

## PENGARUH SUHU TERHADAP INFEKSI CaMV PADA BRASSICA RAPA MENGGUNAKAN METODE AGROINFEKSI

Sismindari  
Fakultas Farmasi UGM

### ABSTRAK

*Penggunaan Cauliflower mosaic virus (CaMV) sebagai penanda dalam agroinfeksi merupakan metode peka untuk mempelajari proses pemindahan DNA dari Agrobacterium tumefaciens ke sel tanaman. Metode ini selanjutnya diharapkan, dapat dipakai dalam mempelajari proses penghambatan pembentukan tumor, yang dalam hal ini kemungkinan terjadi pada proses pemindahan DNA ke tanaman. Seperti diketahui bahwa pembentukan tumor merupakan hasil dari serangkaian proses, yang kemungkinan salah satu dari proses tersebut adalah peka terhadap panas. Untuk itu terlebih dahulu perlu dipelajari sejauh mana ketahanan CaMV terhadap panas. Informasi ini sangat diperlukan guna menentukan baik tidaknya penanda tersebut digunakan.*

*Pada penelitian ini A.tumefaciens pembawa dimer CaMV yang diklon pada bagian tengah T-DNA (pGV3850414D), pada sebelah kiri dari T-DNA (pHind10414D) dan pada bagian kromosom bakteri (pC5806414D) serta plasmid galur alam pTiC58 digunakan untuk menginokulasi Brassica rapa pada berbagai suhu, antara 26°C sampai 37°C. Hasil inokulasi dievaluasi berdasarkan pada terjadinya tanda infeksi, timbulnya tumor dan hibridisasi dot blot.*

*Hasil penelitian menunjukkan bahwa kenaikan suhu menyebabkan penurunan frekuensi terjadinya infeksi virus maupun terbentuknya tumor sampai akhirnya dihambat sama sekali, yaitu pada temperatur 35°C untuk infeksi CaMV dan 37°C untuk pembentukan tumor.*

**Kata kunci :** CaMV, Agroinfeksi

### ABSTRACT

*The use of the induction of virus symptoms of Cauliflower mosaic virus (CaMV) as a marker, Agroinfection, is a sensitive way of investigating transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens to plant cell. This method was then planned to be used to access whether a thermosensitive step was involved in the process of transfer, as known that the process of tumour formation is a result from a number of processes any of which might be thermosensitive. For this experiment, firstly investigation of thermal inhibition of virus symptom was required as to find out whether CaMV was useful as a marker.*

*During this experiment Agrobacterium tumefaciens containing dimers of CaMV DNA which was cloned within T-DNA (pGV3850414D), on the left side of T-DNA (pHind10414D), within the bacterial chromosome (pC58065414D) and the wild type of A.tumefaciens (pTiC58) were used to infect Brassica rapa (turnip). The result was then evaluate based on the viral symptom, tumor formation and dot blot hybridisation.*

*The result indicated that temperature was involved in the viral symptom and tumour*

formation i.e. the increase of the temperature the decrease of the frequency of viral symptom and tumour formation until then totally inhibited. Viral symptom was inhibited at 35°C and tumour formation at 37°C.

