*Hayati*, Juni 2003, hlm. 66-70
ISSN 0854-8587

Vol. 10, No. 2

# Deteksi Molekuler dan Uji Penularan Fitoplasma Asal Rumput Bermuda

## *Molecular Detection and Transmission Studies of Phytoplasma Originated from Bermuda Grass*

KIKIN H. MUTAQIN, RUSMILAH SUSENO*, BUDI TJAHJONO, PURNAMA HIDAYAT

*Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680*

Diterima 5 September 2002/Disetujui 27 Februari 2003

**Phytoplasmas, previously called as mycoplasma-like organism (MLO), are plant pathogenic prokaryotes of Mollicutes associated with diseases of several plants such as Bermuda grass white leaf disease. PCR technique employing phytoplasma specific P1/P7 primers revealed that phytoplasmas were associated with diseased Bermuda grass, showing white leaf symptom, from three locations in Bogor. Based on PCR-RFLP pattern using *Alu*1, *Rsa*1, and *Mse*1 restriction enzymes, the infected grasses from the three locations were infected by the same phytoplasmas. Transmission studies of the phytoplasma with four kinds of leafhoppers indicated that only two kinds of the leafhoppers Deltocephalinae: Stenometopiini were able to transmit the pathogen, while the other two were not. The two vectors were also positively detected to contain phytoplasmas after previously fed on diseased Bermuda grass by PCR technique.**

## PENDAHULUAN

Fitoplasma (sebelumnya disebut organisme mirip mikoplasma) adalah organisme prokariota tanpa dinding sel yang belum dapat dibiakkan pada media buatan. Fitoplasma berasosiasi dengan penyakit pada sekitar 300 spesies tumbuhan dari berbagai famili dan berpotensi sebagai patogen yang dapat menimbulkan kerugian (McCoy *et al.* 1989).

Salah satu penyakit yang disebabkan oleh fitoplasma ialah penyakit daun putih pada rumput Bermuda (*Cynodon dactylon* (L) Pers.) (Marcone *et al.* 1997). Penyakit pada rumput budi daya, misalnya pada rumput padang golf, taman, dan lapangan olahraga, dapat mengurangi mutu dan nilai estetikanya. Patogen daun putih ini diketahui juga menginfeksi rumput Bermuda liar (nama lokal "suket grinting" atau "kakawatan") sehingga dapat menjadi sumber inokulum penyakit yang dapat menyebar ke rumput budi daya. Serangga vektor mempunyai peranan penting dalam penularan fitoplasma di lapangan sehingga informasi mengenai vektor dan karakteristik penularannya perlu diketahui sebagai salah satu dasar dalam upaya pengendalian penyakit.

Teknik molekuler dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan dan mengarakterisasi fitoplasma dalam tanaman maupun dalam serangga vektornya. Teknik molekuler yang banyak digunakan untuk karakterisasi fitoplasma ialah *polymerase chain reaction* (PCR) dan teknik *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Schneider *et al.* 1995). Tujuan penelitian ini ialah (i) mendeteksi keberadaan fitoplasma pada rumput Bermuda yang bergejala daun putih dan pada wereng daun dengan teknik PCR, (ii) menentukan adanya perbedaan atau kesamaan fitoplasma yang menginfeksi rumput Bermuda bergejala daun putih berdasarkan data PCR-RFLP, dan (iii) menguji penularan fitoplasma pada rumput Bermuda dengan bantuan wereng daun.

*Penulis untuk korespondensi, Tel. +62-251-629364, Fax. +62-251-629362

## BAHAN DAN METODE

**Rumput Bermuda.** Rumput Bermuda sakit diperoleh dari 3 tempat bersemak di daerah Bogor, yaitu Bantarjati, lapangan sepakbola IPB Darmaga, dan Padang Golf Bukit Pelangi Ciawi. Rumput sakit dipelihara secara terpisah dari rumput sehat dalam pot berisi media tanah, kompos, dan pasir (2:1:1) yang disterilkan dengan autoklaf. Pupuk NPK diberikan sebanyak 0.3 g/pot pada saat tanam dan setiap periode dua bulan. Rumput dipangkas secara berkala jika telah terlalu panjang (± 20 cm keluar dari pot).

