

KARAKTERISASI INDIVIDU WERENG HIJAU *NEPHOTETTIX VIRESCENS* DISTANT PENULAR AKTIF VIRUS TUNGRO PADI

Supriyadi¹ & Retno Wijayanti¹

ABSTRACT

Characterization of active transmitter among population of the leafhopper, Nephotettix virescens Distant in relation to the transmission of the rice tungro virus. The objective of this research was to identify the characteristics of *Nephotettix virescens* as the active transmitter of the rice tungro virus. The specimens of *N. virescens* active transmitter were determined by differing in their ability to transmit the tungro virus to healthy plants. These specimens were used as samples to identify their morphological and molecular characters. Five external morphological characters, namely length of head to abdomen, hind femur, head, fore wing, and length of stylet were measured to determine their character. The protein banding patterns of the active transmitter were identified by protein separating technique on SDS-Page. Based on the morphological characters, especially the length of head to abdomen, hind femur, head, fore wing, and length of stylet, it showed that *N. virescens* active transmitter and non transmitter were similar. There were no specific morphological characters for *N. virescens* active transmitter. However, *N. virescens* active transmitter showed different protein banding pattern. Three distinct protein bands, estimated as 173, 134, and 68 kDa were observed in the specimens of active transmitter. These three protein bands, were absent in the non transmitter.

Key words: *Nephotettix virescens*, active transmitter, morphological, protein banding pattern

PENDAHULUAN

Wereng hijau, *Nephotettix virescens* Distant adalah anggota Famili Cicadellidae, Ordo Hemiptera yang hidup di pertanaman padi. Peran penting *N. virescens* wilayah Asia Selatan dan Asia Tenggara, termasuk di Indonesia saat ini adalah sebagai vektor virus tungro padi (Muralidharan *et al.*, 2003; Widiarta, 2005). Di antara vektor virus tungro yang ada di Indonesia, *N. virescens* adalah vektor terpenting, karena paling efektif menularkan virus tungro dan populasinya dominan di antara vektor lain (Himawati & Supriyadi, 2003; Supriyadi *et al.*, 2004; Widiarta, 2005). Efektivitas *N. virescens* asal populasi wilayah endemi dalam menularkan virus tungro mencapai 81%, sedangkan asal wilayah nonendemi 52% (Supriyadi *et al.*, 2004; Supriyadi *et al.*, 2008).

Pada kasus-kasus penyakit virus terbawa serangga, antara vektor, virus, dan tanaman terbentuk pola hubungan spesifik (Fereses & Moreno, 2009). Sampai saat ini studi interaksi tanaman padi dengan vektor, *N. virescens* relatif sudah mendalam, seperti

pemetaan gen yang bertanggungjawab terhadap pewarisan sifat antibiosis tanaman tahan vektor (Wang *et al.*, 2004), identifikasi tanaman padi tahan vektor berdasar marka RAPD (Padmavathi *et al.*, 2007), dan analisis genetika tanaman padi tahan vektor (Angeles & Khush, 2008). Demikian pula, studi virus tungro juga sudah mendalam, seperti karakterisasi produk-produk gen-gen tertentu dalam genom virus tungro (Herzog *et al.*, 2000; Marmay *et al.*, 2005). Namun demikian, studi interaksi antara vektor *N. virescens* dengan virus tungro masih terbatas.

Menurut Hibino & Cabauatan (1987), proses penularan virus tungro oleh *N. virescens*, melibatkan senyawa kimia komponen pembantu (*helper component*) yang berperan mengikat partikel virus. Kemampuan *N. virescens*, dalam menularkan virus tungro bersifat individual, sehingga tidak semua anggota dalam populasi menjadi vektor kompeten (Gray & Banerjee, 1999). Menurut Ling (1972), di antara anggota populasi *N. virescens* terdapat kelompok individu penular aktif (*active transmitters*) dan individu bukan penular (*nontransmitters*). Penular aktif adalah individu vektor

¹ Jurusan/Program Studi Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret (UNS), Surakarta,
Jl. Ir. Sutami 36 A, Kentingan, Surakarta 57126. E-mail: prihpt@uns.ac.id; priyadi_hpt@yahoo.co.id.

yang dapat menularkan virus setelah makan akuisisi (*aquisition feeding*), yakni proses makan vektor yang mendapatkan virus. Individu penular aktif diduga memiliki karakter berbeda dengan individu bukan penular, namun perbedaan tersebut masih belum diidentifikasi. Identifikasi karakter *N. virescens* penular aktif belum tentu cukup menggunakan sifat morfologi. Upaya memahami kasus-kasus keragaman individu dalam populasi sering memerlukan studi lebih dalam pada aras molekular. Hal tersebut disebabkan karena ekspresi gen tidak selalu dalam wujud morfologi, tetapi dapat berupa karakter fisiologi. Perubahan dalam karakter fisiologi hanya mempengaruhi sistem kinerja sel (Brooker, 1999), sehingga tidak dapat dideteksi pada aras morfologi.

