

Analisis Ketahanan Galur Mutan M₂ Cabai Hasil *Genome Editing* CRISPR/Cas9 terhadap Penyakit Virus Kuning (Resistance Analysis of CRISPR/Cas9 Genome-Edited Chili M₂ Mutant Lines against Pepper Yellow Leaf Curl Viral Disease)

Wandy Murti Prasetya^{1,2}, Toto Hadiarto^{1*}, Wening Enggarini¹, Aqwin Polosoro¹, dan Suharsono²

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111, Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: totohadiarto@pertanian.go.id, thadiarto@gmail.com

²Program Studi Magister Bioteknologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Jl. Kamper, Gedung PAU,
Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680, Indonesia

Diajukan: 7 September 2020; Direvisi: 14 Desember 2020; Diterima: 16 Februari 2021

ABSTRACT

Pepper yellow leaf curl virus (PepYLCV) infection transmitted by silverleaf whitefly (*Bemisia tabaci* [Gennadius]) can decrease chili pepper yield up to 100%. At this moment, there is no chili pepper variety resistant to PepYLCV available. Genome editing approach through CRISPR/Cas9 is an effort to develop variety resistance to the viral infection. The purpose of this study was to obtain chili M₂ lines developed by CRISPR/Cas9 system on *proliferating cell nuclear antigen* (*PCNA*) gene for resistance to PepYLCV. A total of four M₂ lines (C47-7, L84-2, L84-23, and L120-19) consisting of 60 chili plants were tested for their resistance to PepYLCV. PCR analysis was performed to detect the presence (infection) of the virus. The results showed that a total of 35 plants derived from the four lines were resistant to PepYLCV. They consisted of 7 plants from C47-7 line, 11 plants from L84-2 line, 9 plants from L84-23 line, and 8 plants from L120-19 line. PCR analysis confirmed that the resistant plants obtained from this study were negatively infected by the virus. Since not all tested plants were resistant to virus infection, the *PCNA* gene allele in these resistant lines were most likely heterozigotes. Sequencing of *PCNA* gene of the resistant lines is needed to confirm that the resistance phenotypes obtained was due to mutation of the gene. Therefore, further selection needs to be performed to obtain stable and PepYLCV-resistant lines.

Keywords: *Capsicum annuum* L., genome editing, CRISPR/Cas9, PepYLCV.

ABSTRAK

Penyakit virus kuning yang disebabkan oleh *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV) dan ditularkan melalui serangga vektor kutu kebul (*Bemisia tabaci* [Gennadius]) menyebabkan penurunan produksi cabai hingga 100%. Saat ini, belum ada varietas cabai yang mempunyai ketahanan tinggi terhadap serangan PepYLCV. Teknologi pengeditan genom (*genome editing*) menggunakan CRISPR/Cas9 merupakan salah satu upaya untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap serangan virus. Tujuan penelitian ini ialah memperoleh galur M₂ cabai hasil aplikasi sistem CRISPR/Cas9 pada gen *proliferating cell nuclear antigen* (*PCNA*) yang tahan terhadap PepYLCV. Sebanyak empat galur M₂ (C47-7, L84-2, L84-23, dan L120-19) yang terdiri atas 60 benih mutan putatif telah diuji ketahanannya terhadap penyakit tersebut. Analisis PCR dilakukan untuk mendeteksi keberadaan (infeksi) virus kuning. Hasil penelitian menunjukkan bahwa 35 tanaman dari empat galur tahan terhadap PepYLCV, yaitu 7 tanaman dari galur C47-7, 11 tanaman dari galur L84-2, 9 tanaman dari galur L84-23, dan 8 tanaman dari galur L120-19. Konfirmasi dengan PCR menunjukkan semua galur tahan negatif infeksi virus kuning. Tanaman-tanaman tahan hasil penelitian ini diperkirakan membawa alel gen *PCNA* dalam kondisi heterozigot. Sekuensing gen *PCNA* pada galur-galur tahan perlu dilakukan untuk mengonfirmasi ketahanannya terhadap PepYLCV disebabkan oleh mutasi pada gen tersebut. Seleksi lanjutan perlu dilakukan untuk memperoleh galur harapan mutan yang stabil dan tahan PepYLCV.

Kata kunci: *Capsicum annuum* L., pengeditan genom, CRISPR/Cas9, PepYLCV.

PENDAHULUAN

Tanaman cabai (*Capsicum annuum* L.) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang mempunyai nilai ekonomi tinggi dan banyak ditanam di Indonesia. Cabai juga merupakan salah satu komoditas strategis yang termasuk dalam program swasembada utama Kementerian Pertanian pada Rencana Strategis tahun 2014–2019 (Hermawan et al. 2016). Menurut data Kementerian Pertanian (2018), produksi cabai di Indonesia pada tahun 2018 mencapai 1,2 juta ton dengan peningkatan produksi sebesar 0,04% dibanding dengan tahun 2017. Peningkatan produksi cabai tersebut termasuk rendah dikarenakan adanya faktor-faktor pembatas produksi, antara lain lingkungan abiotik, kurang optimumnya teknik budi daya, dan serangan hama dan penyakit tanaman.

Salah satu penyakit penting tanaman cabai adalah virus. Virus utama yang menginfeksi cabai, yaitu *Pepper yellow leaf curl virus* (PepYLCV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), dan *Chili veinal mottle virus* (ChiVMV) (Sukada et al. 2014). PepYLCV merupakan virus dari famili *Geminiviridae*, genus *Begomovirus*. Virus ini menyebabkan penyakit kuning keriting dan pada tanaman cabai sering disebut penyakit kuning (Fadhila et al. 2020). Penyakit ini ditandai dengan daun kuning keriting yang menggulung ke atas atau ke bawah dan tanaman menjadi kerdil (Ganefianti et al. 2008).