**Uji Penularan Fitoplasma dengan Serangga.** Contoh wereng daun ditangkap dengan jaring serangga dan dikumpulkan dari pertanaman rumput. Hasil tangkapan dipisahkan ke dalam empat jenis wereng (Gambar 1) berdasarkan bentuk, ukuran dan warna dari toraks, abdomen, dan sayap secara visual. Wereng ini digunakan dalam percobaan penularan fitoplasma. Keempat jenis wereng tersebut diidentifikasi oleh Dr. Sri Suharni Siwi (Balai Penelitian Tanaman Padi) yang mengamatinya secara mikroskopi dan kemudian mengonfirmasikannya kepada Dr. Fletcher (*Dircetor of the Collection MSW Agricultural Scientific Collections Unit Australia*).

Setiap jenis wereng dipelihara dan diperbanyak pada rumput Bermuda sehat yang ditumbuhkan dalam kurungan kedap serangga. Uji penularan fitoplasma dari rumput Bermuda sakit ke rumput Bermuda sehat dengan bantuan masing-

Leinonen J, Lehtimaki T, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Laippala P, Rantalaiho V, Wirta O, Pasternack A, Alho H. 1997. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 417:150-152.

Litwak KN, Cefalu WT, Wagner JD. 1998. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in Cynomolgus monkeys: changes in carbohydrate metabolism, skin glycation, and pancreatic islets. *Lab Anim Sci* 48:172-178.

Mates JM, Gomez CP, Castro IN. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603.

Matkovics B, Sasvari M, Kotorman M, Varga IS, Hai DQ, Varga C. 1997. Further prove on oxidative stress in alloxan diabetic rat tissues. *Acta Physiol Hung* 85:183-192.

Nilsson A, Pridz K, Rotveit T, Christiansen EN. 1987. Studies on the interrelated of microsomal omega-oxidation and peroxisomal beta-oxidation in rat liver with a partially hydrogenated fish oil diet. *Biochem Biophys Acta* 920:114-119.

O'Briend TD, Wagner JD, Litwak KN, Carlson CS, Cefalu WT, Jordan K, Johnson KH, Butler PC. 1996. Islet amyloid and islet amyloid polypeptide in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) an animal model of human non-insulin dependent diabetes mellitus. *Vet Pathol* 33:479-485.

Orellana M, Fuentes O, Rosenbluth H, Lara M, Valdes E. 1992. Modulatios of rats liver peroxisomal and microsomal fatty acids oxidation by star vation. *FEBS* 310:193-196.

Schuler P. 1990. Natural antioxidants exploited commercially. In: Hudson BJF (ed). *Food Antioxidants*. London: Elsevier Appl Sci. p 99-170.

Soeatmadji DW. 20 Maret 2001. Radikal bebas tubuh perberat komplikasi diabetes. *Kompas*.

Thomas H, Schladt L, Knehr M, Oesch F. 1989. Effect of diabetes and starvation on the activity of rat liver epoxide hydrolases, glutathione S-transferases and peroxisomal beta-oxidation. *Biochem Pharmacol* 38:4291-4297.

Touati D. 1992. Regulation and protective role of the microbial superoxide dismutases. In: Scandalios (ed). *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. p 231-261.

Wagner JD, Carlson CS, O'Brien TD, Anthony MS, Bullock BC, Cefalu WT. 1996. Diabetes mellitus and islet amyloidosis in cynomolgus monkeys. *Lab Anim Sci* 46:36-41.

Wresdiyati T, Makita T. 1998. Immunocytochemical localization of Cu,Zn-SOD (Cooper, zinc-superoxide dismutase) in the renal tubules and glomerulus of rat kidney. *Mol Biol Cell* 8:342.

