

CATATAN PENELITIAN

Deteksi *Banana Bunchy Top Virus* Menggunakan *Immuno Capture Polymerase Chain Reaction*

(*Detection of Banana Bunchy Top Virus Using Immuno Capture Polymerase Chain Reaction*)

RITA MEGIA^{1*} DAN CHRISTINE ANCEAU²

¹Jurusan Biologi FMIPA IPB, Jalan Raya Pajajaran, Bogor 16144

²Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agricultural Sciences, B-5030 Gembloux, Belgium

Diterima 25 Februari 1997/ Disetujui 19 Mei 1997

Detection of *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) was conducted for infected banana leaves diluted at concentration of 1, 5, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10000 and 100000 times using the immuno capture polymerase chain reaction (IC-PCR) method. Agdia BBTV polyclonal antibodies at the concentration of 100% and 50% recommended by the ELISA kit were used. Polymerase chain reaction analysis demonstrated the presence of DNA bands of approximately 1.1 kb which was in accordance with the reported size of BBTV DNA. The bands can still be traced in the infected leaf extract until the dilution of 10000 times (equal to 100 ng tissues). The used of 50% of antibody concentration for the serological assay showed the same results as those of 100%.

Banana bunchy top virus (BBTV) merupakan virus yang paling merugikan pada pisang (Dale 1994). Gejala pisang yang terinfeksi memperlihatkan daun klorosis, sempit, tangkai daun pendek dan tumbuh tegak sehingga memberikan kesan kerdil perkembangan pucuknya (*bunchy top*). Pohon dengan gejala tersebut sering kali tidak mampu menghasilkan buah.

Distribusi BBTV di dunia meliputi Australia, Asia Tenggara, Pasifik dan beberapa negara Afrika (Congo, Gabon, Burundi, Rwanda dan Afrika Tengah) (Dale 1994). Di Indonesia penyakit ini tersebar di Jawa Barat, Kalimantan Barat, Bali, dan Irian Jaya.

Keberadaan virus pada tanaman dapat dideteksi dengan uji serologi antara lain mempergunakan teknik *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Dasar metode ini ialah pengikatan protein virus oleh antibodi berlabel yang hasilnya kemudian diukur pada kerapatan optik tertentu (A_{405nm}). Berbagai kit ELISA yang praktis pemakaiannya telah dipasarkan. Keuntungan utama metode ini terletak pada sifatnya yang sederhana dan hasilnya yang dapat diketahui dalam waktu relatif singkat. Walaupun kepekaan teknik ini cukup memadai, namun kadang-kadang pada keadaan tertentu diperlukan asai dengan tingkat kepekaan yang lebih tinggi.

Kemajuan biologi molekuler juga telah dimanfaatkan untuk diagnosis patogen tumbuhan, antara lain *polymerase chain reaction* (PCR) diketahui sangat berguna untuk melipatgandakan *deoxyribonucleic acid* (DNA) yang hasil amplifikasinya kemudian dapat dideteksi dengan elektroforesis. Teknik *Immuno Capture-PCR* (IC-PCR) merupakan gabungan sebagian dari teknik ELISA

dan PCR yang diharapkan dapat meningkatkan kepekaan deteksi virus. Sebagaimana diketahui salah satu masalah utama pengindeksan plasma nutfah pisang ialah konsentrasi BBTV yang rendah pada tanaman. Dengan metode IC-PCR ini, virus yang terperangkap mempergunakan antibodi pada teknik ELISA kemudian DNANYA dilipatgandakan dengan PCR.

Partikel BBTV berbentuk isodiametrik berukuran 18-20 nm dan DNANYA berupa utas tunggal yang terdiri atas beberapa (sedikitnya 6) lingkaran berukuran ± 1.1 kb serta telah diketahui pula memiliki sebuah protein salut (*coat protein*) sebesar 20 kb (Harding *et al.* 1991).