Serangan PepYLCV pada cabai telah dilaporkan di Jawa Tengah, Yogyakarta, Jawa Barat, Sumatra Utara, dan Sumatra Barat (Sulandari et al. 2006; Trisno et al. 2009; Hannum et al. 2019). Pada tahun 2003 serangan penyakit ini menyebabkan gagal panen dan pemusnahan cabai pada beberapa daerah sentra produksi, seperti Yogyakarta dan Lampung (Sulandari et al. 2006). Pengendalian PepYLCV telah dilakukan dengan berbagai cara, di antaranya dengan pemanfaatan kumbang Coccinellidae (*Verania lineata*) sebagai predator kutu kebul (*Bemisia tabaci* [Gennadius]) (Udiarto et al. 2012) yang merupakan vektor efektif penularan PepYLCV. Tumpang sari cabai merah dan kubis mampu menekan populasi kutu kebul hingga 60,72% (Setiawati et al. 2008). Metode pengendalian penyakit ini belum sepenuhnya efektif dalam menekan infeksi PepYLCV.

Varietas yang tahan terhadap PepYLCV dapat menjadi salah satu pilihan dalam pengendalian penyakit ini. Salah satu alternatif yang dapat digunakan dalam perakitan varietas tahan penyakit adalah metode pengeditan genom (*genome editing*) meng-

gunakan *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/*CRISPR-associated protein 9* (Cas9). Dengan teknologi pemuliaan modern terbaru ini, proses *genome editing* dapat dilakukan dan diarahkan untuk gen target ketahanan.

Pendekatan *genome editing* menggunakan CRISPR/Cas9 pada cabai varietas Ciko dan Lingga telah berhasil membuat mutasi pada gen *PCNA* untuk ketahanan terhadap PepYLCV (Kurniawati et al. 2020). Mutasi pada gen *PCNA* telah dikonfirmasi pada kalus yang telah terseleksi pada media tanam melalui sekuensing. Kalus tersebut telah menghasilkan tanaman M_0 yang tahan terhadap PepYLCV. Galur-galur mutan turunan kedua (M_2) yang didapatkan dari hasil penelitian tersebut harus diuji lebih lanjut terkait kestabilan sifat ketahanannya terhadap PepYLCV. Tujuan penelitian ini ialah memperoleh galur M_2 cabai hasil aplikasi sistem CRISPR/Cas9 pada gen *PCNA* yang tahan terhadap PepYLCV.

BAHAN DAN METODE

Materi Genetik

Materi genetik yang digunakan adalah empat galur mutan M_2 cabai, yaitu C47-7, L84-2, L84-23, dan L120-19 yang tiap galur terdiri atas 15 tanaman, serta cabai varietas Ciko dan Lingga yang tidak dimutasi sebagai kontrol. Galur-galur mutan yang diuji tersebut berasal dari varietas Ciko dan Lingga hasil *genome editing* menggunakan sistem CRISPR/Cas9. Ciko dan Lingga termasuk varietas cabai yang mempunyai produktivitas tinggi dan daya simpan buah yang lama, tetapi tidak tahan terhadap patogen PepYLCV. Sumber inokulum virus yang digunakan adalah isolat PepYLCV koleksi Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB (Adilah dan Hidayat 2014).

Perbanyak Sumber Inokulum Virus

Sumber inokulum virus berasal dari tanaman cabai yang terinfeksi PepYLCV. Perbanyak inokulum PepYLCV dilakukan melalui penularan dengan serangga vektor kutu kebul mengikuti prosedur Faizah (2010). Kutu kebul yang diperbanyak pada tanaman kapas (*Gossypium herbaceum*) di dalam kurungan kedap serangga dan tanaman cabai yang terinfeksi PepYLCV dipelihara di rumah kaca. Kutu kebul diakuisisi pada tanaman sumber inokulum virus selama 24 jam untuk selanjutnya dipindahkan ke tanaman cabai sehat sebagai perlakuan.

Evaluasi Fenotipe Ketahanan Galur Mutan M₂ Cabai terhadap Infeksi PepYLCV

Empat galur mutan (benih M₂) yang didapat dari hasil seleksi tanaman M₁ ditumbuhkan di dalam bak perkecambahan di rumah kaca. Sebanyak 20 benih ditanam pada bak perkecambahan yang telah diisi media tanam yang mengandung tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1 (b/b). Benih varietas tetua juga disemai dan bibitnya ditanam sebagai kontrol. Sebanyak sepuluh ekor kutu kebul dari tanaman sumber inokulum diinfestasikan pada galur uji dan varietas kontrol sehat yang berumur 6 minggu. Penularan virus melalui infestasi kutu kebul ini dilakukan sama seperti tahap perbanyak inokulum dengan periode makan akuisisi selama 24 jam. Setiap tanaman diberi sepuluh ekor kutu kebul, lalu serangga vektor tersebut dimatikan setelah periode makan. Selanjutnya, tanaman dipindahkan ke kebun percobaan untuk pengamatan lebih lanjut.

Evaluasi ketahanan galur mutan cabai dilakukan berdasarkan hasil pengamatan insiden dan keparahan penyakit pada galur uji (Ganefianti et al. 2008). Rancangan yang digunakan adalah analisis deskriptif untuk melihat keragaman antarindividu (Yusnita dan Sudarsono 2004). Setiap perlakuan diulang tiga kali dengan lima tanaman untuk setiap ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap gejala, keparahan, dan insiden penyakit serta masa inkubasi. Masa inkubasi dimulai saat gejala penyakit pertama muncul. Insiden penyakit dihitung pada minggu terakhir pengamatan dengan rumus sebagai berikut (Arpiyadi et al. 2013):

$$IP = \frac{n}{N} \times 100\%$$

dengan IP = insiden penyakit, N = jumlah tanaman total, dan n = jumlah tanaman yang sakit.