Berdasarkan hal tersebut, tujuan penelitian ini adalah: (i) mengidentifikasi karakter individu *N. virescens* penular aktif berdasarkan atas sifat morfologi; dan (ii) mengidentifikasi karakter individu *N. virescens* penular aktif berdasarkan profil pita protein total.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan dari bulan Februari sampai November 2009. Pembiakan masal dan uji penularan dilakukan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Sedangkan elektroforesis di Laboratorium Mikrobiologi II, PAU, Universitas Gadjah Mada.

Identifikasi Individu Penular Aktif. Tahapan identifikasi diawali dengan penangkaran *N. virescens* yang dilakukan sesuai metode Dahal *et al.* (1997) dan Cooter *et al.* (2000) dengan sedikit modifikasi pada varietas padi dan umur bibit yang digunakan sebagai pakan. Varietas Cisadane yang tidak memiliki gen Glh (gen tahan *N. virescens*) dipilih untuk pakan. Benih Cisadane disebar pada tanah yang ditempatkan pada kotak plastik ukuran 3 x 7 x 14 cm. Selanjutnya, bibit tersebut dimasukkan ke dalam sangkar penangkaran ukuran 40 x 40 x 40 cm dengan dinding kasa. Penangkaran *N. virescens* dilakukan sampai diperoleh jumlah yang mencukupi untuk uji penularan virus.

Prosedur uji penularan virus dilakukan sesuai metode Dahal *et al.* (1997) dengan sedikit modifikasi. Seratus ekor *N. virescens* imago jantan dan betina umur 3-5 hari diinfestasi pada padi terinfeksi virus tungro untuk makan akuisisi selama tiga hari. Selanjutnya, wereng dipindahkan secara individual pada bibit Cisadane sehat umur 7-10 hari untuk makan inokulasi (*inoculation*

feeding) selama tiga hari. Bibit Cisadane tersebut ditanam pada tanah dalam gelas plastik berdiameter 6 cm. Selama proses makan inokulasi bibit uji disungkup dengan mika film dengan ventilasi kain kasa.

Penentuan individu *N. virescens* penular aktif dan bukan penular aktif didasarkan atas kemampuannya menularkan virus tungro setelah makan akuisisi sesuai kriteria Ling (1972) melalui uji penularan virus. Indikator kemampuan vektor menularkan virus didasarkan pada kriteria gejala tungro pada *standard evaluation system (SES) for Rice* (IRRI, 1996). Indikator gejala tungro yang digunakan dalam penelitian ini adalah skor 3, yakni 1-10% pemendekan batang (pertumbuhan bibit tidak normal yang ditandai dengan pemendekan tanaman), namun daun tidak kuning. Selanjutnya individu, baik yang penular aktif maupun bukan penular aktif, disimpan dalam almari es untuk digunakan sebagai sampel dalam tahapan karakterisasi morfologi dan profil protein totalnya.

Morfologi *N. virescens* Penular Aktif. Identifikasi morfologi *N. virescens* penular aktif dilakukan untuk mendapatkan informasi sifat morfologi spesifik, berkaitan dengan kemampuannya menularkan virus tungro. Pengukuran dilakukan pada morfologi luar, yakni panjang kepala sampai abdomen, panjang tungkai belakang, panjang stylet (alat mulut), panjang sayap, dan lebar kepala.