Untuk mengetahui kepekaan teknik IC-PCR bagi deteksi BBTV pada tanaman pisang yang terinfeksi dilakukan penelitian di laboratorium *Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences, Gembloux, Belgia*. Pisang yang terserang BBTV berasal dari Congo dan pisang sehat varietas yangambi digunakan sebagai kontrol. Setiap gram daun dihaluskan mempergunakan mortar, ditambah 10 ml larutan penyangga *general sample extraction buffer* (GSEB) Agdia yang dalam satu liter terdiri atas 1.3 g Na_2SO_4 , 20.0 g PVP MW 24-40.000, 0.2 g $NaHCO_3$, 2.0 g albumin, dan 20.0 g tween-20 (pH. 7.4). Hasil ekstraksi ini disentrifugasi selama tiga menit pada 2000 rpm lalu diambil supernatannya. Cairan kemudian diencerkan 1, 5, 50, 100, 500, 1000, 5000, 10 000, dan 100 000 kali dengan menambahkan larutan penyangga GSEB.

Penangkapan virus dikerjakan dengan melapisi bagian dalam ujung sejumlah tabung PCR dengan 100 μ l atau 50 μ l antibodi spesifik BBTV Agdia (berturut-turut 100% dan 50% dari jumlah yang direkomendasikan dalam kit) ditambah 50 μ l larutan penyangga pelapis. Larutan penyangga pelapis dalam satu liter terdiri atas 1.59 g $NaCO_3$ dan 2.93 g $NaCO_2$ (pH 9.6). Tabung diinkubasi selama

* Penulis untuk korespondensi

empat jam pada suhu 37°C, kemudian ujung tabung dibilas dengan 150 µl larutan penyangga pencuci sebanyak empat kali masing-masing selama dua menit. Larutan penyangga pencuci dalam satu liter terdiri atas 8.00 g NaCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 0.20 g KH₂PO₄, 0.20 KCl, dan 0.05 g tween-20 (pH 7.4). Contoh berupa ekstraksi daun yang telah diencerkan kemudian baru dimasukkan ke dalam tabung, masing-masing 100 µl per tabung. Tabung kembali diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C. Ujung tabung kemudian dicuci sebanyak empat kali masing-masing selama dua menit mempergunakan larutan penyangga pencuci dan DNA yang terperangkap pada ujung tabung siap digandakan.

Amplifikasi DNA dilakukan dengan menambahkan 41 µl air PCR, 5 µl larutan penyangga PCR, 1 µl d NTP, 1 µl primer A, dan 1 µl primer B yang masing-masing terdiri atas 30 nukleotida (A 5' GGAAGAAGCCTCTCAT-CTGCTTCAGAGAGC 3' dan B 5' CAGGCGCACACCT-TGAGAAACGAAAGGGAA 3' (Harding *et al.* 1993), 1 µl polimerasi penanda (Boehringer Code 127138), dan 50 µl minyak PCR, ke dalam masing-masing tabung di atas. Siklus PCR yang digunakan ialah 30 siklus pada suhu 55°C (Harding *et al.* 1991). Analisis elektroforesis dilakukan pada gel agarosa 1% dengan larutan penyangga TAE (0.04 M asam tris dan 0.002 M EDTA) dan penambahan etidium bromida pada 100 volt dan intensitas 40 mA selama 1.5 jam. Contoh sebanyak 8 µl dimasukkan ke dalam sumur dan penanda yang dipergunakan berasal dari Pharmacia Biotech 27-4001-01. Visualisasi hasil elektroforesis dilakukan dengan bantuan sinar ultra violet.

Hasil penampakan contoh perlakuan IC-PCR pada gel agarosa menunjukkan adanya sederetan pita pada posisi 1.1 kb yang berukuran sesuai dengan sifat-sifat DNA BBTv (Dietzgen & Thomas 1991, Harding *et al.* 1991). Pita-pita tersebut terlihat dengan jelas pada contoh tanaman terinfeksi dengan pengenceran 1-10⁴ kali. Sebaliknya, pada baris kontrol yang berupa contoh tanaman yang sehat atau tanpa contoh (hanya antibodi + pereaksi PCR) tidak tampak adanya pita tersebut.