Keparahan penyakit dihitung dengan menggunakan skor tertentu yang diberikan berdasarkan gejala penyakit pada cabai setiap minggunya. Keparahannya (KP) dihitung dengan menggunakan rumus:

$$KP = \frac{\sum (ni \times zi)}{(N \times Z)} \times 100\%$$

dengan $i = 0-5$, ni = jumlah tanaman bergejala dengan nilai skor tertentu, zi = nilai skor gejala, N = jumlah tanaman total yang diamati, dan Z = nilai skor tertinggi. Skor gejala yang digunakan ialah: 0 = tanpa gejala, 1 = kuning, 2 = kuning mengikuti tulang daun, 3 = kuning hampir di seluruh bagian tanaman, 4 = kuning dan terjadi perubahan bentuk daun menjadi keriting, dan 5 = daun kuning keriting dan tanaman menjadi kerdil. Nilai KP selanjutnya

digunakan dalam pengelompokan tingkat ketahanan cabai terhadap virus dengan kriteria: imun jika $KP = 0\%$, tahan jika $0 < KP \leq 5\%$, agak tahan jika $5\% < KP \leq 10\%$, agak rentan jika $10\% < KP \leq 20\%$, rentan jika $20\% < KP \leq 40\%$, dan sangat rentan jika $KP \geq 40\%$ (Ganefianti et al. 2008).

Analisis Molekuler untuk Deteksi PepYLCV

Isolasi DNA genomik tanaman

DNA genomik diisolasi dari daun cabai menggunakan metode CTAB yang dikembangkan oleh Maguire et al. (1994). DNA genomik kemudian diukur konsentrasinya dengan *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific, AS). DNA genomik selanjutnya digunakan sebagai cetakan pada analisis PCR.

Deteksi PepYLCV dengan PCR

Amplifikasi fragmen DNA melalui PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik untuk mendeteksi PepYLCV dengan DNA genomik cabai sebagai cetakan. Amplifikasi PCR merujuk pada metode Rojas et al. (1993) menggunakan primer universal *Begomovirus* (SPG1 dan SPG2) yang mengamplifikasi *open reading frame* (ORF) AC1 dan AC2 virus dan menghasilkan produk PCR berukuran sebesar 912 bp. Urutan nukleotida primer SPG1 yaitu 5'-CCCCCKGTGCGWRAATCCAT-3', sedangkan SPG2 yaitu 5'-ATCCVAAYWTYCAGGGAGCT-3' (Li et al. 2004). Primer lain yang digunakan adalah pasangan primer *Krusty1* (K1) dan *Homer1* (H1). K1 merupakan primer *forward* dengan urutan 5'-CCNMRDGGHTGTGARGGNCC-3', sedangkan H1 merupakan primer *reverse* dengan urutan 5'-SVDGCRTGVGTRCANGCCAT-3'. Pasangan primer ini mengamplifikasi fragmen gen *coat protein* dengan ukuran sekitar 550 bp (Revill et al. 2003).

PCR dilakukan pada volume 20 μ l yang mengandung bufer PCR 1 \times (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], MgCl₂ 1,5 mM, dan gelatin 0,01%), dNTPs masing-masing 200 μ M, primer *forward* dan *reverse* masing-masing sebanyak 0,1 μ M, 50 ng DNA genomik cabai, dan *Taq* DNA polimerase (1 unit). Reaksi PCR meliputi denaturasi awal pada 94°C selama 5 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri atas denaturasi pada 94°C selama 30 detik, penempelan primer pada 55°C selama 30 detik, dan perpanjangan primer pada 72°C selama 1 menit. PCR diakhiri dengan reaksi pada 72°C selama 7 menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perbanyak Sumber Inokulum Virus

Semua tanaman cabai yang diinokulasi memperlihatkan respons bergejala terinfeksi PepYLCV dan digunakan sebagai sumber inokulum virus dengan serangga vektor kutu kebul untuk menginfeksi 60 individu tanaman M₂ uji. PepYLCV merupakan anggota genus *Begomovirus*, famili *Geminiviridae*. Famili *Geminiviridae* dibagi menjadi empat genus berdasarkan struktur genom, vektor serangga, dan rentang inang, yaitu *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus*, dan *Begomovirus*. Virus tersebut hanya dapat ditularkan melalui serangga vektor kutu kebul (Brown et al. 2012).

Gejala khas yang timbul pada tanaman terinfeksi PepYLCV menunjukkan mosaik kuning, ke-riting daun, daun distorsi, bekam daun, dan malformasi daun menjadi pengerdilan (Gambar 1). Infeksi PepYLCV pada tahap awal menyebabkan tanaman kerdil dan tidak menghasilkan buah karena bunga rontok lebih awal (Rusli et al. 1999; Sulandari 2004). Gejala yang muncul tersebut diakibatkan menurunnya jumlah membran tilakoid, stroma membesar, dan volume fotosintesis mengecil (Ariyanti 2011). Tingkat virulensi yang tinggi dikarenakan tingkat

replikasi virus yang tinggi di dalam sel tanaman sehingga menampakkan gejala serangan yang cepat (Maule et al. 2007). Hal ini dapat dilihat dari masa inkubasi pada tanaman yang singkat dan keparahan gejala atau intensitas penyakit yang tinggi.

