

KARAKTERISASI KUTU KEBUL (*BEMISIA TABACI*) SEBAGAI VEKTOR VIRUS GEMINI DENGAN TEKNIK PCR-RAPD

Sudiono¹ dan Nur Yasin¹

ABSTRACT

Characterization of whitefly (*Bemisia tabaci*) as geminivirus vector based on RAPD-PCR. The variation of whitefly was performed by the appearance of population having different DNA sequence. PCR-RAPD and dendrogram was expected to be used to investigate the variation of whitefly in Sumatera. Morphological observation on the whitefly collected from field area showed that the geminivirus-transmitting vector was *Bemisia tabaci* with varied population. Based on PCR-RAPD and dendrogram analysis in Sumatera, it was known that *Bemisia tabaci* had a high variation both intra and inter field area.

Key words: whitefly, PCR-RAPD, geminivirus

PENDAHULUAN

Pertanaman cabai di Indonesia telah banyak dilaporkan adanya penyakit yang disebabkan oleh virus, diantaranya virus gemini. Virus gemini memiliki daerah penyebaran yang sangat luas terutama di daerah tropik dan subtropik dengan kutu kebul sebagai vektornya. Tingginya serangan virus gemini ini berkaitan dengan populasi kutu kebul (Rusli *et al.*, 1999). Mehta *et al.* (1994) dan Nooraidawati (2002) melaporkan bahwa persentase tanaman yang terserang akan meningkat dengan meningkatnya jumlah kutu kebul yang *viruliferous*. Selain dipengaruhi oleh kelimpahan kutu kebul, persentase serangan virus gemini dapat pula dipengaruhi oleh jenis kutu kebul yang berada di pertanaman. Keragaman kutu kebul ditunjukkan oleh munculnya populasi-populasi spesifik lokasi yang memiliki perbedaan dalam hal kemampuannya untuk makan, reproduksi, dan penularan virus (Bedford *et al.*, 1994). Populasi kutu kebul spesifik lokasi ini umumnya dapat dikenali melalui reaksi fitotoksiknya yang spesifik (Brown *et al.*, 1992), penanda esterase (Costa *et al.*, 1993; Brown *et al.*, 1995) dan beberapa teknik sidik jari DNA (Gawel & Bartlett, 1993; Cervera *et al.*, 2000). Sampai saat ini diketahui ada sekitar 20 biotipe kutu kebul yang telah diidentifikasi. Sebagian biotipe tersebut memiliki kisaran inang dan daerah distribusi yang terbatas, tetapi sebagian besar lainnya, terutama biotipe B, memiliki distribusi yang luas (Bedford *et al.*, 1994).

Di Indonesia informasi keragaman biologi kutu kebul belum dilaporkan, sebaliknya keragaman virus gemini telah diketahui, walaupun masih sangat terbatas. Teknik *polymerase chain reaction-randomly*

amplified polymorphic DNA (PCR-RAPD) merupakan salah satu teknik analisis DNA dan dapat digunakan sebagai penanda genetika karakter spesies dalam suatu ordo serangga termasuk homoptera. Selain itu, teknik tersebut dapat digunakan untuk mendeteksi variasi intraspesifik antar populasi dalam satu spesies dari daerah geografis yang berbeda. Melalui teknik tersebut diharapkan dapat diperoleh informasi yang bermanfaat lebih lanjut untuk mempelajari aspek biologi kutu kebul. Penelitian ini bertujuan mempelajari penggunaan teknik PCR-RAPD untuk mengetahui keragaman kutu kebul di Sumatera.

METODE PENELITIAN

Percobaan dilakukan di Laboratorium Virologi Tumbuhan Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, selama bulan Mei - November 2004 dan September - November 2005.