**Key-words :** *CaMV*, *Agroinfection*

## PENDAHULUAN

Penyebaran virus tanaman, pada umumnya melalui serangga, hanya ada beberapa yang dapat ditularkan secara mekanik. Akan tetapi akhir-akhir ini telah dikembangkan suatu metode infeksi dengan pertolongan plasmid Ti, yakni plasmid dengan ukuran 200- 250 kb, yang terdapat pada semua galur virulen dari *Agrobacterium tumefaciens*. Metode ini selanjutnya dikenal sebagai Metode 'Agroinfeksi' (Grimsley *et al*, 1986). Penggunaan plasmid Ti dalam metode ini didasarkan pada adanya bagian dari plasmid Ti, T-DNA, yang dapat dipindahkan ke tanaman pada proses pembentukan tumor (Schell.J., 1988). Dalam hal ini DNA virus disisipkan pada T-DNA sebagai pengganti gena pembentuk tumor yang telah dihilangkan. Penghilangan gena penyebab tumor tersebut dimaksudkan agar tanaman tumbuh normal (Caplan *et al*, 1983; Zambryski *et al*, 1983). Inisiasi infeksi virus pada tanaman setelah dilakukan inokulasi dengan *A.tumefaciens* yang menyandi genom virus dimer sangat peka. Dengan menggunakan DNA *Cauliflower mosaic virus (CaMV)* sebagai penanda, agroinfeksi dapat digunakan untuk mendeteksi proses pemindahan DNA dari *A.tumefaciens* ke sel tanaman (Hile *et al*, 1986; Walden, 1988). Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa hanya CaMV yang terletak pada bagian tengah dari T-DNA yang menimbulkan infeksi, sedangkan CaMV yang disisipkan di luar T-DNA tidak mampu menginfeksi tanaman. Penelitian ini mendukung peneliti terdahulu yang membuktikan bahwa hanya T-DNA yang dipindahkan dalam proses pembentukan tumor. Metode agroinfeksi dalam penelitian tersebut dilakukan pada suhu 26°C, yaitu suhu pembentukan tumor berlangsung dengan baik. Untuk selanjutnya dengan agroinfeksi diharapkan dapat mengungkap kemungkinan adanya kepekaan terhadap panas pada proses pemindahan DNA ke sel tanaman selama pembentukan tumor, seperti diketahui bahwa pembentukan tumor merupakan hasil dari serangkaian proses yang kemungkinan salah satu dari proses tersebut adalah peka terhadap panas. Untuk tujuan tersebut sebelumnya perlu diteliti sejauh mana proses infeksi CaMV dipengaruhi oleh suhu. Hal ini diperlukan untuk menentukan dapat tidaknya CaMV digunakan sebagai penanda pada penelitian yang melibatkan suhu yang tinggi. Dalam penelitian ini digunakan *A.tumefaciens* yang menyandi CaMV dimer yang disisipkan pada lokasi yang berbeda dan juga pTiC58 sebagai kontrol.

## CARA PENELITIAN

### Plasmid dan strain bakteri

pLW414S : klon CaMV CM4-184 pada vektor pBR322

*Agrobacterium* pembawa

pTiC58 : galur alami

pGV3850414D : DNA CaMV disisipkan pada bagian tengah dari T-DNA

pHind10414D : DNA CaMV disisipkan pada sebelah kiri dari T-DNA

pC5806414D : DNA CaMV disisipkan pada DNA kromosom.

### Inokulasi tanaman (Sambrook *et al*, 1989)

*Brassica rapa* (turnip) yang berumur tiga minggu diinokulasi pada daun (untuk plasmid) dengan jalan menggosokkan campuran 20 $\mu$ g plasmid dan celite (serbuk kasar yang digunakan untuk melukai daun), dalam 0,1xSSC (1,5mM NaCl dan 0,15mM natrium sitrat pH 7,0), atau dengan melukai kumpulan dari petiola yang dekat dengan permukaan tanah menggunakan jarum dan kemudian diteteskan 100 $\mu$ l larutan bakteri. Setelah diinokulasi, tanaman tersebut kemudian diinkubasikan pada suhu 26°C, 30°C 35°C dan 37°C.

### Dot blot dan hibridisasi (Sambrook, *et al*, 1989)

Dua potong daun dengan ukuran 2x2cm digerus sampai halus dengan pertolongan nitrogen cair. Kemudian serbuk daun tersebut disuspensikan dengan 100 $\mu$ l larutan TE (10mM Tris-HCl pH 7,0 dan 1mM EDTA pH 7,5), dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Supernatan kemudian diteteskan pada membran nilon dan dibiarkan kering pada suhu kamar. Selanjutnya dilakukan proses denaturasi dan netralisasi masing-masing 20 menit dalam larutan berturut-turut 200 ml campuran NaOH 0,2N dan NaCl 0,6M serta 200 ml campuran NaCl 3,0M dan Tris-HCl 0,5M pH 7,4. Membran nilon dikeringkan pada 65°C selama 10 menit dan disinari dengan ultra violet selama 20 detik, kemudian dilanjutkan dengan hibridisasi.

Prehibridisasi dan hibridisasi dilakukan berturut-turut selama 5 jam dan 18 jam pada suhu 65°C dalam larutan yang terdiri dari 1,5xSSPE (20xSSPE : NaCl 3M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O dan EDTA 0,02M), milk kering 0,5%, SDS 0,15, PEG 6000 6% dan 0,1-0,5 mg/ml DNA sperma hearing yang telah didenatur. Pencucian dilakukan 4x 15 menit dalam 150 ml larutan A yang terdiri dari 3xSSC (20xSSC: NaCl 3,0M dan Na citrat pH 7 0,3M) dan SDS 0,1% dan dilanjutkan 2x 15 menit dalam larutan B (0,5xSSC dan SDS 0,1%), keduanya dilakukan pada suhu 65°C. Membran nilon kemudian dibungkus dengan kling film dan diekspos semalam pada film sinar X.