Keragaan Ketahanan Galur Mutan M₂ Cabai terhadap Infeksi PepYLCV

Keragaan gejala galur-galur mutan M₂ hasil *genome editing* CRISPR/Cas9 yang diinokulasi dengan PepYLCV menunjukkan adanya perbedaan fenotipe ketahanan. Dari empat galur M₂ dengan total 60 individu tanaman yang diuji, ada yang terinfeksi sangat parah hingga tidak menghasilkan buah. Terdapat juga perbedaan masa inkubasi virus pada galur M₂ uji yang ditunjukkan dengan adanya masa inkubasi yang bervariasi. Masa inkubasi pada individu tanaman, yaitu galur L84-2 dan L84-23 mulai bergejala sejak 12 hari setelah inkubasi (HSI) sampai dengan 35 HSI, sedangkan galur C47-7 dan L120-19 mulai bergejala sejak 10 HSI sampai dengan 42 HSI (Tabel 1). Faizah (2010) melaporkan bahwa masa inkubasi PepYLCV pada cabai dimulai sejak 11 HSI sampai dengan 51 HSI.

Galur M₂ uji pada penelitian ini dapat dikelompokkan menjadi dua kategori ketahanan berdasarkan



Gambar 1. Tanaman cabai yang terinfeksi PepYLCV yang digunakan sebagai sumber inokulum untuk akuisisi serangga vektor kutu kebul yang diinfestasikan pada galur M₂ cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9.

Tabel 1. Masa inkubasi PepYLCV pada galur M₂ cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9.

Galur M ₂ /varietas	Masa inkubasi (HSI)
C47-7	10–42
L84-2	12–35
L84-23	12–35
L120-19	10–42
Ciko	7–28
Lingga	7–28

HSI = hari setelah inkubasi.

hasil uji tingkat ketahanannya terhadap PepYLCV, yaitu galur rentan dan galur sangat rentan (Tabel 2). Galur L84-2 dan L84-23 dikategorikan ke dalam kelompok rentan masing-masing dengan insiden penyakit sebesar 26,67% dan 40,00%, dan keparahan penyakit 26,67% dan 34,67%. Sementara, galur C47-7 dan L120-19 dikategorikan ke dalam kelompok sangat rentan masing-masing dengan insiden penyakit sebesar 53,33% dan 46,67%, dan keparahan penyakit 50,13% dan 45,12% (Tabel 2).

Diperoleh sebanyak 35 individu tanaman dari keempat galur mutan yang termasuk kategori tahan,

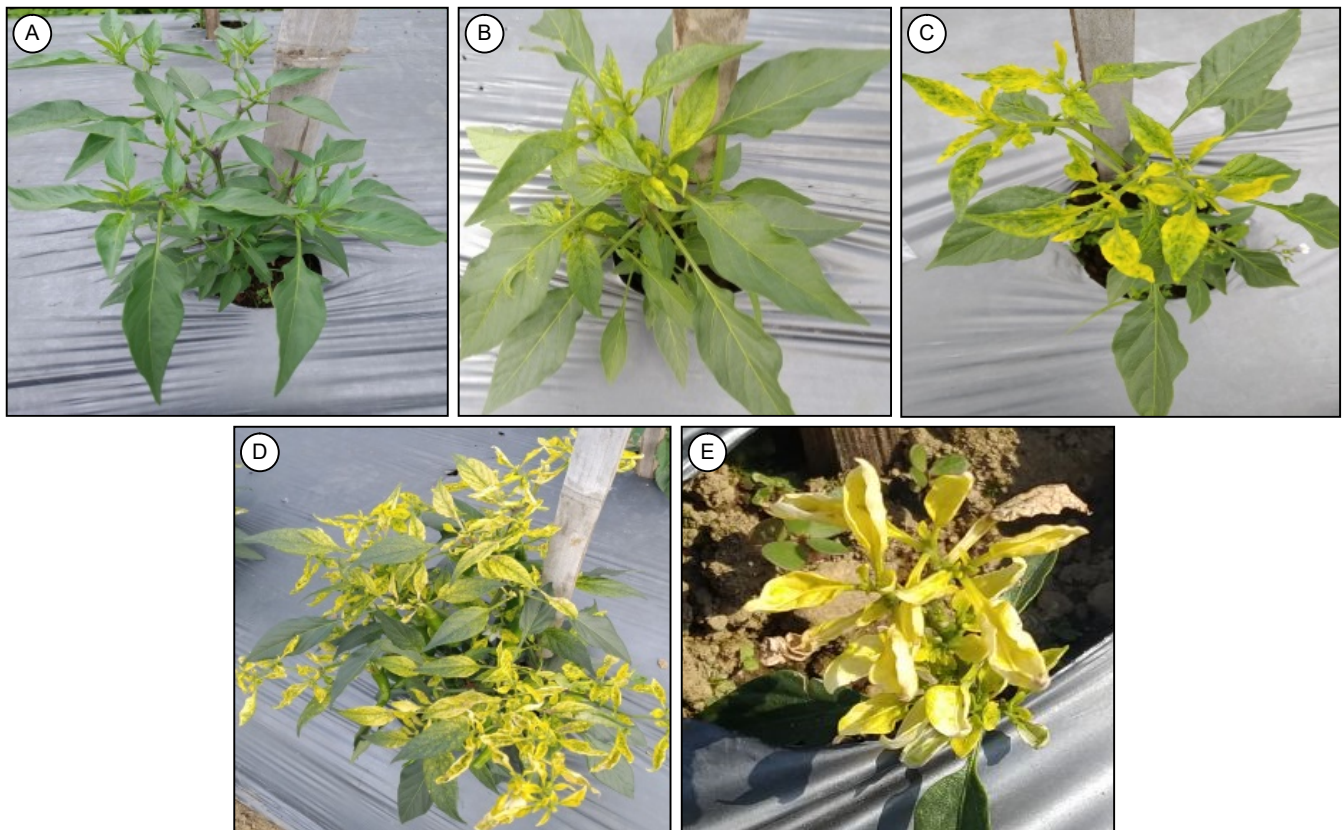
terdiri atas 7 tanaman dari galur C47-7, 11 tanaman dari galur L84-2, 9 tanaman dari galur L84-23, dan 8 tanaman dari galur L120-19 (Tabel 3). Galur L84-2 menunjukkan ketahanan terbaik dibanding dengan galur uji lainnya.