Pengumpulan Sampel Kutu Kebul. Serangga vektor kutu kebul dikumpulkan dari pertanaman cabai yang menunjukkan gejala seperti terinfeksi virus gemini di lahan petani maupun kebun percobaan milik instansi pemerintah di beberapa tempat, yaitu Propinsi Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, Jambi, Sumatera Barat dan Sumatera Utara. Selanjutnya kutu kebul dimasukkan ke dalam *ependorf* yang berisi alkohol. Pada waktu yang bersamaan juga didata penyebaran populasi pada berbagai tanaman dan gulma. Serangga vektor kutu kebul yang berhasil dikumpulkan selanjutnya digunakan untuk kajian keragaman dengan teknik PCR-RAPD.

¹ Dosen Jurusan Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung
Jl. Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145

Kajian Keragaman Kutu Kebul dengan Teknik PCR- RAPD . Imago kutu kebul yang dikoleksi dari berbagai lokasi digunakan sebagai bahan analisis. Analisis PCR-RAPD dilakukan untuk masing-masing sampel kutu kebul yang berasal dari Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, Jambi, Sumatera Barat, dan Sumatera Utara dengan masing-masing lokasi diulang tiga kali. Ekstraksi DNA kutu kebul dilakukan dengan metode DNA total menggunakan metode yang dideskripsikan oleh Goodwin *et al.* (1994). Sebanyak 10 imago kutu kebul yang telah diawetkan dengan alkohol dimasukkan dalam tabung *eppendorf* yang berisi 20 µl buffer CTAB 2% dan ditambahkan 0,3 pecahan bubuk kaca, kemudian digerus dengan menggunakan mikropistil dalam kondisi dingin. Selanjutnya ditambahkan 80 µl buffer CTAB 2%, divortek dan diinkubasi dalam *waterbath* selama 5 menit pada suhu 65°C, kemudian ditambah 100 µl chloroform:isoamylalkohol (24:1 v/v), hasilnya disentrifugasi pada 800 rpm selama 5 menit. Hasil supernatan yang digunakan sebanyak 90 µl dipindah ke *eppendorf* lain, dan ditambah etanol 10 µl NaOAc 3 M (ph 5.2) dan 200 µl etanol absolut (-20°C), kemudian disimpan dalam *freezer* selama 30 menit. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi pada 11.500 rpm selama 15 menit dan supernatan dibuang. Hasil pellet dicuci dua kali dengan etanol dan disentrifugasi selama 2 menit pada 11.500 rpm. Hasil ekstraksi DNA diamplifikasi dengan menggunakan teknik RAPD-PCR. Primer khusus yang digunakan untuk identifikasi biotipe, yaitu Primer P1 (5'-d[GGTGC GGAA]-3' (*Amersham Pharmacia Biotech*), primer ini telah berhasil digunakan untuk menentukan keragaman kutu kebul *B. tabaci* (Gawell & Bartlett 1993). Volume total campuran berbagai komponen reaksi RAPD sebanyak 25 µl yang terdiri dari 15 µl aquades, 5 µl primer dan 5 µl DNA hasil ekstraksi. Tabung-tabung campuran DNA ditempatkan pada mesin PCR pada suhu 95°C selama 1 menit pada pemanasan awal kemudian suhu 36°C selama 1 menit dan suhu 72°C selama 2 menit sebanyak 45 siklus. DNA hasil amplikasi RAPD-PCR dielektroforesis dalam gel agarose 1,5% menggunakan 1 x buffer TBE dan alat elektroforesis horizontal. Hasil elektroforesis direndam dalam Ethidium Bromida selama 5 menit. Hasil elektroforesis tersebut dilihat dengan menggunakan transluminator UV dan

