

STUDI VARIASI POLA PITA PROTEIN WERENG HIJAU (*Nephotettix virescens*) DARI INDONESIA

Suwarno¹, Suranto², Sajidan³

^{1,2,3}Pendidikan Biologi FKIP UNS

ABSTRAK

Nephotettix virescens (wereng hijau) merupakan serangga vektor penyakit tungro pada tanaman padi. Spesies tersebut saat ini mendominasi populasi spesies wereng hijau di hampir seluruh pertanaman padi yang ada di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk: Untuk menguji adanya variasi pola pita protein *N.virescens* dari beberapa daerah di Indonesia. Penelitian dilaksanakan dua tahap yaitu: pengambilan sampel yang dilakukan di persemaian padi di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali dan Sulawesi Selatan, dan analisis pola pita protein dilaksanakan Laboratorium Mikrobiologi PAU UGM. Identifikasi profil pola pita protein dengan SDS-PAGE. Metode ekstraksi sampel menggunakan buffer mercapto ethanol, sedangkan ekstraksi sampel menggunakan buffer PBS IX. Pengecatan pita protein menggunakan *commasie blue*. Analisis data dengan cara deskriptif berdasarkan nilai migrasi (Rf). Identifikasi karakter profil pita protein dimunculkan dengan zimogram. Hasil Penelitian menunjukkan adanya variasi morfologi dari *N.virescens* yang berasal dari 5 daerah yang berbeda di Indonesia. Dari hasil pengamatan profil pola pita protein pada elektroforesis menunjukkan adanya variasi profil pola pita protein, pita protein pada BM (30, 80, 120, dan 150) kDa

Kata kunci : padi,wereng hijau, *Nephotettix virescens*, profil protein

PENDAHULUAN

Sebagai Negara agraris sangatlah penting untuk selalu memikirkan dan melakukan inovasi demi tercapainya swasembada pangan nasional. Untuk mencapai tujuan sebagai negara berswasembada pangan sangat banyak kendala yang harus dihadapi. Sebagai tanaman pangan utama di Indonesia, padi memiliki banyak hama dari jenis serangga salah satunya adalah wereng hijau (*Nephotettix virescens*) yang menjadi vektor penyakit tungro (Brar, *et al*, 2009). Tungro adalah salah satu jenis penyakit yang menyerang tanaman padi yang disebabkan oleh virus. Kerugian yang disebabkan oleh serangan sangat besar dan mampu mengancam tercapainya tujuan sebagai Negara berswasembada pangan.

Penyakit tungro disebabkan oleh RTV (*Rice Tungro Virus*) yang ditularkan oleh serangga wereng hijau, utamanya adalah *Nephotettix virescens* secara semi persiten. Di Indonesia, wereng hijau berperan penting sebagai vector dalam penularan penyakit tungro. Pada tanaman padi terdapat 4 jenis wereng yaitu wereng coklat (*Nilaparvata lugens* Stal.), wereng punggung putih (*Sogatella furcifera* Horvath), wereng hijau (*Nephotettix virescens*) dan wereng loreng (*Recilia dorsalis*). Dua jenis wereng yang disebut awal disebut wereng batang (*plant hopper*) sedangkan 2 jenis wereng yang terakhir disebut wereng daun (*leaf hopper*). Yang paling sering menimbulkan masalah pada tanaman padi adalah wereng hijau dan wereng coklat (Utoro, 2007).

Wereng hijau dan wereng loreng merupakan vektor utama virus penyebab penyakit tungro. Diantara spesies wereng hijau dan wereng loreng terdapat perbedaan efisiensi menularkan virus. Rentang efisiensi penularan virus oleh populasi *N. virescens* antara 35-83% (Rivera dan Ou, 1965), dibandingkan dengan *N.nigropictus* yang rentang efisiensinya antara 0-27% (Ling, 1979). Spesies wereng hijau lainnya seperti *N. Malayanus* dan *N. Parvus* memiliki kemampuan menularkan virus berturut-turut 40% (IRRI,1973) dan 7% (Rivera dan Ou,1965) lebih rendah daripada *N.virescens*.

Wereng hijau (*N. virescens*) sebagai vektor utama penyakit tungro menjadi masalah besar bagi para petani. Setiap tahunnya kerugian yang diakibatkan serangan hama ini menyebabkan kerugian yang amat besar. Hasil panen padi yang dihasilkan menurun secara signifikan hampir setiap tahun (Jena *et al* ,2008).