Tanaman yang rentan terhadap infeksi PepYLCV menunjukkan gejala berupa penguningan daun, keriting, melengkung ke atas, dan gejala kekerdilan (Gambar 2). Adanya variasi ketahanan yang cukup tinggi pada galur M₂ yang ditunjukkan oleh sebagian tanaman rentan terhadap PepYLCV dan sebagian lainnya tahan terhadap serangan virus tersebut

Tabel 2. Karakteristik gejala, intensitas penyakit, dan respons ketahanan empat galur M₂ cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9 yang diinokulasi PepYLCV.

Galur	JTB	JTT	RMI	RSG	IP	KP
C47-7	8	15	17,00	2,13	53,33	50,13
L84-2	4	15	22,50	0,86	26,67	26,67
L84-23	6	15	19,00	1,20	40,00	34,67
L120-19	7	15	21,67	2,60	46,67	45,12

JTB = jumlah tanaman bergejala, JTT = jumlah tanaman total, RMI = rata-rata masa inkubasi (hari), RSG = rata-rata skor gejala, IP = insiden penyakit (%), KP = keparahan penyakit (%) yang dikategorikan imun jika KP = 0%, tahan jika 0 < KP ≤ 5%, agak tahan jika 5% < KP ≤ 10%, agak rentan jika 10% < KP ≤ 20%, rentan jika 20% < KP ≤ 40%, dan sangat rentan jika KP ≥ 40% (Ganefianti et al. 2008).



Gambar 2. Keragaan keparahan infeksi PepYLCV berdasarkan nilai skor gejala serangan pada tanaman cabai. A = skor 0 (tanpa gejala), B = skor 1, C = skor 2, D = skor 3, E = skor 5.

Tabel 3. Deteksi 35 tanaman dari empat galur mutan M_2 cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9 yang tahan terhadap infeksi PepYLCV menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik K1 dan H1.

Kode tanaman	Gejala terinfeksi PepYLCV	Hasil PCR	Tipe ketahanan
C47-7.19	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.20	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.11	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.12	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.16	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.17	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
C47-7.6	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.2	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.17	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.8	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.5	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.6	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.11	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.12	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.13	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.15	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.19	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-2.20	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.1	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.2	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.4	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.7	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.8	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.9	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.11	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.14	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L84-23.15	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.3	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.7	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.8	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.9	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.15	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.16	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.17	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
L120-19.18	Tidak bergejala	Negatif	Tahan
Lingga (+)	Bergejala	Positif	Tidak tahan
Lingga (-)	Tidak bergejala	Negatif	-
Ciko (+)	Bergejala	Positif	Tidak tahan
Ciko (-)	Tidak bergejala	Negatif	-

(+) = kontrol positif (dengan inokulasi virus), (-) = kontrol negatif (tanpa inokulasi virus).

mengindikasikan terjadinya segregasi genetik yang masih tinggi di antara individu galur uji. Tanaman rentan kemungkinan tidak membawa alel mutan gen *PCNA* sehingga memiliki fenotipe ketahanan seperti tetua tipe liarnya. Sementara itu, tanaman yang lebih tahan dengan keragaan fenotipe ketahanan kemungkinan memiliki gen *PCNA* yang termutasi sehingga menunjukkan fenotipe lebih tahan terhadap infeksi virus tersebut. Diperolehnya sebanyak 35 tanaman tahan PepYLCV pada empat galur mutan M_2 uji menunjukkan bahwa ketahanan cabai terhadap PepYLCV dapat ditingkatkan melalui metode *genome editing* dengan CRISPR/Cas9 dan target mutasi gen *PCNA*.

Gejala penyakit yang dihasilkan dari inokulasi melalui penularan virus dengan serangga vektor pada tiap-tiap galur uji beragam. Galur-galur cabai yang

terinfeksi PepYLCV menunjukkan respons yang berbeda-beda mulai dari 1 minggu setelah inkubasi (MSI) (Gambar 2). Galur C47-7 menunjukkan gejala awal berupa daun menguning dan menyebar ke daun di sekitarnya hingga ada yang mengalami pengerdilan. Galur L84-2 menunjukkan respons daun menguning pada tulang daun dan bagian vegetatif muda, sedangkan bentuk daun dan pertumbuhan tanaman cenderung sama dengan tanaman yang tidak terserang. Galur L84-23 menunjukkan gejala daun menguning yang dimulai dari bagian vegetatif tanaman yang masih muda hingga ke bagian daun. Galur L120-19 menunjukkan gejala daun menguning, keriting ke atas, perubahan bentuk daun, dan mengalami hambatan pertumbuhan tanaman. Varietas kontrol Ciko dan Lingga mengalami gejala yang paling parah, yaitu daun menguning, daun mengecil

dan keriting ke atas, serta terjadi penghambatan pertumbuhan tanaman dan tanaman kerdil.

Deteksi PepYLCV Menggunakan PCR

PCR dilakukan dengan dua pasang primer, yaitu SPG1-SPG2 dan K1-H1, untuk memverifikasi keberadaan virus kuning pada galur tanaman uji. Penggunaan pasangan primer SPG1 dan SPG2 menghasilkan amplikon yang berukuran sekitar 900 bp pada semua DNA galur tanaman uji, baik yang termasuk kategori tahan maupun rentan (Gambar 3). Dengan demikian, pasangan primer SPG1 dan SPG2 ini tidak dapat membedakan secara spesifik ketahanan galur tanaman uji terhadap infeksi virus kuning.