Zaar K. 1992. Structure and function of peroxisomes in the mammalian kidney. *Eur J Cell Biol* 59:233-254.

masing jenis wereng (sebanyak 1, 3, atau 5 ekor per tanaman) dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: periode makan akuisisi fitoplasma (pada rumput Bermuda sakit) selama 2 hari; periode laten (pada rumput Bermuda sehat) selama 7, 10, 13, 16, 19, 22 hari; dan periode makan inokulasi (pada rumput Bermuda sehat) selama 3 hari. Rumput yang telah diinokulasi dibebaskan dari wereng dan diamati gejala serta masa inkubasinya. Wereng yang telah digunakan untuk periode inokulasi selama 3 hari dari suatu perlakuan periode laten (misalnya n hari) digunakan kembali untuk inokulasi pada perlakuan periode laten selanjutnya (n + 3 hari), demikian berturut-turut secara berseri sampai pada perlakuan periode laten 22 hari (akhir hidup wereng). Dalam uji penularan ini digunakan wereng imago, tanpa memperhatikan jantan atau betina. Uji penularan untuk setiap perlakuan dilakukan dengan 2-5 ulangan (tergantung ketersediaan serangga).

**Ekstraksi DNA dari Tanaman.** Rumput Bermuda sakit dari Bantarjati, Darmaga, dan Ciawi yang diduga terinfeksi fitoplasma dikumpulkan dan selanjutnya setiap contoh rumput dari tiga lokasi tersebut diekstraksi DNA totalnya. Ekstraksi DNA rumput dilakukan mengikuti metode Dellaporta *et al.* (1983) serta Gibb dan Padovan (1994). Tulang daun muda (1.5-2 g) dipotong-potong halus dan direndam selama 15 menit dalam 6 ml bufer ekstraksi ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 47.5 mM, $KH_2PO_4$ 15 mM, sukrosa 5%, PVP-10 1%, asam askorbat 100 mM, BSA fr.V 0.15%). Jaringan daun ditambah 7 ml bufer ekstraksi, digerus dan selanjutnya disentrifugasi (Tomy Max-151, Rotor TMA 11) dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Supernatan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12 000 rpm selama 25 menit pada suhu 4°C. Endapan diresuspensi dengan 1 ml bufer CTAB (*cetyl trimetyl ammoniumbromide* 2%, NaCl 1.4 M, Tris 100 mM, EDTA 20 mM, PVP-40 1%, 2-merkaptoetanol 0.2%, pH 8). Suspensi tersebut diinkubasi pada suhu 60°C selama 30 menit, lalu ditambah 1 ml kloroform:isoamil-alkohol (24:1) dan campuran tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 13 000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan DNA dipresipitasi dengan isopropanol bersuhu -20°C. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 13 000 rpm selama 5 menit. Endapan DNA dicuci dua kali dengan 200 $\mu$l etanol 70% bersuhu -20°C dan disentrifugasi dengan kecepatan 13 000 rpm selama 2 menit. Selanjutnya etanol dibuang, endapan DNA dikeringkan dengan pompa vakum dan diresuspensikan dengan 50 $\mu$l akuades steril.

Ekstraksi DNA total dari rumput hasil uji penularan dilakukan terhadap contoh komposit yang melibatkan semua ulangan dari setiap perlakuan dengan metode yang dikembangkan oleh Dr. Karen Gibb (*Northern Territory University, Australia*) (komunikasi pribadi). Sebanyak 3-5 tulang daun digerus menggunakan mikropistil dalam tabung Eppendorf yang berisi 0.75-1.00 ml bufer CTAB. Suspensi diinkubasikan pada suhu 60°C selama 30 menit. Selanjutnya suspensi ditambah dengan kloroform:isoamil-alkohol (24:1) dalam volume yang setara dan disentrifugasi pada kecepatan 12 500 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan DNA dipresipitasikan dengan 1 ml isopropanol bersuhu -20°C. Campuran disentrifugasi pada kecepatan 12 500 rpm selama 5 menit. Endapan dicuci dua kali dengan etanol 70% bersuhu -20°C melalui sentrifugasi pada kecepatan 12 500 rpm selama 4 menit. Endapan DNA dikeringkan dengan pompa vakum, kemudian diresuspensi dengan 50 $\mu$l akuades steril.