Prosedur pengukuran morfologi dilakukan sesuai metode Siwi (1985), yakni merendam sampel *N. virescens* dalam larutan KOH 10% untuk menghilangkan pigmen. Spesimen yang sudah tidak memiliki pigmen ditempatkan pada gelas benda dengan diberi sedikit larutan gliserin untuk memperjelas objek. Sampel *N. virescens* diukur dengan mikrometer yang ditempatkan di atas gelas benda dan diamati di bawah mikroskop stereo. Jumlah sampel *N. virescens* penular dan bukan penular aktif sebanyak 30 ekor jantan dan 30 ekor betina. Data ukuran morfologi *N. virescens* jantan dan betina dianalisis secara komparatif. Hasil uji normalitas sebaran data ukuran morfologi terbukti tidak normal, sehingga analisis komparasi menggunakan uji nonparametrik, yakni Mann-Whitney dengan Z-test pada aras ketelitian 5%.

Profil Pita Protein Total

Penelitian dilakukan untuk mengidentifikasi perbedaan profil pita protein total antara individu *N. virescens* penular aktif dan bukan penular aktif. Identifikasi profil pita protein total dikerjakan sesuai metode Coats *et al.* (1990) dan Cruz *et al.* (1997), yakni

menggunakan teknik elektroforesis pada SDS-PAGE. Ekstraksi sample menggunakan larutan PBS (*phosphate buffered saline solution*). Konsentrasi *acrylamide* untuk *stacking gel* 3%, sedangkan *gradien gel* 10%. Elektroforesis dijalankan pada tegangan konstan 100 VA, sampai penanda (*bromphenol blue*) mendekati batas bawah gel. Pengecatan (*staining*) dilakukan satu malam menggunakan larutan *Coomassie brilliant blue-R-250*. Setelah proses pengecatan selesai dilanjutkan pelunturan cat (*destaining*) sampai pita protein muncul. Hasil elektroforesis protein total didokumentasi dengan foto digital. Profil protein total antara *N. virescens* penular aktif dan bukan penular aktif disusun secara biner (analisis deskriptif) dan disajikan dalam tabel untuk mengidentifikasi perbedaannya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi *N. virescens* Penular Aktif. Hasil uji statistik sifat morfologi *N. virescens* jantan dan betina penular aktif dan bukan penular aktif yang didasarkan

pada ukuran panjang kepala sampai abdomen, panjang sayap, panjang tungkai, panjang stylet, dan lebar kepala tidak menunjukkan perbedaan nyata pada aras ketelitian 5% (Tabel 1 dan 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa individu *N. virescens* penular aktif tidak memiliki ukuran morfologi spesifik berkaitan dengan kemampuannya menularkan virus tungro. Hasil analisis tersebut tidak sejalan dengan dugaan Supyani (1998) bahwa ukuran panjang stylet sebagai faktor yang mempengaruhi efektivitas *N. virescens* betina dalam menularkan virus tungro. Ukuran stylet individu *N. virescens* penular aktif tidak berbeda nyata dengan ukuran stylet individu bukan penular aktif.

Profil Pita Protein Total *N. virescens* Penular Aktif.

Hasil identifikasi profil pita protein total *N. virescens* penular dan bukan penular aktif dilakukan melalui elektroforesis pada gel *polyacrylamide* ditunjukkan pada Gambar 1, 2, dan 3. Semua sampel protein yang dimasukkan dalam sumuran (*well*) memiliki kuantitas setara, yakni 30,60 µg. Dengan memasukkan protein

Tabel 1. Ukuran morfologi *Nephotettix virescens* jantan penular dan bukan penular aktif virus tungro

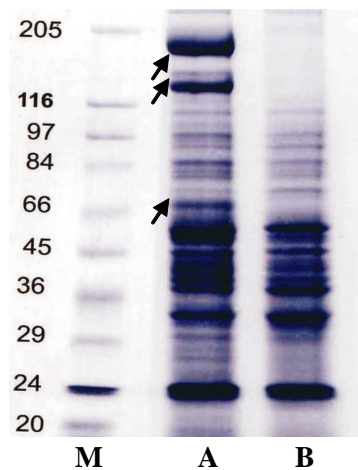
Sifat morfologi	Ukuran morfologi ($\bar{X} \pm SD$, mm)	
	Penular aktif	Bukan penular aktif
Panjang tubuh	3,6±0,3a	3,6±0,3a
Panjang sayap	3,4±0,2a	3,4±0,3a
Panjang tungkai	4,2±0,2a	4,2±0,3a
Panjang stylet	0,3±0,1a	0,3±0,1a
Lebar kepala	1,3±0,8a	1,3±0,1a

Keterangan: nilai rata-rata yang diikuti huruf sama dalam baris sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata pada aras ketelitian 5%.