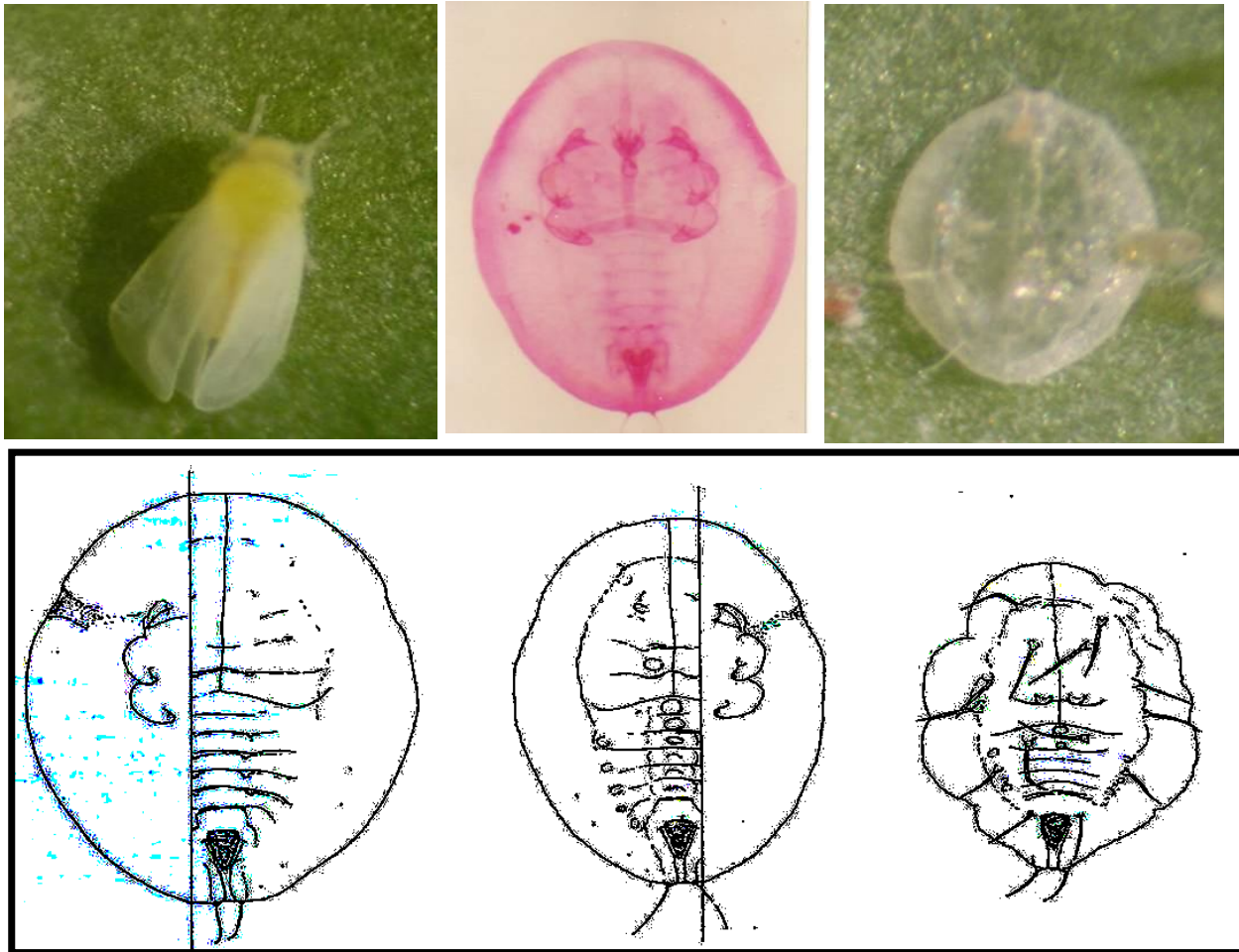
dipotret dengan kamera polaroid.