Penyakit tungro telah menyebar hampir di seluruh daerah produsen padi di Indonesia. Daerah endemis tungro di seluruh Indonesia telah dipetakan berdasarkan luas dan frekuensi serangannya menjadi 4 (empat) yaitu (1) daerah endemis, (2) sporadis, (3) potensial aman dan (4) aman.



Sebagai vektor perantara penyakit tungro yang paling efisien dalam penularannya, *N.virescens* dari tiap daerah endemis sangat dimungkinkan memiliki karakter yang berbeda dari tempat yang lain. Selain itu, sangat dimungkinkan spesies endemik dari satu daerah mampu menularkan tungro di daerah yang lain.

Berdasar latar belakang di atas maka peneliti akan mengangkat masalah tentang studi variasi populasi *N.virescens* dari beberapa daerah di Indonesia.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan dengan tahapan pengambilan sampel dari Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali dan Sulawesi Selatan. Pengambilan sampel dilakukan di daerah pembibitan padi pada waktu pagi dan sore hari. Untuk analisis profil pola pita protein di Laboratorium PAU UGM. Proses penelitian dilaksanakan pada bulan November 2009 sampai dengan Februari 2010. Prosedur penelitian meliputi proses pengambilan sampel *N.virescens* dari kelima daerah tersebut di atas kemudian dilakukan analisis profil pola pita protein dengan elektroforesis. Marker protein yang digunakan adalah marker *Unstained Protein Ladder* dengan kode SM0661 dengan berat molekul (BM) berkisar antara 10 – 200 kDa.

Analisa pola pita protein diperoleh dari hasil elektroforesis yang di analisis secara kualitatif yaitu muncul tidaknya pita pada gel, bila muncul diberi tanda (+) dan bila tidak diberi tanda (-) (Riesenberg, dkk, 1987 ; Suranto, 2002) dan metode kuantitatif berdasarkan tebal tipisnya pita yang terbentuk.

PEMBAHASAN

Analisis Profil Pola Pita Protein

Analisis protein pada penelitian ini dilakukan dengan memisahkan protein menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE 2 dimensi. Pemisahan ini dilakukan dengan tujuan untuk melihat apakah ada perbedaan pola pita protein dari *Nephotettix virescens* dari 5 daerah tersebut.

Marker protein yang digunakan adalah marker Unstained Protein Ladder dengan kode SM0661 dengan berat molekul (BM) berkisar antara 10 – 200 kDa. Hasil pemisahan protein dari sampel *N. virescens* dari kelima daerah tersebut menunjukkan adanya beberapa pita protein dengan berat molekul (BM) berkisar antara 10 – 200 kDa. Dengan penentuan BM tersebut maka dapat diketahui dan dikelompokkan berdasarkan pola pita protein dari *N. virescens* dari kelima daerah tersebut.

Menurut Suketi (1994) protein atau enzim dapat dipisahkan dengan menggunakan metode elektroforesis dan hasilnya berupa zimogram pola pita. Zimogram hasil elektroforesis bercorak khas sehingga dapat digunakan sebagai ciri fenotif untuk mencerminkan pembuka genetik. Pada elektroforesis gel yang digunakan adalah gel poliakrilamid. Presentase poliakrilamid dalam media elektroforesis yang sering digunakan adalah 7%, biasanya dalam buffer triglisin pada pH 8,1. Pada kasus-kasus tertentu perbandingan antara poliakrilamid dan pH bervariasi (Suranto,2002). Elektroforesis adalah suatu proses dimana molekul protein / enzim yang telah dialiri listrik bergerak melalui medan listrik (Na'im, 1996).

Hasil elektroforesis akan didapatkan pita-pita protein yang terpisahkan berdasarkan berat molekulnya. Tebal tipisnya pita yang terbentuk dari pita protein menunjukkan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul yang sama yang berada pada posisi pita yang sama. Hal ini sejalan dengan prinsip pergerakan molekul bermuatan, yakni molekul bermuatan dapat bergerak bebas di bawah pengaruh medan listrik, molekul dengan muatan dan ukuran yang sama akan terakumulasi pada zona atau pita yang sama atau berdekatan (Soedarmadji, 1996).