### Preparasi probe

pLW414S (rekombinan klon dari CaMV) didigesti dengan *SalI* kemudian dielektroforesis untuk melepaskan DNA sisipan dari vektornya. Kurang lebih 25 ng DNA CaMV yang telah dimurnikan diencerkan sampai 15,5  $\mu$ l dan dididihkan selama 10 menit. Ke dalam DNA yang telah didenatur tersebut tambahkan 5  $\mu$ l larutan bufer oligo, 1  $\mu$ l larutan serum albumin bovin, 1  $\mu$ l Klenow DNA polimeraseI dan kemudian 2,5  $\mu$ l <sup>32</sup>P-dCTP (0,925mBq). Campuran tersebut dibiarkan pada temperatur kamar selama 18 jam yang diikuti dengan penambahan 100  $\mu$ l larutan penghenti ( NaCl 20mM, Tris-HCl pH 7,4 20mM, EDTA 2mM dan SDS 0,25%). DNA probe kemudian dimurnikan dengan menggunakan kolom Sephadex G50. Sebelum digunakan DNA probe tersebut dididihkan selama 10 menit.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Inokulasi tanaman dengan *Agrobacterium*

Induksi tumor dapat dilakukan pada *seedling* steril atau tanaman yang dibudidayakan secara *in-vitro*. Dalam penelitian ini digunakan tanaman *in-vitro* karena berdasarkan penelitian pendahuluan ternyata tanaman *in-vitro* lebih tahan pada suhu 37°C dibandingkan dengan tanaman steril. Tanaman ditumbuhkan pada pot dalam suatu inkubator pada suhu 26°C dengan pergantian gelap dan terang setiap 18 jam. Inokulasi dilakukan pada tanaman yang telah berumur 3 minggu dengan *A. tumefaciens* yang membawa pTiC58, pGV3850414D,

pHind10414D dan pC58065414D pada suhu 26°C, 30°C 35°C dan 37°C. Kemudian dilakukan penghitungan terhadap adanya tumor yang timbul (Gambar 1A) maupun terjadinya infeksi virus (Gambar 1B), yang ditandai dengan timbulnya gambaran mosaik pada daun (Grymsley *et al*, 1986). Dari keempat *Agrobacterium* yang digunakan untuk inokulasi, seperti terlihat pada Tabel 1, hanya satu yang dapat menimbulkan tanda infeksi virus yakni *Agrobacterium* yang membawa pGV3850414D. Sedang yang tiga lainnya dapat menimbulkan tumor. Hasil ini mendukung penelitian terdahulu (Walden, 1988) bahwa hanya T-DNA saja yang dipindahkan pada sel tanaman. Sehingga hanya pGV3850414D (CaMV berada pada T-DNA), yang dapat menimbulkan infeksi CaMV. Sedangkan untuk *Agrobacterium* dimana CaMV disisipkan diluar T-DNA (pHind10414D dan pC58065414D) tidak menimbulkan tanda infeksi CaMV, tetapi menimbulkan tumor karena dalam hal ini T-DNA tanpa modifikasi yang dipindahkan ke dalam sel tanaman. Pada suhu 26°C, proses inokulasinya terjadi secara sempurna, seperti terlihat pada Tabel 1 bahwa seluruh tanaman yang diinokulasi dapat terinfeksi (pGV3850414D) dan terbentuk tumor (pHind10414D, pC58065414D dan pTiC58). Hasil inokulasi yang dilakukan pada suhu 30°C maupun 35°C menunjukkan bahwa masih terjadi proses pemindahan T-DNA, yang dalam hal ini ditandai dengan terbentuknya tumor yakni 50% dan 30% untuk pC58065414D serta 90% dan 70% untuk pHind10414D dan pTiC58. Sedangkan pada 37°C diketahui tidak terbentuk tumor. Tanda infeksi virus menurun pada 30°C dan tidak terbentuk sama sekali pada 35°C dan 37°C. Tidak terbentuknya infeksi CaMV pada 35°C yang diketahui masih terjadi proses pemindahan T-DNA, ada beberapa kemungkinan: pertama, tidak ada replikasi sama sekali dari CaMV yang telah dipindahkan ke sel tanaman; kedua, replikasi dari CaMV dihambat sehingga tanda infeksi tidak terdeteksi dengan mata; ketiga, tidak terjadi pemindahan dari T-DNA yang telah mengandung DNA asing. Untuk mengetahui adanya kemungkinan tersebut perlu dilakukan percobaan lebih lanjut yakni dengan melakukan hibridisasi dot blot dan inokulasi tanaman langsung dengan virus.