Analisis Keragaman. Hasil PCR-RAPD kutu kebul dilanjutkan dengan analisis dendogram. Pita-pita DNA diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Data biner yang diperoleh dari RAPD selanjutnya dipakai dalam analisis keragaman genetik menggunakan program komputer *Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSsys) ver 2.02. Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut dilakukan pengelompokan (*cluster analysis*). Hasil *cluster analysis* tersebut berupa dendogram kesamaan genetik yang menunjukkan kesamaan antar sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebaran Populasi di Lapang. Dari pengamatan karakter morfologi kutu kebul yang berasal dari enam lokasi yaitu Lampung, Sumatera Selatan, Bengkulu, Jambi, Sumatera Barat, dan Sumatera Utara ditemukan dua tipe kutu kebul. Deskripsi karakter morfologi kutu kebul tersebut adalah sebagai berikut: Tipe pertama: Imago berwarna putih dengan ukuran sayap bagian belakang tidak lebar, toraks agak kekuningan dengan pergerakan imagonya yang lambat. Tipe yang kedua yaitu imago berwarna putih dengan ukuran lebih besar dibandingkan tipe yang pertama, sayap bagian belakang lebih lebar serta pergerakan imago sangat lincah. Kedua tipe tersebut memiliki imago jantan lebih kecil dan pergerakannya lebih lamban dibandingkan imago betina (Gambar 1).

Martin (1987) mengembangkan metode identifikasi kutu kebul atau *Bemisia tabaci* berdasarkan pengamatan puparium (Gambar 1d). Dari hasil pengamatan di laboratorium, dapat digambarkan sebagai berikut: ciri khas puparium yang tampak antara lain puparium berbentuk bulat panjang, Seta kauda (*caudal setae*) satu pasang yang terletak pada ujung puparium dengan ukuran yang sama, terdapat *vasiform orifice* pada daerah ujung posterior puparium yang berbentuk segitiga dengan ukuran lebih panjang dibandingkan alur bulat (*caudal furrow*). Ciri lainnya yaitu terdapat operkulum (*operculum*) yang menutupi bagian *vasiform orifice* (Gambar 1c).



Gambar 1.a: Imago *B. tabaci*, b: Preparat puparium, c: Puparium, d: Sketsa puparium sebagai kunci determinasi *B. tabaci* yang dikembangkan oleh Martin (1987).

Populasi kutu kebul di lapangan memiliki sebaran yang sangat beragam baik antar propinsi maupun dalam propinsi yang sama, sedangkan inang kutu kebul adalah tanaman cabai itu sendiri. Bila populasinya rendah biasanya kutu kebul ini hanya bersifat sementara (*invander*) pada pertanaman cabai. Inang utama kutu kebul selain cabai adalah tomat, buncis, kacang panjang dan gulma seperti bebadotan dan kentang-kentangan. Masing-masing lokasi pengamatan memiliki populasi yang berbeda, misalnya di Propinsi Lampung rata-rata populasinya tinggi dengan hasil sampling lebih dari 20 ekor per daun. Di daerah Sumatera Selatan, Bengkulu dan Sumatera Utara ditemukan rata-rata populasi sedang atau berkisar 10-20 ekor per daun, sedangkan di Jambi dan Sumatera Barat populasi relatif rendah dengan

rata-rata populasi rendah kurang dari 5 ekor per daun (Tabel 1). Populasi kutu kebul di lapangan selain dipengaruhi oleh kondisi inang, juga dipengaruhi faktor-faktor lain. Berdasarkan informasi dari petani, populasi kutu kebul di lapang mengalami dinamika dari masing-masing lokasi dari waktu ke waktu. Pada musim hujan populasi akan berkurang dan pada saat kemarau populasi akan meningkat, siklus populasi tersebut silih berganti dari tahun ke tahun.