Pengenceran sampai dengan 10⁴ kali identik dengan 100 ng daun. Dengan demikian asai ini menunjukkan tingkat kepekaan yang sangat tinggi dibandingkan dengan ELISA. Batas maksimum deteksi BBTv yang diperoleh dari metode terakhir ini bervariasi antara pengenceran contoh ekstrak 500-1000 kali, yang setara dengan 1-2 µg material daun (percobaan tidak dilaporkan).

Xie & Hu (1995) hanya berhasil mendeteksi BBTv dari 80 ng jaringan daun dengan mempergunakan virus yang telah dimurnikan memakai teknik PCR. Padahal seperti diketahui isolasi virus ini dan terlebih lagi pemurniannya merupakan pekerjaan yang sangat sulit dilakukan. Percobaan ini juga menunjukkan bahwa PCR cukup dilakukan pada DNA contoh ekstrak kasar yang terperangkap antibodi pada ujung tabung. Sehingga dengan demikian tahapan ekstraksi DNA yang panjang dan memakan biaya pada metode PCR biasa tidak diperlukan.

Penggunaan antibodi yang diencerkan hingga separonya seperti yang direkomendasikan pada *kit* ELISA tidak

mengurangi kepekaan hasil yang diperoleh. Pada penggunaan antibodi 50%, pita-pita tetap terlihat sampai pada pengenceran eksplan 10⁴ kali. Mengingat mahalnya harga antibodi, selanjutnya penggunaan antibodi dapat dipertimbangkan separo saja dari dosis yang direkomendasikan.

Dalam era perdagangan bebas yang melibatkan pertukaran material antarnegara yang semakin meningkat, pengindeksan plasma nutfah tumbuhan merupakan salah satu aspek penting di dalam karantina. Dengan semakin tingginya kepekaan deteksi yang diperoleh menggunakan teknik IC-PCR ini dibandingkan dengan ELISA, usaha preventif untuk mencegah meluasnya penyebaran penyakit *bunchy top* dapat dilakukan dengan lebih efektif. Teknik ini selanjutnya juga dapat dikembangkan untuk mendeteksi patogen selain virus yang sering dijumpai pada konsentrasi yang sangat rendah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh *Belgian Administration for Development Co-operation*. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. P. Lepoivre, Kepala *Plant Pathology Laboratory, Faculty of Agricultural Sciences, Gembloux, Belgia*, atas segala bantuan yang diberikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Dale, J.L. 1994. Banana bunchy top, hlm. 17-18. Di dalam R.C. Ploetz, G.A. Zentmyer, M.T. Nishijima, K.G. Rohrbach & H.D. Ohr (ed.), *Compendium of Tropical Fruit Diseases*, St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Dietzgen, R.G. & J.E. Thomas. 1991. Properties of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Hawaii, Indonesia and Tonga. *Australasian Plant Pathol.* 20: 161-164.
- Harding, R.M., T.M. Burns, G. Hafner, R.G. Dietzgen & J.L. Dale. 1993. Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J. Gen. Virol.* 74: 323-328.
- Harding, R.M., T.M. Burns & J.L. Dale. 1991. Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small simple-stranded DNA. *J. Gen. Virol.* 72: 225-230.
- Lepoivre, P., J. Kummert, D. Colinet, O. Duterme & C. Anceau. 1994. Techniques moléculaires de détection et d'identification des agents phytopathogènes. 1994. *Cahiers Agric.* 3: 217-225.
- Thomas, J.E. & R.G. Dietzgen. 1991. Purification, characterization and serological detection of virus-like particles associated with banana bunchy top disease in Australia. *J. Gen. Virol.* 72: 217-224.
- Wu, R.Y. & H.J. Su. 1990. Purification and characterization of banana bunchy top virus. *Phytopathology* 128: 153-160.
- Xie, W.S. & J.S. Hu. 1995. Molecular cloning, sequence analysis, and detection of banana bunchy top virus in Hawaii. *Phytopathology* 85: 339-347.