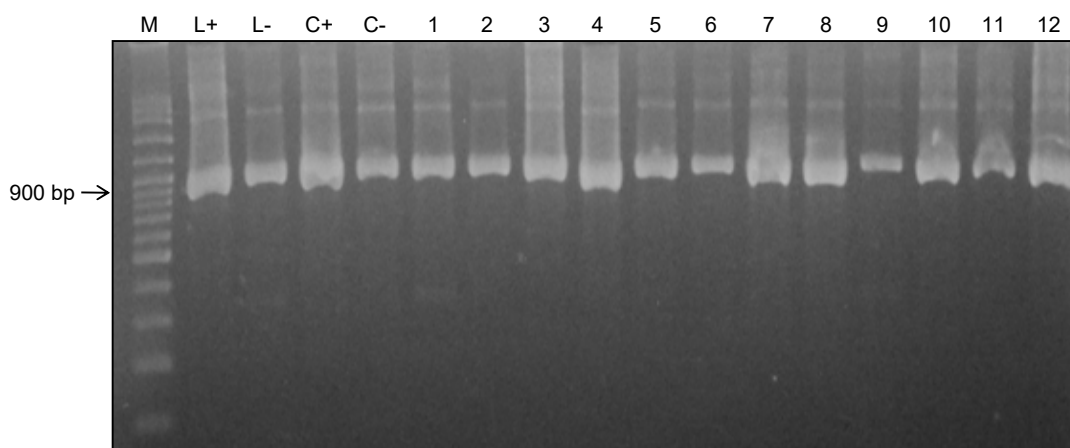
Li et al. (2004) melaporkan bahwa pasangan primer SPG1 dan SPG2 telah digunakan untuk mendeteksi keberadaan virus keriting pada tanaman ubi. Hasil penelitian Li et al. (2004) tersebut juga menunjukkan bahwa pasangan primer tersebut juga dapat mendeteksi virus Gemini yang lain, seperti *Bean golden mosaic virus*, *Cabbage leaf curl virus*, *Tomato yellow leaf curl virus*, *Cotton leaf crumple virus*, dan *Tomato mottle virus*. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pasangan primer SPG1 dan SPG2 tidak dapat digunakan untuk mendeteksi PepYLCV karena baik kontrol positif maupun kontrol negatif menghasilkan pita DNA dengan ukuran sama sekitar 900 bp (Gambar 3).

Berbeda dengan pasangan primer SPG1 dan SPG2, produk PCR menggunakan primer K1 dan H1 hanya menghasilkan pita DNA berukuran sekitar 550

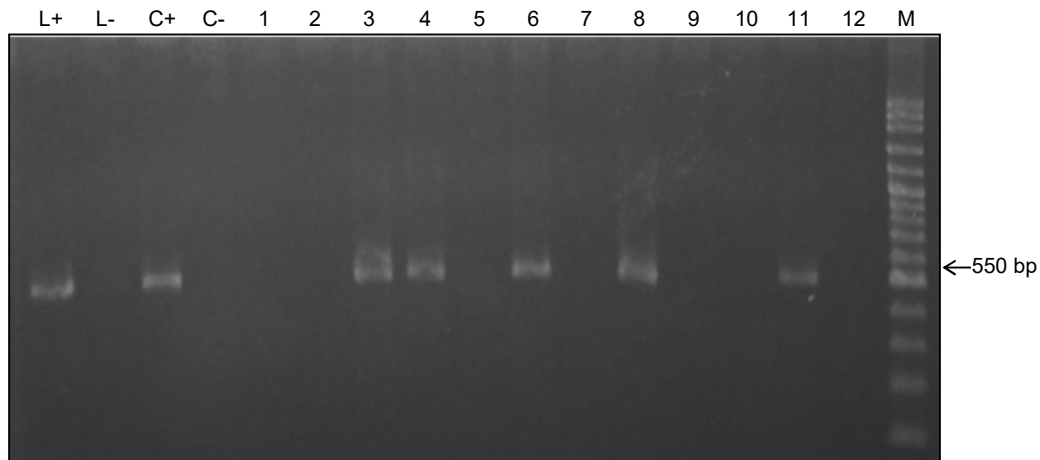
bp pada galur dengan individu tanaman yang menunjukkan adanya gejala serangan PepYLCV, termasuk pada kontrol positif. Galur tahan dengan individu tanaman tanpa gejala penyakit dan kontrol negatif tidak menghasilkan pita DNA tersebut (Gambar 4). Primer K1 dan H1 didesain untuk mengamplifikasi fragmen gen *coat protein* pada *Begomovirus*. Tidak adanya pita DNA menunjukkan bahwa materi genetik dari virus target tidak ada di dalam jaringan tanaman yang disebabkan oleh ketahanan terhadap serangan virus.

Aplikasi teknik PCR untuk memverifikasi ketahanan tanaman terhadap penyakit virus kuning PepYLCV telah berhasil dilakukan dengan menggunakan pasangan primer K1 dan H1. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Subiastuti et al. (2019), penggunaan primer K1 dan H1 pada tanaman melon dan cabai menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran sekitar 550 bp yang hanya teramplifikasi pada tanaman yang terserang virus.