Keragaman Molekuler Kutu Kebul. Hasil visualisasi pada agaros gel menunjukkan bahwa ukuran pita-pita DNA yang diamplifikasi berukuran 250-1200 bp. Pola pita DNA penanda *B. tabaci* dari Lampung terdapat 2 variasi, Sumatera Selatan 3 variasi, Bengkulu 3 variasi, Jambi 3 variasi,

Tabel 1. Rata-rata populasi kutu kebul, inang kutu kebul dan hasil analisis keragaman dengan teknik RAPD

| Lokasi Sampling | Rat-arata Populasi Kutu kebul *) | Inang Kutu kebul **) | RAPD |
|------------------|----------------------------------|--|------------------|
| Lampung | - Tinggi | - Cabai - Gulma - Tan. budidaya lainnya | + (ada 2 varian) |
| Sumatera Selatan | - Sedang | - Cabai - Gulma - Tan. budidaya lainnya | + (ada 3 varian) |
| Bengkulu | - Sedang | - Hanya pada gulma | + (ada 3 varian) |
| Jambi | - Rendah | - Hanya pada gulma | + (ada 3 varian) |
| Sumatera Barat | - Rendah | - Hanya pada gulma | + (ada 1 varian) |
| Sumtera Utara | - Sedang | - Cabai - Gulma | + (ada 2 varian) |

*) = Populasi **Tinggi** bila rata-rata lebih dari 20 ekor per daun, **Sedang** rata-rata 10-20 ekor, **Rendah** rata-rata <5 ekor.

**) = Cetak tebal merupakan tanaman yang paling dominan sebagai inang vektor.

Sumatera Barat 1 variasi, dan Sumatera Utara 2 variasi.

Hal ini menunjukkan bahwa sampel kutu kebul dari lokasi yang samapun memiliki keragaman, dan antar lokasi dari enam lokasi tersebut juga dapat disimpulkan sama yaitu memiliki keragaman yang cukup tinggi (Gambar 2).

Berdasarkan ukuran dan jumlah pita yang polimorfik pada *B. tabaci* seperti disajikan dalam Tabel 2, diperoleh pada setiap populasi dengan perbedaan daerah geografis maupun sampel. Hal ini menunjukkan bahwa populasi dari spesies *B. tabaci* memiliki variasi genetik. Diperolehnya pola pita spesifik untuk masing-masing lokasi dan antar lokasi menunjukkan bahwa teknik PCR-RAPD dapat digunakan untuk mengidentifikasi subspecies, spesies maupun genus, seperti yang dikemukakan oleh Hardys *et al.*, (1992) dalam Meilin (1999) bahwa RAPD adalah teknik yang digunakan dalam molekuler ekologi antara lain untuk dentifikasi taksonomi dan menentukan pelacak spesifik.

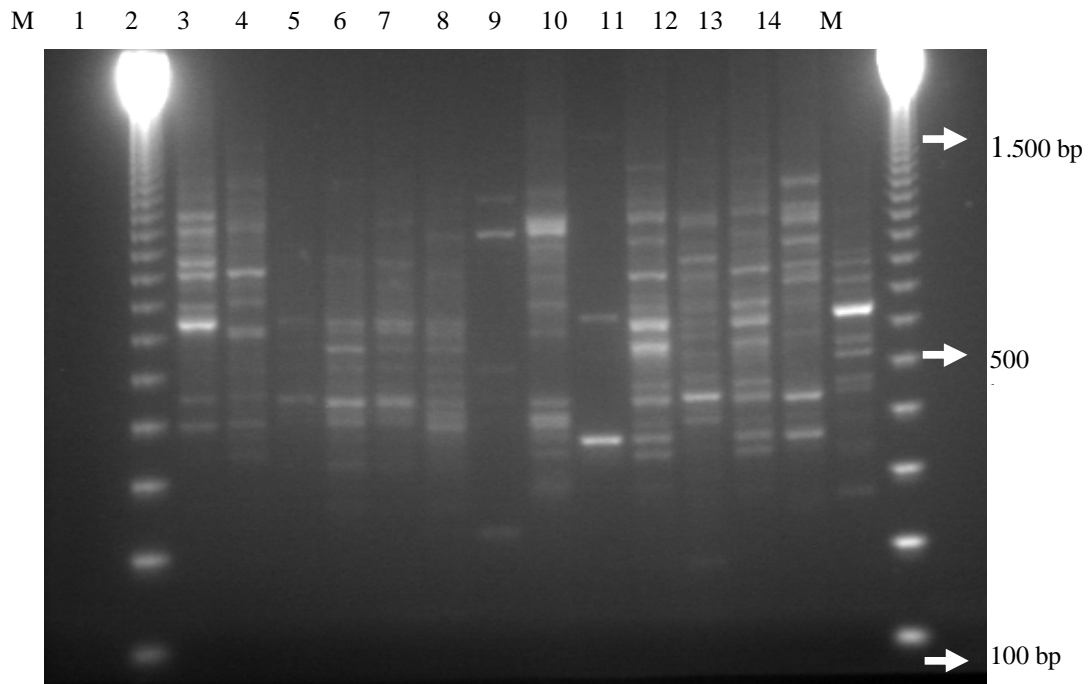
Teknik PCR-RAPD juga banyak digunakan dalam mempelajari variasi interspesifik dan intraspesifik beberapa serangga lain seperti deteksi polimorfisme antar dua parasitoid Hymenoptera, membedakan strain *Plodia interpunctella*, dan mempelajari perbedaan genetik antar dan dalam strain *Oryzaephilus surinamensis* (Edwards & Hoy, 1993, Dowdy & McGaughey 1996, Brown *et al.*, 1997, dalam Meilin 1999).