#### Dot blot dan hibridisasi

Dot blot dan hibridisasi dilakukan untuk mengetahui tanda infeksi CaMV secara molekular karena diduga tidak terlihatnya tanda tersebut disebabkan oleh terlalu sedikitnya jumlah CaMV, sehingga untuk mencapai jumlah yang dapat terlihat perlu waktu lebih lama. Waktu normal yang diperlukan dari inokulasi sampai timbulnya tanda infeksi sekitar 10-14 hari. Pada penelitian ini sampel diambil dari daun yang telah diinfeksi selama 4 minggu. Selanjutnya dilakukan isolasi DNA dan kemudian diblot pada membran nilon. Hibridisasi dilakukan dengan menggunakan CaMV sebagai pelacak. Dari hasil penelitian (Gambar 2) menunjukkan bahwa tidak ada bercak yang timbul pada inokulasi 35°C dan 37°C. (Gambar 2B dan C). Ini dapat dikatakan bahwa daun tersebut tidak terinfeksi. Tidak adanya tanda dari infeksi virus ini kemungkinan besar disebabkan oleh adanya penghambatan replikasi dari virus, sebab pada temperatur 35°C tumor masih dapat terbentuk (Tabel 1). Disamping itu ada kemungkinan pula terjadi hambatan pemindahan dari T-DNA yang telah dimodifikasi. Untuk menjawab kemungkinan tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui adanya pengaruh suhu pada penghambatan multiplikasi CaMV, yakni dengan jalan menginfeksi tanaman secara langsung dengan CaMV.

#### Inokulasi tanaman dengan CaMV

Inokulasi tanaman secara langsung menggunakan CaMV dapat dilakukan dengan berbagai cara, yakni menginokulasikan fragmen DNA CaMV, klon dimer CaMV baik dalam

bentuk sirkuler atau linier dan klon monomer CaMV dalam bentuk linier. Dalam hal ini yang digunakan adalah klon CaMV dimer pada vektor pBR322 atau yang disebut pLW414D. Inokulasi dilakukan pada suhu 26°C, 35°C, dan 37°C. Adapun deteksi infeksi dilakukan dengan hibridisasi dot blot. Hasil inokulasi (Gambar 3) menunjukkan bahwa infeksi hanya terjadi pada 26°C (Gambar 3A) yang ditandai dengan timbulnya bercak hitam pada autoradiografi, tetapi tidak pada 35°C dan 37°C (Gambar 3B dan C). Hal ini menunjukkan bahwa multiplikasi dari CaMV dihambat pada temperatur 35°C dan 37°C. Sehingga dengan demikian dapat dibuktikan bahwa tidak adanya signal infeksi virus dalam penelitian ini disebabkan karena pada suhu tinggi terjadi penghambatan multiplikasi dari virus CaMV. Dengan demikian pemakaian CaMV sebagai penanda pada penelitian yang menggunakan temperatur 35°C atau lebih sangatlah tidak menguntungkan, karena pada saat tumor masih terbentuk penanda itu sendiri sudah dihambat ekspresinya. Oleh karena itu untuk mempelajari mekanisme penghambatan pembentukan tumor perlu digunakan penanda yang masih dapat diekspresi pada saat pembentukan tumor dihambat sama sekali. Dengan demikian akan diketahui tahap yang peka terhadap panas.

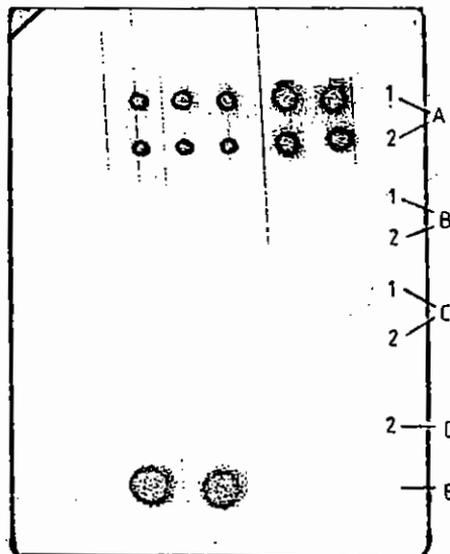


Gambar 1

- A. Tumor yang timbul pada *Brassica rapa* setelah 4 minggu dilakukan inokulasi pada suhu 26°C dengan 100 µl kultur *A.tumefaciens* pembawa pC58065414D pHind10414D dan pTiC58.
- B. Gambaran mosaik pada daun *Brassica rapa* setelah 4 minggu diinokulasi dengan 100 µl kultur *A.tumefaciens* pembawa pGV3850414D pada suhu 26°C.