Pada penelitian sebelumnya, Kurniawati et al. (2020) melaporkan bahwa gen penyandi protein PCNA pada cabai telah berhasil dimutasi dan terjadi perubahan urutan asam amino yang mengubah struktur protein dan kemungkinan menyebabkan virus tidak dapat menggunakan protein tersebut dalam bereplikasi di dalam sel tanaman cabai (Kurniawati et al. 2020). Diperolehnya tanaman-tanaman cabai tahan PepYLCV pada galur M₂ uji kemungkinan karena adanya mutasi gen *PCNA*. Mutasi gen *PCNA* pada tanaman-tanaman cabai melalui teknik CRISPR/Cas9 ini perlu diverifikasi



Gambar 3. Produk PCR hasil amplifikasi DNA genomik galur mutan M₂ cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9 dengan menggunakan pasangan primer SPG1 dan SPG2. M = *marker* (1 kb *Plus DNA Ladder*), L+ = varietas Lingga kontrol positif (dengan inokulasi virus), L- = varietas Lingga kontrol negatif (tanpa inokulasi virus), C+ = varietas Ciko kontrol positif (dengan inokulasi virus), C- = varietas Ciko kontrol negatif (tanpa inokulasi virus), 1 = L120-19.1, 2 = L120-19.6, 3 = L120-19.8, 4 = L120-19.16, 5 = L84-23.2, 6 = L84-23.6, 7 = L84-23.14, 8 = L84-23.15, 9 = L84-2.3, 10 = L84-2.2, 11 = L84-2.8, 12 = L84-2.5.



Gambar 4. Produk PCR hasil amplifikasi DNA genomik galur mutan M_2 cabai hasil *genome editing* CRISPR/Cas9 dengan menggunakan pasangan primer K1 dan H1. M = marker (1 kb *Plus DNA Ladder*), L+ = varietas Lingga kontrol positif (dengan inokulasi virus), L- = varietas Lingga kontrol negatif (tanpa inokulasi virus), C+ = varietas Ciko kontrol positif (dengan inokulasi virus), C- = varietas Ciko kontrol negatif (tanpa inokulasi virus), 1 = L84-2.2, 2 = L84-2.8, 3 = L120-19.1, 4 = L120-19.6, 5 = L120-19.8, 6 = L120-19.16, 7 = L84-23.2, 8 = L84-23.6, 9 = L84-23.14, 10 = L84-23.15, 11 = L84-2.3, 12 = L84-2.5.

melalui teknik sekuensing untuk mengonfirmasi bahwa fenotipe ketahanan tersebut karena mutasi pada gen *PCNA*.

KESIMPULAN

Analisis ketahanan 60 individu tanaman dari empat galur mutan CRISPR/Cas9 M_2 cabai terhadap PepYLCV menghasilkan 35 tanaman tahan yang terdiri atas 7 tanaman dari galur C47-7, 11 tanaman dari galur L84-2, 9 tanaman dari galur L84-23, dan 8 tanaman dari galur L120-19. Galur tahan telah diverifikasi secara molekuler dengan teknik PCR menggunakan pasangan primer K1 dan H1 yang mengamplifikasi fragmen gen *coat protein* patogen PepYLCV. Konfirmasi dengan metode sekuensing perlu dilakukan untuk memastikan adanya mutasi gen *PCNA* pada galur-galur M_2 tahan PepYLCV tersebut. Seleksi lebih lanjut perlu dilakukan untuk mendapatkan galur mutan CRISPR/Cas9 yang stabil dan tahan PepYLCV.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai melalui DIPA BB Biogen TA 2019–2020. Kami mengucapkan terima kasih kepada Dr. Tri Joko Santoso yang telah membantu perolehan pendanaan dan ide penelitian ini. Ucapan terima kasih juga kami sampaikan kepada Rahmatan Juhaepa, S.Si. yang telah membantu dalam penyusunan

naskah dan Rohayati, S.P., Feni Siti Ruqoyah, S.Si., Hidayati Nurkhasanah, S.Pd., Muhammad Husni Mubarak, S.Si., dan Machzani Quraitul Aini, S.Si. yang membantu dalam pemeliharaan, penyiapan, dan pengamatan tanaman pada penelitian ini.

KONTRIBUTOR PENULISAN

Semua penulis memberikan kontribusi yang sama dalam penulisan manuskrip ini. WMP: kontributor utama, melakukan penelitian, mengumpulkan data, menganalisis data, dan menulis manuskrip. TH: kontributor utama, supervisi penelitian, menulis manuskrip, analisis data, dan menyelesaikan manuskrip. WE: kontributor utama, mendesain penelitian, dan supervisi penelitian. AP: kontributor utama, melakukan penelitian, dan analisis data. S: kontributor utama, supervisi penelitian, dan interpretasi data.

DAFTAR PUSTAKA

- Adilah, N. & Hidayat, S.H. (2014) Keparahan penyakit daun keriting kuning dan pertumbuhan populasi kutukebul pada beberapa genotipe cabai. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 10 (6), 195–201.
- Ariyanti, N.A. (2011) Mekanisme infeksi virus kuning cabai (*Pepper yellow leaf curl virus*) dan pengaruhnya terhadap proses fisiologi tanaman cabai. Dalam: *Seminar Nasional VIII Biologi, Sains, Lingkungan, dan Pembelajarannya dalam Upaya Peningkatan Daya Saing Bangsa*. Surakarta, 16 Juli 2011. Surakarta, Program Studi Pendidikan Biologi, FKIP, UNS. hlm. 682–686.