Hasil analisis PCR-RAPD diikuti analisis dendogram dengan program NTSYS (Gambar 3), yang menunjukkan bahwa kutu kebul dari beberapa

lokasi di Sumatera dapat dibedakan menjadi 6 kelompok besar. Kelompok pertama terdiri dari kutu kebul asal Sumatera Barat-2 dan Bengkulu-2 dengan kelompok lain tingkat kesamaannya 69.2%. Kelompok kedua mencakup Jambi-1 dan Jambi-2 tingkat kesamaan sekitar 63%, kelompok tiga terdiri dari Sumatera Utara-1, tingkat kesamaan 60%. Kelompok empat mencakup Sumatera Barat-1 dan Jambi-3 dengan tingkat kesamaan 55%, kelompok lima mencakup Sumatera Utara-2 dan Sumatera Selatan-1 dengan tingkat kesamaan 51% dan kelompok enam meliputi Bengkulu 1, Sum-Sel-2, Sum-Sel 3, Lampung-1 dan Lampung-2 tingkat kesamaan 40%. Melihat pengelompokan yang terjadi atas sampel dari beberapa lokasi tersebut tampaknya hubungan antar sampel kutu kebul tidak dapat dikelompokkan berdasarkan lokasi geografis, kecuali sampel Lampung dan Sumatera Selatan.

SIMPULAN

Dari hasil percobaan, dapat disimpulkan bahwa pengamatan morfologi terhadap kutu kebul yang dikoleksi dari daerah survei menunjukkan bahwa spesies vektor penular dari virus gemini adalah *Bemisia tabaci* yang ditemukan di semua lokasi dengan populasi yang beragam. Adapun inang *Bemisia tabaci* tidak hanya tanaman cabai tetapi juga tanaman budidaya lainnya, serta gulma. Berdasarkan teknik PCR-RAPD dan analisis dendogram, *B. tabaci* memiliki keragaman yang tinggi baik intra lokasi maupun antar lokasi.