**Ekstraksi DNA dari Wereng Daun.** Sejumlah wereng daun dari masing-masing jenis dibiarkan melalui priode makan akuisisi pada rumput sakit selama 2 hari dan periode laten pada tanaman sehat selama 7 hari. Selanjutnya sebanyak 5-10 wereng daun dari setiap jenis diisolasi DNA totalnya. Ekstraksi DNA total dari wereng daun dilakukan mengikuti metode Goodwin *et al.* (1994). Setiap wereng digerus dengan mikropistil dalam tabung Eppendorf yang berisi 125 $\mu$l bufer CTAB. Hasil gerusan divorteks dan diinkubasikan pada suhu 65°C selama 5 menit. Ke dalam suspensi ditambahkan kloroform:isoamil-alkohol (24:1) dengan volume yang setara dan diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 800 rpm selama 5 menit dan diambil sebanyak 90 $\mu$l supernatan yang diperoleh. DNA dipresipitasi dengan menambahkan 10 $\mu$l natrium asetat 5 M (pH 5.2) dan 250 $\mu$l etanol absolut bersuhu -20°C ke dalam supernatan. Suspensi diinkubasikan di dalam *freezer* selama 30 menit dan disentrifugasi pada kecepatan 11 500 rpm selama 15 menit. Endapan DNA dicuci dua kali dengan 200 $\mu$l etanol 70% bersuhu -20°C dan disentrifugasi pada kecepatan 11 500 rpm selama 2 menit. Etanol dibuang dan endapan DNA dikeringkan dengan pompa vakum dan diresuspensi dalam 10 $\mu$l akuades steril.

Sebagai pembanding (kontrol positif) DNA total dari rumput Bermuda bergejala daun putih dan wereng daun *Orosius argentatus* (Evans) yang telah diberi perlakuan makan akuisisi selama 2 hari pada kacang tanah bergejala penyakit sapu (terserang fitoplasma) serta priode laten selama 7 hari, diekstraksi mengikuti metode yang sama (Goodwin *et al.* 1994). Wereng daun *O. argentatus* adalah vektor fitoplasma penyebab penyakit sapu pada kacang tanah (Triharso 1975).

**Amplifikasi DNA dengan PCR.** DNA hasil ekstraksi, baik dari tanaman maupun dari wereng daun, diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer P1 (5'-AAGAGTTT GATCCTGGCTCAGGATT-3') dan P7 (5'-CGTCCTT CATCGGCTCCT-3'), yang akan mengamplifikasi keseluruhan gen 16S dan 16/23S RNA *spacer region* dari genom fitoplasma dengan ukuran produk amplifikasi sebesar 1800 pb (Schneider *et al.* 1995). Komposisi bahan yang digunakan dalam setiap reaksi PCR (50 $\mu$l/pereaksi) terdiri atas 30 $\mu$l akuades steril, 5 $\mu$l bufer PCR Ix ($MgCl_2$ 1.5 mM), 0.5 U polimerase *Taq*, dNTPs 0.1 mM, primer P1 0.4 $\mu$M, dan primer P7 0.4 $\mu$M. Selanjutnya 2-3 $\mu$l contoh templat DNA ditambahkan ke bahan tersebut di dalam tabung mikro. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan *thermal cyler* (Corbett FTS-320) dengan kondisi PCR: (i) pemanasan awal 92°C/1.0 menit, (ii) denaturasi DNA 95°C/1.0 menit, (iii) *annealing* 55°C/1.0 menit, (iv) sintesis DNA 72°C/1.5 menit. Tahap i-iv dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil amplifikasi dipertahankan pada suhu 4°C setelah siklus selesai. Sebagai kontrol negatif 2 $\mu$l akuades steril ditambahkan ke bahan yang digunakan untuk uji PCR dan uji ini menggunakan siklus amplifikasi yang telah disebutkan di atas. Kemudian DNA hasil amplifikasi dengan PCR dielektroforesis dalam gel agarosa 1% dan diwarnai dengan etidium bromida untuk melihat pita DNAnya di atas transiluminator ultraviolet (UV).

**Pembandingan Fitoplasma dengan Teknik PCR-RFLP.** Pembandingan fitoplasma yang ada dalam rumput Bermuda sakit dari 3 lokasi di Bogor dilakukan dengan memotong masing-masing DNA hasil amplifikasi dengan PCR menggunakan enzim restriksi *Alu*I, *Rsa*I, dan *Mse*I (New England Biolabs ®) pada suhu 37°C selama 2 jam (Schneider *et al.* 1995). Selanjutnya produk pemotongan (PCR-RFLP) dielektroforesis dalam gel agarose 2% dan diwarnai dengan etidium bromida. Fragmen hasil pemotongan diamati pada *transiluminator* UV. Profil hasil pemotongan dari ketiga contoh DNA dibandingkan satu sama lain.