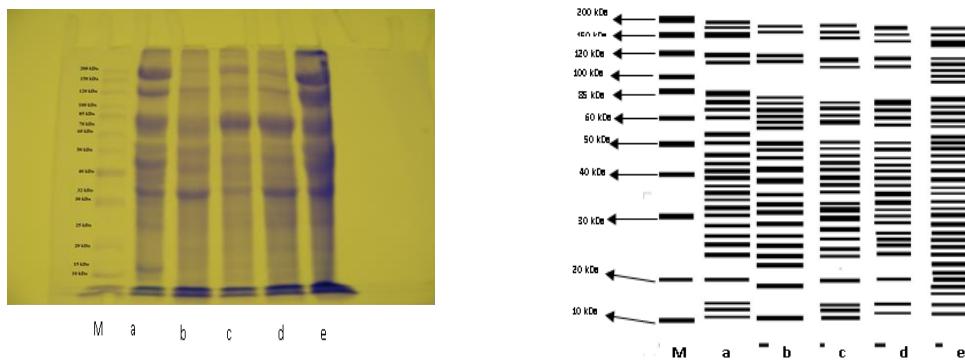
Pemisahan protein dengan metode elektroforesis bertujuan untuk melihat ada tidaknya perbedaan profil protein pada *N.virescens* yang berasal dari beberapa daerah di Indonesia. Hasil pengukuran dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) = 595 nm, menunjukkan kadar protein yang berbeda-beda seperti pada tabel berikut ini:



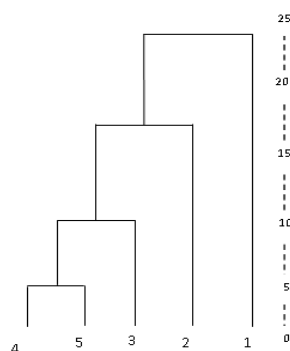
Asal daerah	Kadar Protein
Karawang (Jawa Barat)	45,92 µg
Ngawi (Jawa Timur)	42,86 µg
Klaten (Jawa Tengah)	36,08 µg
Tabanan (Bali)	41,57 µg
Maros (Sulawesi Selatan)	39,31 µg

Pengukuran kadar protein pada sampel digunakan untuk menentukan konsentrasi sampel yang diperlukan pada proses running dengan persamaan $Y = 0.465 X - 0.0157$, dimana Y adalah absorbansi (hasil bacaan OD dari spektrofotometer) dan X adalah konsentrasi sampel.

Hasil pengukuran kadar protein tersebut kemudian dilanjutkan dengan elektroforesis untuk mengetahui profil pola pita protein dengan menggunakan gel poliakrilamid pada *N. Virescens*. Hasil elektroforesis pada gel poliakrilamid dengan marker (M) dengan berat molekul (BM) protein standar antara 10 kDa – 200 kDa. Hasil analisis profil pola pita protein pada *N. Virescens* menunjukkan pada kisaran berat molekul tertentu menunjukkan ekspresi gen yang sangat tipis dan sangat tebal.



Gambar 1. Gel Pola pita protein *N.virescens* a l e t r o f o r e s i s
Ket; M: Marker, a : Sulawesi Selatan, b: Bali, c: Jawa Tengah, d: Jawa Timur, e: Jawa Barat



Gambar 2. Dendrogram hasil analisis pola pita protein *N.virescens*

Ket: 1. Sulawesi Selatan, 2. Bali; 3. Jawa Tengah; 4. Jawa Timur; 5. Jawa Barat

Hasil pengukuran pola pita protein pada elektroforesis (Gambar 10) lebih lanjut diproses menggunakan software *Paint Shop Pro 5* untuk memperoleh gambaran band-band protein secara lebih jelas, setelah itu band protein yang sudah diperoleh diproses dengan *Corel Draw 12* untuk mendapatkan data jarak migrasi sehingga nanti akan bisa dihitung besarnya berat molekul protein

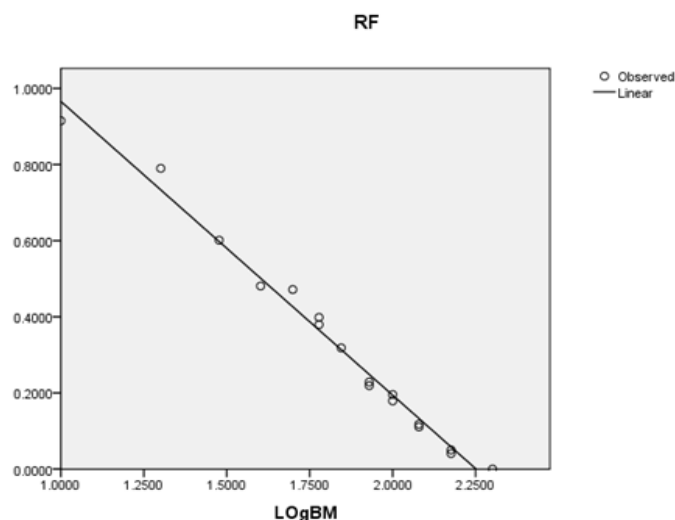
yang berada di luar marker sehingga diperoleh data sebaran pola pita protein seperti pada tabel 5 di atas.