- Arpiyadi, A.R., Wahyuni, W.S. & Supartini, V. (2013) Pengendalian penyakit patik (*Cercospora nicotianae*) pada tembakau Na Oogst secara *in vivo* dengan ekstrak daun gulma kipahit (*Tithonia diversifolia*). *Berkala Ilmiah Pertanian*, 1 (2), 30–32.
- Brown, J.K., Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Zerbini, F.M., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. (2012) Family *Geminiviridae*. Dalam: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. & Lekowitz, E.J. (editor) *Virus taxonomy - ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London, Waltham, San Diego, Associated Press, Elsevier, hlm. 351–373.
- Fadhila, C., Lal, A., Vo, T.T.B., Ho, P.T., Hidayat, S.H., Lee, J., Kil, E.J. & Lee, S. (2020) The threat of seed-transmissible *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* in chili pepper. *Microbial Pathogenesis*. [Online] 143, 104132. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104132> [Diakses 5 Desember 2019].
- Faizah, R. (2010) *Karakterisasi beberapa genotipe cabai (Capsicum spp.) dan mekanisme ketahanannya terhadap begomovirus penyebab penyakit daun keriting kuning*. Tesis S2, Institut Pertanian Bogor.
- Ganefianti, D.W., Sujiprihati, S., Hidayat, S.H. & Syukur, M. (2008) Metode penularan dan uji ketahanan genotipe cabai terhadap *begomovirus*. *Jurnal Akta Agrosia*, 11 (2), 162–169.
- Hannum, S., Aceh, R.M. & Elimasni (2019) *Begomovirus* detection on diseased chili plant (*Capsicum annum* L.) in Tanah Karo North Sumatera with PCR techniques. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. [Online] 305, 012057. Tersedia pada: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/305/1/012057/pdf> [Diakses 5 Desember 2019].
- Hermawan, A., Setyanto, P., Malik, A., Rifai, A. & Kurnianto, H. (2016) *Teori, strategi, dan implementasi pendampingan progam peningkatan produksi pangan*. [e-book] Jakarta, IAARD Press. Tersedia pada: <http://repository.pertanian.go.id/handle/123456789/9538> [Diakses 20 Juni 2020].
- Kandito, A., Hartono, S., Sulandari, S., Somowiyarjo, S. & Widayari, Y.A. (2020) First report of naturally occurring recombinant non-coding DNA satellite associated with *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* on eggplant in Indonesia. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 21 (1), 129–136.
- Kementerian Pertanian (2018) *Outlook komoditas pertanian subsektor hortikultura: Cabai merah*. [Online] Tersedia pada: <http://epublikasi.setjen.pertanian.go.id/arsip-outlook/76-outlook-hortikultura> [Diakses 5 Desember 2019].
- Kurniawati, D.A., Suharsono & Santoso, T.J. (2020) Pengeditan gen *PCNA* dengan teknologi CRISPR/Cas9 untuk perbaikan ketahanan tanaman cabai terhadap penyakit daun keriting kuning. *Jurnal AgroBiogen*, 16 (2), 79–88.
- Li, R., Salih, S. & Hurtt, S. (2004) Detection of geminiviruses in sweetpotato by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 88 (12), 1347–1351.
- Maguire, T.L., Collins, G.G. & Sedgley, M. (1994) A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 12 (2), 106–109.
- Maule, A.J., Caranta, C. & Boulton, M.I. (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 8, 223–231.
- Revill, P.A., Ha, C.V., Porchun, S.C., Vu, M.T. & Dale, J. (2003) The complete nucleotide sequence of two distinct geminiviruses infecting cucurbits in Vietnam. *Archives of Virology*. [Online] 148 (8), 1523–1541. Tersedia pada: <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0109-6> [Diakses 5 Desember 2019].
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L., Rusel, D.R. & Maxwell, D.P. (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of Plant Diseases*, 77, 477–485.
- Rusli, E.S., Hidayat, S.H., Suseno, R. & Tjahjono, B. (1999) Virus gemini pada cabai: Variasi gejala dan studi cara penularan. *Buletin Hama dan Penyakit Tumbuhan*, 11 (1), 26–31.
- Setiawati, W., Udiarto, B.K. & Soetiarso, T.A. (2008) Pengaruh varietas dan sistem tanam cabai merah terhadap penekanan populasi hama kutu kebul. *Jurnal Hortikultura*, 18 (1), 55–61.
- Subiastuti, A.S., Hartono, S. & Daryono, B.S. (2019) Detection and identification of begomovirus infecting Cucurbitaceae and Solanaceae in Yogyakarta, Indonesia. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*, 20 (3), 738–744.
- Sukada, I.W., Sudana, I.M., Nyana, I.D.N., Suastika, G. & Siadi, K. (2014) Pengaruh infeksi beberapa jenis virus terhadap penurunan hasil pada tanaman cabai rawit (*Capsicum frutescens* L.). *Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. [Online] 3 (3), 158–165. Tersedia pada: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/JAT/article/view/9610> [Diakses 20 Juni 2020].
- Sulandari, S. (2004) *Karakterisasi biologi, serologi dan analisis sidik jari DNA virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai*. Disertasi S3, Institut Pertanian Bogor.
- Sulandari, S., Suseno, R., Hidayat, S.H., Harjosudarmo, J. & Sosromarsono, S. (2006) Deteksi dan kajian kisaran inang virus penyebab penyakit daun keriting kuning cabai. *HAYATI Journal of Biosciences*, 13 (1), 1–6.
- Trisno, J., Hidayat, S.H., Habazar, T., Manti, I. & Jamsari (2009) Detection and sequence diversity of begomovirus associated with yellow leaf curl disease of pepper (*Capsicum annum*) in West Sumatra, Indonesia. *Microbiology Indonesia*, 3 (2), 56–61.

Udiarto, B.K., Hidayat, P., Rauf, A., Pudjianto & Hidayat, S.H. (2012) Kajian potensi predator Coccinellidae untuk pengendalian *Bemisia tabaci* (Gennadius) pada cabai merah. *Jurnal Hortikultura*, 22 (1), 76–84.

Yusnita, S. & Sudarsono (2004) Metode inokulasi dan reaksi ketahanan 30 genotipe kacang tanah terhadap penyakit busuk batang *Sclerotium*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 11, 53–58.