## HASIL

**Deteksi Fitoplasma pada Tanaman Sakit.** Rumput Bermuda yang berasal dari 3 lokasi di Bogor masing-masing menunjukkan gejala penyakit daun putih yang berwarna kuning sampai putih, terutama dimulai dari daun muda atau pucuk (Gambar 2). Daun lebih kecil, sempit, dan cepat mengering. Ruas batang atau cabang tampak lebih pendek sehingga penampakan tanaman menjadi kerdil.

Pengujian dengan teknik PCR menggunakan primer P1/P7 terhadap DNA total rumput sakit dari ketiga lokasi tersebut memberikan hasil positif (Tabel 1), yaitu teramplifikasinya DNA fitoplasma dengan ukuran 1800 pb (Gambar 3). Pengujian terhadap DNA total rumput bermuda sehat dengan teknik PCR memberikan hasil negatif.

Tabel 1. Hasil uji rumput Bermuda (RB) sakit dengan gejala daun putih dari Bogor yang diduga terinfeksi fitoplasma menggunakan teknik PCR

| Lokasi asal | Kode | Uji PCR |
|---|---|---|
| Bantarjati-Bogor | RB-1 | + |
| Darmaga-Bogor | RB-2 | + |
| Ciawi-Bogor | RB-3 | + |

Uji PCR-RFLP dengan masing-masing enzim restriksi (*Alu*I, *Rsa*I, atau *Mse*I) untuk contoh DNA total tanaman sakit dari tiga lokasi memberikan pola restriksi yang sama (Gambar 3).

**Deteksi Fitoplasma pada Wereng Daun.** Dari beberapa jenis wereng di pertanaman rumput Bermuda, empat jenis wereng daun dipilih untuk uji penularan fitoplasma karena jumlah dan frekuensi ditemukannya cukup tinggi. Dua jenis wereng daun tersebut termasuk ke dalam Deltocephalinae: *Stenometopiini* (Gambar 1a dan 1b), Deltocephalinae: *Athysanini* (Gambar 1c), dan wereng daun Deltocephalinae: *Macrostelini* (Gambar 1d). Berdasarkan pengamatan di lapangan diketahui bahwa populasi wereng *Stenometopiini* di pertanaman rumput lebih banyak daripada *Athysanini* dan *Macrostelini.* Selain itu wereng daun *Stenometopiini* dapat bertahan hidup lama dan dapat berkembangbiak dengan baik dalam pemeliharaan pada rumput Bermuda, sedangkan lainnya tidak.

Pengujian dengan teknik PCR menggunakan primer P1/P7 dan templat DNA total dari empat jenis wereng daun yang diduga membawa fitoplasma setelah melalui periode akuisisi pada rumput sakit, memberikan hasil positif untuk wereng *Stenometopiini* dan negatif untuk dua jenis wereng yang lain. Dari masing-masing 10 wereng daun yang diuji, 3 contoh *Stenometopiini* a dan 2 *Stenometopiini* b memberikan hasil positif (+) untuk deteksi DNA fitoplasma dengan PCR (Gambar 4). Hasil positif tersebut sama dengan hasil pada deteksi DNA total dari rumput Bermuda bergejala daun putih dan dari wereng daun *O. argentatus,* vektor fitoplasma penyakit sapu kacang tanah, yang digunakan sebagai pembanding.