Dari hasil analisis menunjukkan bahwa berdasarkan pola pita protein pada dendrogram (Gambar 12) tersebut membentuk 4 kelompok. *N.virescens* dari Jawa Timur (4) dan dari Jawa Barat (5) membentuk kelompok sendiri, begitu juga dengan yang berasal Jawa Tengah (3) , Bali (2) dan Sulawesi Selatan (1) membentuk kelompok sendiri.

Perbedaan ekspresi profil pola pita protein total yang muncul dapat memberikan gambaran sifat khas suatu ras, sehingga perbedaan yang muncul dapat menggambarkan karakteristik genetik yang merupakan ekspresi dari suatu karakter tertentu.

Profil pola pita protein pada spesies *Nephotettix virescens* dari 5 daerah sentra penghasil padi di Indonesia menunjukkan adanya perbedaan variasi ekspresi karakter yang muncul dilihat dari pola pita protein yang terekspresi. Profil pola pita protein yang terekspresikan dari spesies *N.virescens* adalah BM (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 120, 150, 200 dan > 200) kDa. Meskipun demikian ada beberapa perbedaan ekspresi pola pita protein yang muncul dari masing-masing spesies. Spesies *N. virescens* dari daerah Sulawesi Selatan memiliki keunikan ekspresi pola pita protein yaitu pada BM 60 dan 85 kDa. Pada profil protein dengan BM 60 tidak ditemukan atau terekspresi dengan baik namun bisa ditemukan dengan jelas pada keempat daerah yang lain, namun sebaliknya pada pola pita protein dengan BM 85 kDa dapat terekspresi dengan jelas sedangkan pada keempat daerah yang lain tidak. Untuk *N.virescens* yang berasal dari daerah Jawa Barat memiliki karakter khusus yang tidak dimiliki oleh spesies dari daerah lain yaitu pada BM 100 kDa, begitu juga spesies dari daerah Bali profil pola pita protein dengan BM 20 kDa tidak muncul atau terekspresi secara jelas namun dapat terekspresi dengan jelas pada keempat daerah yang lainnya. Profil pola pita protein dengan BM 40 hanya dapat diekspresikan dengan jelas pada spesies yang berasal dari daerah Sulawesi Selatan dan Jawa Tengah begitu juga pada BM 120 kDa yang hanya ditemukan pada spesies yang berasal dari Sulawesi Selatan dan Bali namun tidak ditemukan pada ketiga daerah yang lain. Untuk profil pola pita protein yang muncul diduga ada penambahan coat protein dari virus sehingga ekspresi pola pita protein yang muncul bervariasi dalam tingkat ketebalannya. Keragaman sifat morfologi dan pola pita protein total antara populasi spesies *N.virescens* tidak berhubungan dengan asal dari wilayah endemik dan non endemik. (Supriyadi, 2004)

Hasil zimogram dari profil pola pita protein *N.virescens* dari kelima daerah sentra penghasil padi tidak menunjukkan adanya perbedaan rentang variasi berat molekul apabila dilihat dari profil pola pita protein yang terdeteksi, perbedaan yang terlihat hanyalah tingkat ketebalan dari pita protein yang terdeteksi. Untuk menentukan profil protein yang terdeteksi di luar marker dan besarnya Rf dapat dihitung dan ditentukan dengan persamaan $Y = - 0,772X + 1,738$.



Grafik 1. Hubungan RF dan Log BM



Adanya korelasi antara jarak migrasi dengan berat molekul protein ditunjukkan dengan nilai koefisien R square sebesar 0.988. Ketebalan pita yang berbeda tidak menunjukkan adanya berat molekul protein yang berbeda tetapi jumlah protein yang termigrasi yang berbeda kandungan/kuantitas proteinnya (Supriyadi, 2006 dalam Krisnandari, 2008). Kisaran pola pita protein yang muncul pada spesies *N.virescens* dari kelima daerah yang berbeda tersebut adalah dengan BM (10 – 200 kDa).