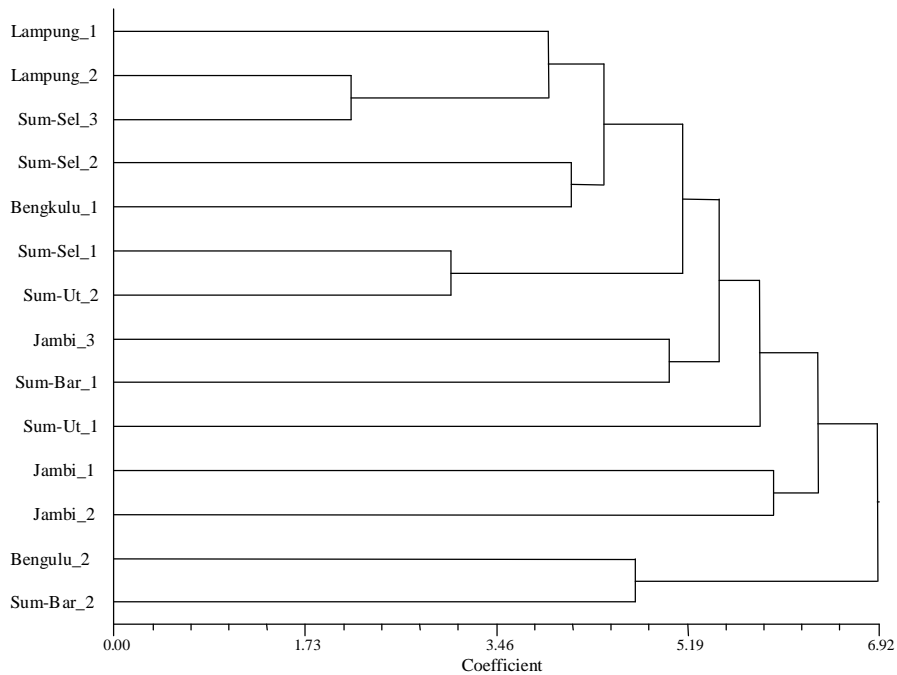


Gambar 2. Pola Pita DNA Total dari individu *Bemisia tabaci* dari populasi dengan Primer P1 (5'-d[GGTGC GGAA]-3')
 M: 100 bp ladder kolom 1: Lampung 1, kolom 2: Lampung 2, kolom 3 : Sumatera Selatan 1, kolom 4: Sumatera Selatan 2, kolom 5:Sumatera Selatan 3, kolom 6:Bengkulu 1, kolom 7:Bengkulu 2, kolom 8:Bengkulu 3, kolom 9: Jambi 1, kolom 10: Jambi 2, Kolom 11:Jambi 3, Kolom 12:Sumater Barat 1, Kolom 13: Sumatera Utara 1, Kolom 14: Sumatera 2.

Tabel 2. Jumlah dan ukuran band DNA *Bemisia tabaci* berdasarkan asal kutu kebul

| Besar band DNA | Asal Imago Kutu Kebul | | | | | | | | | | |
|----------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|---------|---------|----------------|----------------|
| | Lampung | Sum Sel-1 | Sum Sel-2 | Sum Sel-3 | Bengkulu-1 | Bengkulu-2 | Bengkulu-3 | Jambi-1 | Jambi-2 | Sumatera Barat | Sumatera Utara |
| 250 | | | | | | * | | | | | |
| 300 | | | | | | | * | | | | * |
| 350 | | | * | | | | * | * | | | * |
| 400 | * | | * | * | * | | * | | | * | * |
| 450 | * | * | * | * | * | | * | | | | * |
| 500 | | | * | | * | * | | | | * | * |
| 550 | | | | | * | | | | | | |
| 600 | | | * | * | * | | * | * | * | | * |
| 650 | * | * | * | * | * | | | * | | | |
| 700 | * | | | | * | | * | * | * | * | * |
| 750 | | | | | | | | * | | | |
| 800 | * | | * | * | * | | * | * | * | * | * |
| 850 | * | | | | | | | * | | | |
| 900 | | | | | | * | * | * | * | * | |
| 950 | | | | | | | | | | | |
| 1000 | * | | | | * | | * | | | * | |
| 1050 | | | | | | | | | | | |
| 1100 | * | | | | | * | * | | | * | |
| 1150 | | | | | | | | | | | |
| 1200 | | | | | | | | | | * | |
| Jumlah pita | 8 | 2 | 7 | 5 | 9 | 4 | 10 | 2 | 7 | 8 | 8 |

*) menunjukkan runutan besarnya ukuran band DNA *Bemisia tabaci* pada gel elektrophoresis.