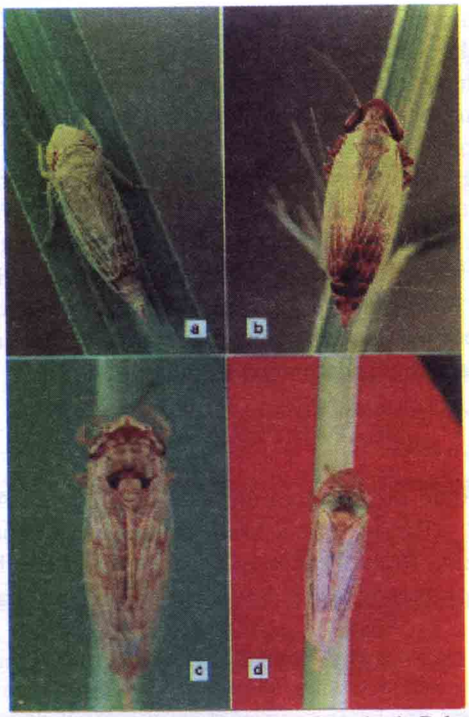
**Uji Penularan Fitoplasma dengan Bantuan Wereng Daun.** Rumput hasil inokulasi dengan bantuan wereng daun *Athysanini* dan *Macrostelini* tidak menunjukkan gejala sampai akhir pengamatan (26 minggu setelah inokulasi). Deteksi fitoplasma dengan PCR menggunakan DNA total dari rumput tersebut juga memberikan hasil negatif. *Stenometopiini* a dan b mampu menularkan fitoplasma dari rumput Bermuda sakit ke rumput sehat (Tabel 2). Gejala pada tanaman hasil

Tabel 2. Hasil penularan fitoplasma rumput Bermuda menggunakan wereng daun *Stenometopiini* a dan b serta uji PCR terhadap contoh komposit tanaman

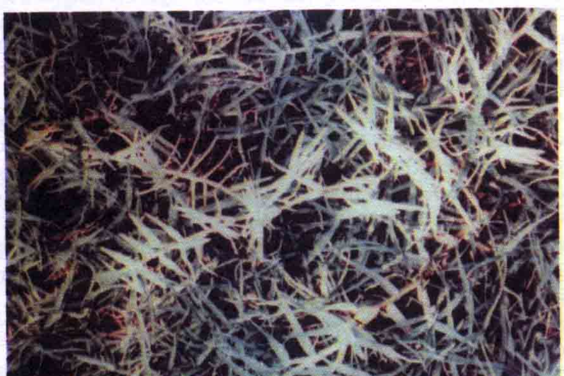
| Periode laten (hari) | Hasil pengujian dengan jumlah serangga | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | kontrol | | | 1 | | | 3 | | | 5 | | |
| | TG | MI | PCR | TG | MI | PCR | TG | MI | PCR | TG | MI | PCR |
| *Stenometopiini* a | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0/3 | - | - | 1/5 | 21 | - | 1/5 | 20 | - | 0/5 | - | - |
| 10 | 0/3 | - | - | 2/5 | 22-24 | + | 1/5 | 23 | + | 1/5 | 22 | - |
| 13 | 0/3 | - | - | 0/5 | - | - | 0/4 | - | - | 2/4 | 22-24 | + |
| 16 | 0/3 | - | - | 0/5 | - | - | 0/3 | - | - | 0/3 | - | - |
| 19 | 0/3 | - | - | 0/4 | - | - | 1/3 | 22 | - | 1/2 | 22 | - |
| 22 | 0/3 | - | - | 2/4 | 20-23 | + | 0/2 | - | - | 1/2 | 19 | + |
| *Stenometopiini* b | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0/3 | - | - | 2/5 | 19-22 | - | 1/5 | 19 | + | 1/4 | 23 | - |
| 10 | 0/3 | - | - | 1/5 | 22 | - | 1/3 | 21 | - | 0/3 | - | - |
| 13 | 0/3 | - | - | 1/4 | 22 | - | 1/3 | 20 | - | 0/2 | - | - |
| 16 | 0/3 | - | - | 1/3 | 19 | + | 0/2 | - | - | 1/2 | 21 | + |
| 19 | 0/3 | - | - | 2/3 | 21 | - | 0/2 | - | - | 1/2 | 19 | - |
| 22 | 0/3 | - | - | 0/2 | - | - | 1/2 | 21 | + | 0/2 | - | - |