KESIMPULAN

Dari hasil pengamatan profil pola pita protein pada elektroforesis menunjukkan adanya variasi profil pola pita protein, Pita protein dengan berat BM 20 kDa tidak ditemukan pada spesies dari Bali, BM 60 kDa tidak ditemukan pada spesies yang berasal dari Sulawesi Selatan namun dapat ditemukan pada keempat daerah yang lain. Pada pita dengan BM 100 kDa hanya ditemukan pada spesies yang berasal dari Jawa Barat namun tidak ada pada spesies dari keempat daerah yang lain. Pada pita protein dengan BM 40 hanya ditemukan pada spesies dari Sulawesi Selatan dan Jawa Tengah, 120 kDa hanya ditemukan pada spesies dari Sulawesi Selatan dan Bali tetapi tidak terekspresi dengan jelas pada spesies yang berasal dari ketiga daerah yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- Bagian Proyek Informasi Pertanian. 1996. *Tungro dan Pengendaliannya*. Departemen Pertanian Irian Jaya
- Brar. D.S, Virk.P.S, Jena K.K and Khush. 2009. *Breeding for Resistance to Planthoppers in Rice*. International Rice Research Institute. Los Banos.Phillipines
- Cordulo P.A, Mark Anthony, Torres. J and Demayo C.G. 2010. *Relative Warp Analysis of Head Shape Variations in Nephrotettix virescens (Distant) (Homoptera: Cicadellidae) Infesting Rice Types with Different Genes for Resistance*. *Egypt.Acad.J.Sci.* 3(1): 199 - 206
- Favali, M.A., S.Pellegrini, and M. Bassi. 1975. *Ultra Structural Alterations Induced by Tungro Virus in Rice Leaves*. *Virology* 66: 502-507.
- Fujita.D., Myint.K.K.M, Matsumura.M., and Yasui.H. 2009. *The genetics of host-plant resistance to rice planthopper and leafhopper*. Los Banos. Phillipines
- Hasanuddin.A., Koesnang. Dan D. Baco.1997. *Rice Tungro Virus Disease in Indonesia: Present Status and Current Management Strategy*. Dalam Cancellor TCB, Tresh JM 9eds). *Epidemiology and Management of Rice Tungro Diseases*. Chatam, UK. National Resource Institut
- Heinrichs.E.A. 1994. *Development of Multiple Pest Resistant Crop Cultivars*. *Journal Agriculture Entomology* 11(3): 225-253
- Hibino , H. And R.C. Cabunagan. 1986. *Rice Tungro Associated Viruses and Their Relation to Host Plants and Vector Leafhopper*. *Phytopatology* 19: 173 – 182
- Hibino,H. And R.C. Cabunagan. *Occurrence and Spread of Rice Tungro Spherical Virus in the Philippines*. *Plant Disease*. 70 (10)
- Hibino. H. M.Roechan, and S. Sudarisman. 1987. *Association of Two Types of Virus Particles with Penyakit Habang (Tungro Diseases) of Rice in Indonesia*. *Phytopatology* 68: 1.412 – 1.416
- Isara Srisaad. 2007. Thesis (*Effect of Some Plant Extracts on Toxicity and Activities of Esterase and Glutathionestransferase in the Greenleafhopper (Nephrotettix virescens (distant)*). Graduate School, Kasetsart University. Thailand
- Islam.Z., Catling.D., Hasan.M., Haque.S.S, Begum.M.A., and Haq.M. 2009. *Influence oh the Green Revolution on the Insect Pests of Rice*. *Outlook on Pest Management*. 37- 43
- Jena.K.K and Mackill.D.J. 2008. *Molecular Markers and Their Use in Marker-Assisted Selection in Rice*. *Crop Science Journal*. 46: 1266 – 1276
- Krishnaiah.N.V.,Lakshmi.V.J.,Pasaliu. I.C.,Katti.G.R.,Padmavathi.Ch. 2008. *Insecticides in Rice IPM Past, Present and Future*. Hyderabad.India
- Ling. K.C.1966. *Nonpersintence of the Tungro Virus of Rice in Its Leafhopper Vector, Nephrotettix impicticeps*. *Phytopatology* 56: 1.252-1.258



- Marmey.P., Mendoza. A.R., Kochko.A.d., Beachya.N.R.,and Fauquet.M.2005. *Characterization of the protease domain of Rice tungro bacilliform virus responsible for the processing of the capsid protein from the polyprotein. Virology Journal* 2: 33
- Muralidharan.K., Krishnaveni.D, Rajarajeswari. N.V.L and Prasad. 2003. *Tungro epidemics and yield losses in paddy fields in India. Current Science* . 85 (8)
- Nasruddin.A., 2011. *Field Efficacy of Selected Insecticides against Empoasca Terminalis (Homoptera: Cicadellidae) on Soybean. American Journal of Scientific Research* :115-121
- Pakki.S., 2010. *Peran Faktor Ekobiologi terhadap Dinamika Populasi Vektor dan Penyakit Tungro. Prosiding Seminar Ilmiah dan Pertemuan Tahunan PEJ dan PFJ XX Komisariat daerah Sulawesi Selatan. Makassar*
- Philippe Marmey, Ana Rojas-Mendoza and Alexandre de Kochko, Roger N Beachy and Claude M Fauquet. 2005. *Characterization of the protease domain of Rice tungro bacilliform virus responsible for the processing of the capsid protein from the polyprotein. Virology Journal*. 2: 33
- Rajendram. G.F. and Devanajah.R. 1990. *Survey of Some Rice Insect Pests and Their Predator in Three District in Sri Lanka. Journal National Science Sri Lanka* 18: 79 – 92
- Rivera,C.T, and S.H.Ou. 1985. *Leafhopper Transmission of Tungro Disease of Rice. Phytopatology* 49 : 127-131
- Rothe, G.M., 1994. *Electrophoresis of Enzymes*. Springer Verlag. New York.
- Sharma.M.K, Atsedewoin.A. and Fanta.S. 2011. *Forewarning models of the insects of paddy crop. International Journal of Biodiversity and Conservation* 3(8): 367-375
- Semangun. H. 2004. *Penyakit-Penyakit Tanaman Pangan di Indonesia*. Jogjakarta. Gajah Mada University Press
- Shibata.Y.,Cabunagan.R.C, Cabauatan.P.Q and Choi.I.R. 2007. *Characterization of Oryza rufipogon-Derived Resistance to Tungro Disease in Rice. Plant Disease* 91 (11): 1386 – 1391
- Pham Van Du, R.C. Cabunagan, P.Q. Cabauatan, H.S. Choi, I.R. Choi, Ho Van Chien and Nguyen Huu Huan.2007. *Yellowing Syndrome of Rice: Etiology, Current Status and Future Challenges. Omonrice* 15 : 94-101
- Sasaki Taeko. 2007. Thesis (*Identification and characterization of genes involved in the biogenesis of Small RNAs in rice, Oryza sativa L*).Departement of Plant Science. McGill University, Montreal
- Shing, Anjaneyulu and Lapiere. 1984. *Use of pectino-cellulolytic enzymes for improving extraction of phloem-limited plant viruses as exemplified by the rice tungro virus complex. Agronomie* 4: 479-484
- Siwi, SS, I.N. Widiarta, dan A. Hasanuddin. 1998. *Penelitian Koloni Nephotettix virescens (Distant) dan Virulensi Penularan Virus Tungro*. Laporan Hasil Penelitian Balitpa
- Sudarmadji, S., 1996. *Teknik Analisa Biokimiawi*. Edisi Pertama.Liberty. Yogyakarta
- Shukla V.D and Anjaneyulu. 1980. *Evaluation of Systemic Insecticides for Control of Rice Tungro. Plant Disease* 64 (8)
- Sumitro, S. B, Fatchiyah, Rahayu, Widyarti, dan Arumningtyas. 1996. *Kursus Teknik-Teknik Dasar Analisis Protein dan DNA*. Jurusan Biologi FMIPA Universitas Brawijaya. Malang
- Supriyadi. 2006. *Keanekaragaman Genetik Populasi Wereng Hijau, Nephotettix virescens Asal Wilayah Endemi dan Nonendemi Virus Tungro Padi*. Disertasi. Universitas Gajah Mada Yogyakarta
- Suzuki, Y.,Soeroto dan SS. Siwi. 1992. *Tungro dan Wereng Hijau. Laporan Akhir Kerjasama Teknis Indonesia Jepang Bidang Perlindungan Tanaman*. Direktorat Perlindungan Tanaman. Ditjen Pertanian Tanaman Pangan. Jakarta. 194 .
- Widiarta, I.N., D. Kusdianan, dan A. Hasanuddin. 2001. *Analisis Dinamika Populasi Wereng Hijau Nephotettix virescens Pada Padi Sawah di Musim Kemarau dan Musim Hujan. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 20: 11-16
- Widiarta, I.N., Kusdianan.D. 2007. *Penggunaan Jamur Entomopatogen Metarizhium anisopliae dan Beauveria bassiana untuk Mengendalikan Populasi Wereng Hijau. Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* 26 (1) : 46-54