Gambar 3. Dendrogram hasil PCR-RAPD kutu kebul asal Sumatera.

SANWANCANA

Penelitian ini didanai oleh Ditjen Dikti Depdiknas tahun 2004-2005 melalui program Hibah Pekerti (Universitas Lampung dan Institut Pertanian Bogor). Atas dukungan tersebut diucapkan terima kasih. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Dr. Srihendrastuti Hidayat dan Dr. Purnama Hidayat sebagai peneliti mitra atas bantuan dan kerjasamanya dan Ir. Noor Aidawati, M.Si (Mahasiswa S3) atas bantuan dan bimbingan teknis selama melakukan analisis PCR-RAPD di Laboratorium Virologi IPB.

DAFTAR PUSTAKA

Bedford ID, Briddon RW, Brown JK, Rosell RC, & Markham PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geographic regions. *Annals Applied Biology* 125: 311-325.

Brown JK, Coats S, & Bedford ID. 1995. Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aletrodidae). *Biochemical Genetics* 33: 205-214.

Brown JK, Costa HS, & Laemmlen F. 1992. First report of whitefly-associated squash silverleaf disorder of *Cucurbita* in Arizona and of white streaking disorder of *Brassica* species in Arizona and California. *Plant Disease* 76:426.

Castillo, J.N., S.S. Campos, & J.A. Diaz. 1998. Tomato yellow leaf curl virus causes a novel disease of common bean and severe epidemic in tomato in Spain. *Plt. Dis.* 83:1:29-32.

Cervera MT, Cabezas JA, & Simon B. 2000. Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera:Aleyrodidae) based on AFLP analysis. *Bulletin of Entomological Research* 9:391-396.

- Costa HS, Brown JK, Sivasupramanian S, & Bird J. 1993. Regional distribution, insecticide resistance and reciprocal crosses between the 'A' and 'B' biotypes of *Bemisia tabaci*. *Insecticide Science and Applications* 14:127-138.
- Gawel N.J., & Bartlett A.C. 1993. Characterization of differences between whiteflies using RAPD-PCR. *Insect Molecular Biology* 2:33-38.
- Goodwin, P.H., B.G. Gue, C.R. Kuske & M.K. Sears. 1994. Amplification of plasmid DNA to detect pathogenic mycoplasma like organisme. *Ann. Appl. Biol.* 124:27-36.
- Martin J.H. 1987. An Identification guide to common whitefly pest species of the world (Homoptera:Aleyrodidae). *Trop. Pest. Manag.* 33(4);298-322.
- Mehta, P., J.A. Wyman, M.K. Nakhla, & D.P. Maxwell. 1994. Polymerase chain reaction detection of viruliferous *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) with two tomato of infecting geminiviruses. *J. Econ Entomol.* 87(5):1285-1291.
- Meilin, A. 1999. Keragaman Karakter Morfologi dan Genetik Populasi Parasitoid Telur, *Trichogramma spp.* dan *Trichogrammatidea spp.* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) dari daerah Geografis yang berbeda di Pulau Jawa. *Tesis*. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 66 Halaman.
- Nooraidawati, Yusriadi, & S. H. Hidayat. 2001. Kisaran inang geminivirus asal tanaman cabai dari Guntung Payung, Kalimantan Selatan. *Prosiding Kongres dan Seminar Nasional Perhimpunan Fitopaologi Indonesia XVI*, Bogor-Jawa Barat. p 347-350.
- Rusli, E.S., Sri H. Hidayat, R. Suseno, & B. Tjahjono. 1999. Geminivirus asal Cabai : Kisaran Inang dan Cara Penularan. *Bulletin HPT*.