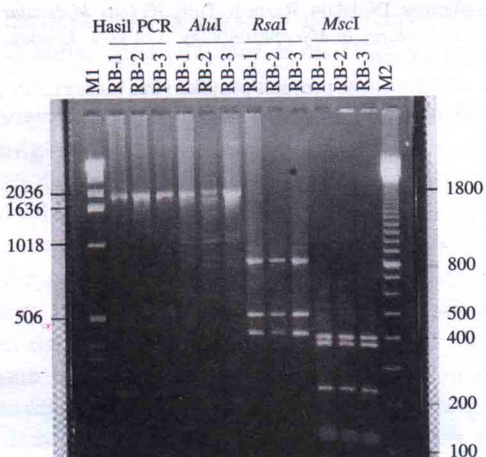
TG: Tanaman bergejala (jumlah tanaman bergejala/jumlah ulangan), MI: Masa inkubasi gejala (x 7 hari), PCR: Hasil uji PCR (+ = DNA fitoplasma positif teramplifikasi, -: DNA fitoplasma tidak teramplifikasi) penularan menggunakan kedua wereng tersebut tidak berbeda (Gambar 5), serta identik dengan gejala rumput sakit sumber inokulum (Gambar 6).

Deteksi fitoplasma dalam rumput Bermuda hasil penularan dengan teknik PCR menggunakan templat DNA total tanaman yang tidak bergejala memberikan hasil yang negatif sedangkan untuk tanaman yang bergejala memberikan hasil yang positif (Gambar 7).

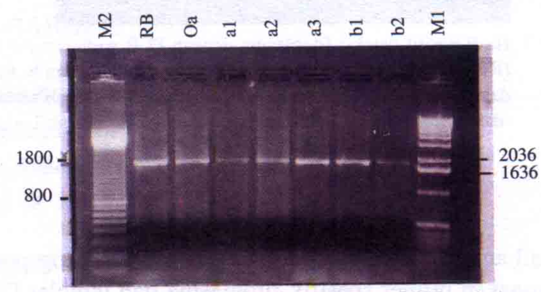


Gambar 1. Wereng daun pada rumput Bermuda: a dan b. Deltocephalinae: *Stenometopiini*, c. Deltocephalinae: *Athysanini*, dan d. Deltocephalinae: *Macrostelini*.


Gambar 2. Gejala penyakit daun putih pada rumput Bermuda di lapangan.



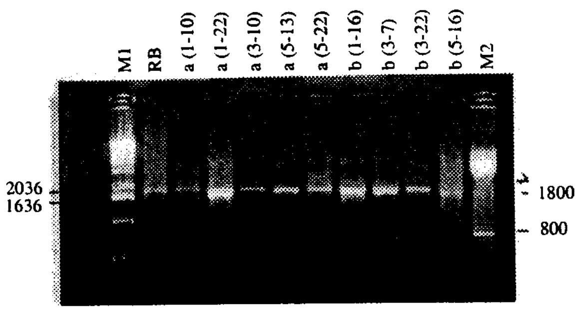
Gambar 3. Hasil positif deteksi fitoplasma dengan PCR pada rumput Bermuda sakit (RB) dari tiga lokasi di Bogor (RB: Bantarjati, RB2: Darmaga, RB3: Ciawi) dan pola PCR-RFLP DNA dengan tiga enzim restriksi (*Alu*I, *Rsa*I, dan *Mse*I), M1: 1 kb ladder dan M2: 100 pb ladder.



Gambar 4. Hasil positif deteksi fitoplasma dengan PCR pada rumput Bermuda sakit (RB), wereng daun *Orosius argentatus* (Oa) (sebagai pembanding atau kontrol positif), *Stenometopiini* a (a1-a3) dan b (b1-b2). M1: 1 kb ladder dan M2: 100 pb ladder.


Gambar 5. Gejala penyakit daun putih rumput Bermuda hasil penularan dengan *Stenometopiini* a atau b.


Gambar 6. Rumput Bermuda sakit sumber inokulum fitoplasma.




Gambar 7. Hasil positif deteksi fitoplasma dengan PCR pada rumput sakit (RB) dan hasil penularan dengan *Stenometopiini* a dan b. Angka dalam tanda kurung menunjukkan perlakuan (jumlah serangga -dan periode laten). M1: i kb Ladder dan M2: 100 pb Ladder.