Tabel 1 : Infeksi *A. tumefaciens* pembawa plasmid Ti galur alam dan plasmid Ti yang mengandung DNA CaMV

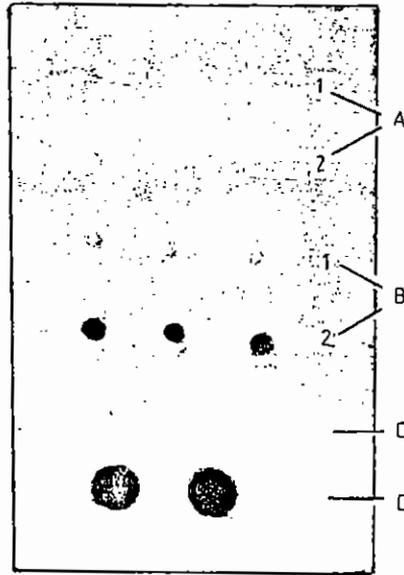
Bakteri Pembawa	Pembentukan tumor				Infeksi CaMV			
	26°C	30°C	35°C	37°C	26°C	30°C	35°C	37°C
pGV3850414D	0/13	0/13	0/10	0/06	13/13	8/13	0/10	0/06
pC58065414D	13/13	6/13	3/10	0/06	0/13	0/13	0/10	0/06
pHind10414D	13/13	11/13	7/10	7/06	0/13	0/13	0/10	0/06
pTiC58	13/13	11/13	7/10	0/06	0/13	0/13	0/10	0/06



Gambar 2

Analisis dot blot dari daun *Brassica rapa* yang terinfeksi dengan CaMV setelah disingkapkan selama 20 jam. Sampel diambil 3 minggu setelah inokulasi. Hibridisasi dilakukan pada 65°C selama 18 jam dengan probe DNA CaMV bertabel [32P]dCTP.

- A. Inokulasi dengan pGV3850414D pada 26°C.
- B. Inokulasi dengan pGV3850414D pada 35°C.
- C. Inokulasi dengan pGV3850414D pada 37°C.
- D. Inokulasi dengan pTiC58 pada 26°C (sebagai kontrol negatif). E. pLW414D (sebagai kontrol positif).



Gambar 3

Analisis dot blot dari daun *Brassica rapa* yang terinfeksi dengan CaMV setelah disingkapkan selama 20 jam. Sampel diambil 4 - 5 minggu setelah infeksi. Hibridisasi dilakukan pada 65°C selama 18 jam dengan menggunakan probe DNA CaMV berlabel [<sup>32</sup>P]dCTP.

- A. Inokulasi langsung dengan pLW414D pada 37°C. B. Inokulasi langsung dengan pLW414D pada 26°C.  
C. Inokulasi langsung dengan pTiC58 (kontrol negatif)  
D. pLW414D (kontrol positif).  
1. ekstrak dari 2 lembar daun dalam 100 ml TE.  
2. ekstrak dari 6 lembar daun dalam 100 ml TE

## KESIMPULAN

Kenaikan suhu menyebabkan penurunan frekuensi timbulnya infeksi maupun tumor, yang kemudian dihambat sama sekali pada suhu 35°C untuk infeksi virus dan 37°C untuk tumor. Tidak terjadinya tanda infeksi pada 35°C disebabkan karena dihambatnya proses multiplikasi dari CaMV pada tanaman. Dengan demikian untuk penelitian lanjutan yang memerlukan suhu tinggi perlu digunakan penanda lain.

---

**DAFTAR PUSTAKA**

- Caplan, A.C., Herrera-Estrella, L., Inze, D., Van Haute, E., Van Montagu, M., Schell, L., and Zambryski, P., (1983), Introduction of genetic material into plant cells, *Science*, 22: 815-821.
- Draper, J., Scott, R., Armitage, P., and Walden, R., (1988), Plant genetic transformation and gene expression, a laboratory manual, Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Grimsley, N., Hohn, B., Hohn, T., and Walden, R., (1986), "Agroinfection" an alternative route for viral infection of plants by using the Ti-plasmid, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 3282-3286.
- Hille, J., Dekker, M., Luttighuis, H.O., Van Kammen, Ab., and Zabel, P., (1986), Detection of T-DNA transfer to plant cells by *A.tumefaciens* virulence mutants using agroinfection, *Mol. Gen. Genet.*, 205: 411-416.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., (1989), Molecular Cloning, a laboratory manual second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schell, J., (1988), Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* into plants, Forty-third symposium of the society for general microbiology, 355-356.
- Walden, R., (1988), personal communication.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Van Montagu, M., Schell, J., (1983), Ti-plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity, *Embo.J.*, 2: 2143-2150