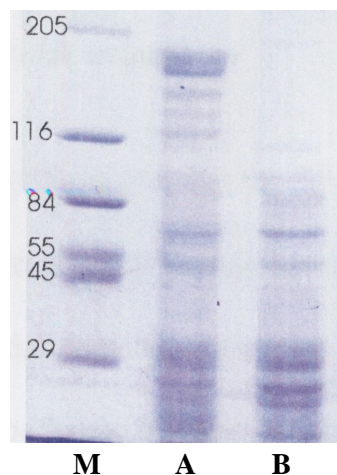
Tabel 2. Ukuran morfologi *Nephotettix virescens* betina penular dan bukan penular aktif virus tungro

Sifat morfologi	Ukuran morfologi ($\bar{X} \pm SD$, mm)	
	Penular aktif	Bukan penular aktif
Panjang tubuh	4,4±0,3a	4,4±0,4a
Panjang sayap	3,9±0,2a	3,8±0,2a
Panjang tungkai	4,7±0,3a	4,7±0,3a
Panjang stylet	0,4±0,1a	0,4±0,1a
Lebar kepala	1,4±0,1a	1,4±0,1a

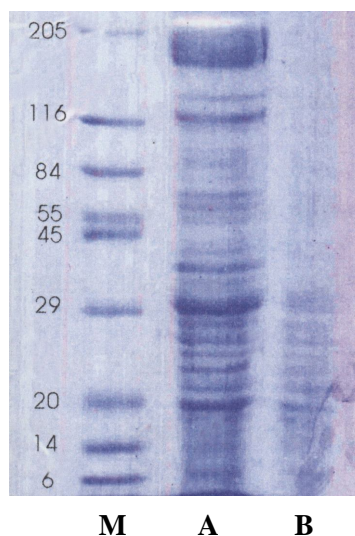
Keterangan: nilai rata-rata yang diikuti huruf sama dalam baris sama menunjukkan tidak ada perbedaan nyata pada aras ketelitian 5%.



Gambar 1. Profil protein total *Nephrotettix virescens* penular aktif dan bukan penular aktif. A. Penular aktif asal Pekalongan; B. Bukan penular aktif asal Pekalongan; dan M: Penanda ukuran protein. Posisi pita protein berbeda (↗), yakni hanya muncul pada penular aktif



Gambar 2. Profil protein total *Nephrotettix virescens* penular aktif dan bukan penular aktif. A. Penular aktif asal Sleman; B. Bukan penular aktif asal Sleman; dan M: Penanda ukuran protein



Gambar 3. Profil protein total *Nephrotettix virescens* penular aktif dan bukan penular aktif. A. Penular aktif asal Pacitan; B. Bukan penular aktif asal Pacitan; dan M: Penanda ukuran protein

yang setara, maka akan diperoleh profil pita protein yang dapat diperbandingkan.

Hasil interpretasi dan estimasi ukuran pita protein (Gambar 1) yang muncul pada *N. virescens* penular aktif dan bukan penular aktif virus tungro padi ditunjukkan pada Tabel 3. Berdasarkan atas interpretasi dan estimasi ukuran pita protein total tersebut, ada tiga pita protein spesifik pada *N. virescens* penular aktif. Pita protein dengan estimasi berat molekul 173, 134, dan 68 kDa muncul pada *N. virescens* penular aktif. Ketiga protein tersebut juga muncul sangat tebal (Gambar 1). Artinya, protein tersebut memiliki kandungan atau kuantitas protein yang tinggi. Protein tersebut juga muncul pada *N. virescens* penular aktif asal beberapa lokasi berbeda (Gambar 1, 2, dan 3). Hal ini memperkuat dugaan adanya hubungan antara protein tersebut dengan kemampuan individu *N. virescens* dalam menularkan virus tungro (sebagai individu penular aktif).

Protein tersebut diduga tidak diekspresikan secara terus menerus (bukan protein *constitutive*). Hal ini ditunjukkan oleh kandungan protein yang bervariasi sangat tinggi (pita tebal), rendah, bahkan ada yang tidak

terdeteksi. Belum dapat dijelaskan apakah fenomena tersebut berkaitan dengan perubahan sifat genetik *N. virescens* yang bisa menularkan virus tungro. Pada kasus penularan virus penggulung daun kentang (*potato leafroll luteovirus*), efektivitas penularannya dipengaruhi oleh sifat genetik Aphis (*Myzus spp.*). Hal tersebut terjadi melalui proses interaksi antara Aphis dan protein virus berkaitan dengan peredaran virus dalam tubuh vektornya (Terradot *et al.*, 1999).

Protein dengan estimasi berat molekul 173, 134, dan 68 kDa tersebut tidak muncul pada *N. virescens* yang belum makan akuisisi pada tanaman padi bergejala tungro (Supriyadi, 2008), sehingga keberadaannya diduga terjadi setelah *N. virescens* berinteraksi dengan virus tungro. Meskipun demikian, protein tersebut belum dapat disimpulkan sebagai komponen helper. Hasil identifikasi Supyani (1998), protein yang diduga sebagai komponen pembantu *N. virescens* penular aktif memiliki berat molekul 15, 18, 23, 36, dan 45 kDa. Dalam penelitian tersebut, komponen pembantu dipelajari dengan teknik *blotting* protein yang didasarkan antibodi terhadap RTSV. Ketiga protein spesifik tersebut juga

Tabel 3. Estimasi ukuran pita protein total *N. virescens* penular aktif dan bukan penular aktif virus tungro asal Pekalongan

Pita protein ke	Estimasi berat molekul (kDa)	Penular aktif	Bukan penular aktif
1	173	+	-
2	134	+	-
3	109	+	+
4	104	+	+
5	97	+	+
6	90	+	+
7	81	+	+
8	72	+	+
9	68	+	-
10	65	+	+
11	52	+	+
12	49	+	+
13	46	+	+
14	43	+	+
15	41	+	+
16	40	+	+
17	36	+	+
18	33	+	+
19	25	+	+

Keterangan: + : Pita pada posisi berat molekul tertentu muncul

- : Pita pada posisi berat molekul tertentu tidak muncul

bukan merupakan *coat protein* virus. Beberapa macam protein terkait ekspresi gen virus tungro adalah *coat protein* dengan ukuran 37, 33, dan 32 kDa (Jones *et al. cit.* Hull, 1996; Qu *et al.* 1991 *cit.* Herzog *et al.*, 2000) dan *coat-protein* RTSV, yakni 23 dan 24 kDa dan 26 dan 35 kDa (Hull, 1996), sedangkan produk-produk gen-gen tertentu virus tungro, seperti protease yang bertanggungjawab dalam pembentukan *capsid-protein* memiliki ukuran 13 kDa (Marmey *et al.*, 2005). Hal tersebut merupakan bukti, bahwa kecil kemungkinan ketiga protein tersebut merupakan produk langsung virus RTSV dan RTBV. Menurut May (1992) risiko kontaminasi oleh protein lain melalui metode elektroforesis protein total relatif kecil. Kontaminan protein harus memiliki konsentrasi sama dengan protein sampel untuk bisa mempengaruhi data.

SIMPULAN

Ukuran morfologi, khususnya panjang kepala sampai abdomen, panjang sayap, panjang tungkai, panjang stylet, dan lebar kepala *N. virescens* penular aktif, baik jantan maupun betina, tidak berbeda nyata dengan individu bukan penular aktif. Profil pita protein total individu *N. virescens* penular aktif menunjukkan perbedaan dengan individu bukan penular aktif. Pita protein dengan estimasi berat molekul 173, 134, dan 68 kDa hanya muncul pada *N. virescens* penular aktif.

DAFTAR PUSTAKA

- Angeles ER & Khush GS. 2008. Genetic analysis of resistance to green leafhopper, *Nephotettix virescens* Distant, in three varieties of rice. *Plant Breeding* 119(5): 446–448.
- Brooker RJ. 1999. *Genetics: Analysis and principles*. An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc. Menlo Park, California.
- Coats SA, Wicker L & McCoy CW. 1990. Protein variation among fuller rose beetle population from Florida, California, and Arizona (Coleoptera: Curculionidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83(6): 1054–1062.
- Cooter RJ, Winder D & Chancellor TCB. 2000. Tethered flight activity of *Nephotettix virescens* (Hemiptera: Cicadellidae) in the Philippines. *Bull. Entomol. Res.* 90: 49–55.
- Cruz RR, Miranda EM, Vasquez ZG & Estrada MO. 1997. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Bull. Entomol. Res.* 87: 197–202.
- Dahal G, Hibino H & Aguiro VM. 1997. Population characteristics and tungro transmission by *Nephotettix virescens* (Hemiptera: Cicadellidae) on selected resistant rice cultivars. *Bull. Entomol. Res.* 8: 387–395.
- Fereres A & Moreno A. 2009. Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res.* 141: 158–168.
- Gray SM & Banerjee N. 1999. Mechanisms of Arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 63(1): 128–148.
- Herzog E, Perez OG & Hohn T. 2000. The Rice tungro bacilliform virus gene II produk interacts with the coat protein domain of the viral gen III polyprotein. *J. Virol.* 74(5): 2073–2083.
- Hibino H & Cabauatan PQ. 1987. Infectivity neutralization of rice tungro associated viruses acquired by vector leafhopper. *Phytopathology* 77: 473–476.
- Himawati MK & Supriyadi. 2003. Studi komposisi wereng hijau genus *Nephotettix* spp. (Hemiptera: Cicadellidae) di wilayah endemi dan di luar wilayah endemi penyakit tungro padi. Program penelitian Dosen muda. DIKTI. Jakarta. *Laporan Penelitian*.
- Hull R. 1996. Molecular biology of rice tungro viruses dalam Webster RK, Zentmyer GA & Shaner G (eds). *Ann. Rev. Phytopathol.* 34: 275–297.
- International Rice Research Institute (IRRI). 1996. *Standard evaluation system for rice*. Inger Genetic Resources (4th edition). Manila, Philippines.

- Ling KC. 1972. *Rice virus disease*. International Rice Research Institute. Los Banos, Philippines.
- Marmey P, Mendoza AR, de Kochko A, Beachy RN & Fauquet CM. 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.
- May B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. Pp 1-26. In: Hoelzel, A.R (edt). *Molecular Genetic Analysis of Populations, A Practical Approach*. Oxford University Press. New York.
- Muralidharan K, Krishnaveni D, Rajarajeswari NVL & Prasad ASR. 2003. Tungro epidemics and yield losses in paddy fields in India. *Curr. Sci.* 85(8): 1143–1147.
- Padmavathi G, Krishnaiah NV, Siddiq EA & Kole C. 2007. Identification of random amplified polymorphic DNA markers for resistance to green leafhopper (*Nephotettix virescens* Distant.) in Rice. SABRAO. *J. of Breeding and Genetics* 39(2): 127–143.
- Siwi SS. 1985. Studies on green leafhopper genus *Nephotettix Matsumura* (Euscelidae, Homoptera) in Indonesia with special reference to morphological aspects. A Thesis for the Degree of Doctor of Agriculture, Agriculture University of Tokyo. Unpublished.
- Supriyadi, Untung K, Trisyono A & Yuwono T. 2004. Karakter populasi wereng hijau, *Nephotettix virescens* (Hemiptera: Cicadellidae) di wilayah endemi dan nonendemi penyakit tungro padi. *J. Perlind. Tanam. Indon.* 10(2): 112–120.
- Supriyadi, Untung K, Trisyono A & Yuwono T. 2008. Keragaman Populasi wereng hijau, *Nephotettix virescens* Distant (Hemiptera: Cicadellidae) asal wilayah endemi dan nonendemi penyakit tungro padi. *Seminar Nasional V Perhimpunan Entomologi Indonesia (PEI) Cabang Bogor*. Bogor: 18-19 Maret 2008.
- Supyani. 1998. Kajian protein pembantu dalam penularan virus tungro padi oleh wereng hijau *Nephotettix virescens* Distant. *Thesis S2*. Fakultas Pascasarjana. UGM. Yogyakarta (Tidak dipublikasi).
- Terradot L, Simon JC, Leterme N, Bourdin D, Wilson AC, Gauthier JP & Robert Y. 1999. Molecular characterization of clones of the *Myzus persicae* complex (Hemiptera: Aphididae) differing in their ability to transmit the potato leafroll luteovirus (PLRV). *Bull. Entomol. Res.* 89: 355–363.
- Wang C, Yasui H, Yoshimura A, Zhai H & Wan J. 2004. Inheritance and QTL Mapping of antibiosis to green leafhopper in rice. *Crop Sci.* 44: 389–393.
- Widiarta IN. 2005. Wereng hijau (*Nephotettix virescens* Distant): Dinamika populasi dan strategi pengendaliannya sebagai vektor penyakit tungro. *J. Litbang Pertanian* 24(3): 85–92.