## PEMBAHASAN

Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR yang positif menggunakan primer spesifik fitoplasma dan templat DNA tanaman sakit mengindikasikan rumput Bermuda dari 3 lokasi di Bogor yang bergejala daun putih terinfeksi oleh fitoplasma. Hasil uji PCR-RFLP untuk ketiga contoh DNA fitoplasma tersebut memberikan pola restriksi yang sama. Hal ini mengindikasikan bahwa ketiganya merupakan galur yang sama.

Dua *tribe* wereng (*Stenometopiini*) yang digunakan untuk uji penularan dapat menularkan fitoplasma dari rumput Bermuda bergejala daun putih ke rumput sehat, sedangkan wereng yang lain (*Athysanini* dan *Macrostelini*) tidak dapat. Hasil deteksi PCR yang positif dari templat DNA total wereng daun memperkuat dugaan bahwa kedua jenis wereng tersebut dapat menjadi vektor fitoplasma penyebab penyakit daun putih rumput Bermuda. Kesamaan hasil PCR yang positif dari templat DNA total kedua wereng tersebut dengan hasil PCR *O. argentatus*, merupakan vektor fitoplasma penyebab penyakit sapu pada kacang tanah, lebih memperkuat kebenaran dugaan tersebut. Masa inkubasi gejala daun putih pada rumput Bermuda berkisar antara 19-24 minggu (Tabel 2). Hal ini akan dapat menjadi kendala dalam pemilihan bahan tanaman sehat untuk pertanaman, karena rumput yang telah terinfeksi masih lama terlihat sehat. Oleh sebab itu, rumput tersebut dapat terbawa ke tempat baru atau dapat menyebarluaskan penyakit. Beberapa tanaman yang menunjukkan gejala tidak semuanya memberikan hasil positif pada uji PCR. Hal ini mungkin karena dalam daun yang bergejala tidak selalu mengandung fitoplasma, meskipun tanamannya terinfeksi, atau karena sebab lain yang belum diketahui. Kajian mengenai hasil ini perlu ditindak-lanjuti.

Hingga kini belum pernah dilaporkan bahwa fitoplasma dapat ditularkan melalui benih (biji). Oleh karenanya pemencaran fitoplasma penyebab penyakit daun putih ialah terutama melalui serangga vektor, selain melalui bahan tanaman. Pengendalian serangga vektor patogen daun putih akan dapat mengurangi gangguan yang disebabkan oleh penyakit tersebut pada rumput Bermuda.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini sebagian dibiayai oleh proyek ACIAR, P.N.9401. Ucapan terima kasih disampaikan kepada Sri Suharni Siwi (Balai Penelitian Tanaman Padi) atas bantuan identifikasi serangga yang digunakan dalam penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB. 1983. A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Mol Biol Rep* 1:19-21.

Gibb K, Padovan A. 1994. A DNA method that allows reliable PCR amplification of MLO DNA from difficult plant host species. *PCR Meth Appl* 4:56-58.

Goodwin PH, Gue BG, Kuske CR, Sears MK. 1994. Amplification of plasmid DNA to detect plant pathogenic mycoplasmalike organism. *Ann Appl Biol* 124:27-36.

Marcone C, Ragozzino A, Seemuller E. 1997. Detection of Bermuda grass white leaf disease in Italy and characterization of the associated phytoplasma by RFLP analysis. *Plant Disease* 81:862-866.

McCoy RE, Caudwell A, Chang CJ, Chen TA, Chiykowski LN, Cousin MT, Dale JL, de Leeuw GTN, Golino DA, Hackett KJ, Kirkpatrick BC, Marwitz R, Petzold H, Sinha RC, Sugiura M, Withcomb RF, Yang IL, Zhu BM, Seemuller E. 1989. Plant Diseases associated with mycoplasma-like organism. Di dalam: Withcomb RF, Tully JG (ed). *The Mycplasmas. Spiroplasmas, Acheloplasmas and Mycoplasmas of Plants and Arthropods*. New York: Academic Pr. hlm 545-640.

Schneider B, Seemuller E, Smart CD, Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organism or phytoplasmas. Di dalam: Razin S, Tully JG (ed). *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmology*. Vol ke-1. London: Academic Pr. hlm 369-380.

Triharso. 1975. Penelitian penyakit-penyakit virus kacang tanah. [Disertasi]. Yogyakarta: Yayasan Pembina Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada.