis); 5: kontrol negatif (tanaman sehat); 6-9: isolat tomat sakit (6: isolat Segunung, 7: isolat Yogyakarta, 8: isolat Cugenang, dan 9: isolat Lembang).



Gambar 4. Fragmen DNA tanaman cabai diinokulasi penyebab penyakit daun keriting kuning cabai dan diekstraksi dengan metode Guanidin-alkalin
 M: marker 1 kb; 1-2: sampel tanaman cabai sakit (1: isolat Segunung, 2: isolat Yogyakarta; 4-5: kontrol negatif (tanaman sehat)

KESIMPULAN

Penyebab penyakit daun keriting kuning cabai dapat dideteksi dengan cepat dan mudah dengan mengisolasi ds-DNA (*replicative form*) menggunakan metode Guanidin-alkalin. Fragmen DNA dengan ukuran kurang lebih 2600 bp dan 1600 bp dapat diisolasi dengan metode tersebut. Ukuran fragmen DNA yang diperoleh mengindikasikan penyebabnya adalah anggota Begomovirus. Deteksi Begomovirus dapat dilakukan dari berbagai tanaman (cabai, tomat dan *N. benthamiana*). *N. benthamiana* merupakan inang yang paling baik digunakan untuk bahan isolasi ds-DNA (*replicative form*) Begomovirus dibandingkan cabai dan tomat.

DAFTAR PUSTAKA

- Bendahmane, M., H.J. Schalk, & B. Gronenborn, B. 1995. Identification and characterization of Wheat dwarf virus from France using rapid method for geminivirus DNA preparation. *Phytopathol.* 85: 1449 – 1455.
- Brown, J.K. 1997. The Biology and Molecular Epidemiology of Geminivirus Subgroup III, p. 125 – 195. In: Stacey, G. & Keen, N.T. 1997: *Plant-Microbe Interactions*. Vol.2. International Thomson Publishing. New York.
- Dijkstra, J., & C.P. de Jager. 1998. *Practical Plant Virology: protocols and exercises*. Springer lab manual. 459 p.
- Fauquet, C.M., D.P. Maxwell, B. Gronenborn, & J. Stanley. 2000. Revised proposal for naming geminiviruses. *Arch Virol* 145/8:1743-1761.
- Gutierrez, C. 2000. Geminiviruses and the plant cell cycle. *Plant Molecular Biology* 43: 763-772.
- Hamilton, W.D.O., R.C. Sanders, R.H.A. Coutts, & K.W. Buck. 1981. *Microbiology Letters* 11: 263 – 267.
- Hidayat, S.H., E.S. Rusli, & Nooraidawati. 1999. Penggunaan primer universal dalam Polymerase chain reaction untuk mendeteksi virusgeminivir pada cabe. *Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI*, Purwokerto, 16 – 18 September 1999.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch & J. Sanbrook. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring harbor, NY.
- Mehta, P., J.A. Wyman, M.K. Nakhla, & Maxwell, D.P. 1994. Polymerase chain reaction detection of viruliferous Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato infecting geminivirus. *J. Econ. Entomol.* 87 (5): 1285-1290.
- Polston, J.E. & P.K. Anderson, 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in western Hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358 – 1369.

- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell, & D.P. Maxwell. 1997. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease* 77: 340- 347.
- Rosell, R.C, I. Torres-Jerez, & J.K. Brown. 1998. Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extract, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathol* 89:239 – 246.
- Roye, M.E., W.A. McLaughlin, M.K. Nakhla. & D.P. Maxwell. 1997. Genetic diversity among geminiviruses associated with the weed species *Sida* sp., *Macroptilium lathyroides*, and *Wissadula amplissima* from Jamaica. *Plant Dis* 81: 1251 – 1258.
- Salati, R., M.K. Nakhla, M.R. Rojas P.Guzman, J. Jaquez, D.P. Douglas, & R.L. Gilbertson. 2002. *Tomato yellow leafcurl virus* in the Dominican Republic Characterization of infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir hosts. *Phytopathol* 92:487-496.
- Samretwanich, K., P. Chiemsombat, K. Kittipakorn, & M. Ikegami . 2000. A new geminivirus associated with a yellow leaf curl disease of pepper in Thailand. *Plan Dis* 84: 1047.
- Sulandari, S., S.H. Hidayat, R. Suseno H. Jumanto, & S. Sosromarsono. 2001. Keberadaan virusgemini pada cabai di DIY. *Kongres Nasional dan Seminar Ilmiah PFI ke XVI*. Bogor, Agustus 2001.