



**PERBANDINGAN KETAHANAN TEBU TRANSGENIK BERBASIS  
TEKNIK *Pathogen Derived Resistance* (PDR) DAN RNA  
*interference* (RNAi) TERHADAP SERANGAN  
*Sugarcane mosaic virus* (SCMV)**

TESIS

Oleh

**Weny Nailul Hidayati**

**NIM 172520101005**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI  
PASCASARJANA UNIVERSITAS JEMBER**

**2021**



**PERBANDINGAN KETAHANAN TEBU TRANSGENIK BERBASIS  
TEKNIK *Pathogen Derived Resistance* (PDR) DAN RNA  
*interference* (RNAi) TERHADAP SERANGAN  
*Sugarcane mosaic virus* (SCMV)**

**TESIS**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Magister Bioteknologi (S2)  
dan mencapai gelar Magister Bioteknologi

Oleh

**Weny Nailul Hidayati**

**NIM 172520101005**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI  
PASCASARJANA UNIVERSITAS JEMBER**

**2021**

## PERSEMBAHAN

Dengan menyebut nama Allah SWT Yang Maha Pengasih dan Penyayang, saya persembahkan tesis ini kepada:

1. Bapak Noto Sumarno dan Ibu Musaadah atas dukungan moral dan material;
2. Keluarga besar serta sahabat-sahabat yang telah begitu banyak memberikan dukungan dalam menuntut ilmu;
4. Para guru sejak Taman Kanak-Kanak sampai Perguruan Tinggi yang telah mendidik, membimbing dengan penuh ikhlas dan sabar, terima kasih atas ilmu yang telah diberikan;
5. Almamater Universitas Jember.

**MOTO**

Raihlah ilmu, dan untuk meraih ilmu belajarlah untuk tenang dan sabar.

(Umar bin Khatab)

“Barangsiapa bersungguh-sungguh, sesungguhnya kesungguhannya itu adalah  
untuk dirinya sendiri.”

(Terjemahan QS Al-Ankabut Ayat 6)<sup>\*)</sup>

---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2010. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Bandung: Penerbit Jabal.

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Weny Nailul Hidayati

NIM : 172520101005

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Perbandingan ketahanan tebu transgenik berbasis teknik *pathogen-derived resistance* dan *RNA interference* terhadap serangan *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi. Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 13 Juli 2021

Yang menyatakan,

Weny Nailul Hidayati

NIM 172520101005

**TESIS**

**PERBANDINGAN KETAHANAN TEBU TRANSGENIK BERBASIS TEKNIK  
*Pathogen Derived Resistance (PDR)* DAN *RNA interference (RNAi)* TERHADAP  
SERANGAN *Sugarcane mosaic virus (SCMV)***

Oleh

Weny Nailul Hidayati

NIM 172520101005

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M. Agr,Sc

Dosen Pembimbing Anggota : Hardian Susilo Addy, S.P., M.P.,Ph.D

**PENGESAHAN**

Tesis berjudul "Perbandingan ketahanan tebu transgenik berbasis teknik *pathogen-derived resistance* dan *RNA interference* terhadap serangan *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)" karya Weny Nailul Hidayati telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal :

tempat : Pascasarjana Universitas Jember.

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Sc

NIP. 195510221982121001

Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D

NIP. 198011092005011001

Dosen penguji I,

Dosen penguji II,

Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D.

NIP. 195212171980032001

Widhi Dyah Sawitri S.Si., M.Agr., Ph. D

NIP. 198601302019032012

Mengesahkan  
Wakil Direktur I,

Dr. Ir. Sugeng Winarso, M.Si

NIP. 196403221989031001



## RINGKASAN

**Perbandingan Ketahanan Tebu Transgenik Berbasis Teknik *pathogen-derived resistance* Dan RNA *Interference* Terhadap Serangan *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV); Weny Nailul Hidayati,172520101005; 2021: 45 halaman; Program Studi Magister Bioteknologi Universitas Jember.**

*Sugarcane mosaic virus* (SCMV) merupakan penyebab penurunan produktivitas dan pertumbuhan tebu di Indonesia. ketahanan tanaman tebu terhadap serangan virus dapat dilakukan melalui transformasi genetik menggunakan teknik pendekatan *pathogen-derived resistance* dan RNA *interference*. Tebu transgenik PDR dan RNAi telah diperoleh dari penelitian sebelumnya yang mengkode gen *coat protein* (Cp) dari SCMV untuk ketahanan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membandingkan kedua jenis tanaman transgenik melalui uji tular. Konfirmasi keberadaan gen target Cp menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR) berukuran  $\pm 702$  bp. Hasil pengamatan kemunculan gejala menunjukkan bahwa gejala tampak pada transgenik PDR di 21 hari setelah inokulasi, sedangkan transgenik RNAi tampak pada 26 hari setelah inokulasi. Persentase tanaman transgenik yang terinfeksi yaitu 77% pada transgenik PDR dan 50% pada transgenik RNAi. Analisis molekuler digunakan untuk validasi hasil dari pengamatan visual meliputi RT-PCR dan western blot. Analisis RT-PCR menggunakan konfirmasi gen *nuclear inclusion b* (*Nib*) untuk amplifikasi RNA virus yang menginfeksi tanaman dengan ukuran pita cDNA  $\pm 483$  bp. Gejala tampak pada daun tebu kemudian dianalisis dengan *western blot* untuk melihat ekspresi protein dengan ditunjukkan keberadaan pita protein berukuran  $\pm 37$  kDa. Berdasarkan data pengamatan visual dan data analisis molekuler dinyatakan telah sesuai. Sehingga, dari hasil pengamatan pola sebaran mosaik dan masa inkubasi virus setelah uji tular dapat disimpulkan bahwa tebu transgenik RNAi lebih tahan dibandingkan transgenik PDR.

Kata kunci: *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *pathogen-derived resistance*, RNA *interferenc*, resistensi virus, tebu transgenik



**SUMMARY**

**Disthinguishing Resistances of Transgenic Sugarcane Generated from RNA Interference and Pathogen-Derived Resistance Approaches to Combating *Sugarcane mosaik virus***; Weny Nailul Hidayati, 172520101005; 2021: 45 pages; Magister Program for Biotechnology, Jember University.

Sugarcane mosaic virus (SCMV) is a causative agent that reduces growth and productivity in sugarcane. Pathogen-derived resistance (PDR) and RNA interference (RNAi) are the most common approaches to generating resistance against plant viruses. Two types of transgenic sugarcane have been obtained by PDR and RNAi methods using a gene-encoding coat protein (CP) of SCMV (SCMVCp). This research aimed to distinguish resistance of the two transgenic sugarcanes in combating SCMV through artificial viral inoculation. The experiment was conducted using transgenic sugarcane lines validated by PCR analysis. Insertion of gene-encoding CP in the transgenic lines was confirmed by amplification of 702 bp of DNA fragment of SCMVCp. After viral inoculation, mosaic symptoms appeared earlier, at 21 days post inoculation (dpi) in PDR transgenic lines, but was at 26 dpi in RNAi transgenic lines. Symptom observation showed that 77.8% and 50% of the inoculated plants developed mosaic symptoms in PDR and RNAi transgenic lines, respectively. RT-PCR analysis revealed that the nuclear inclusion protein b (Nib) gene of SCMV was amplified in the symptomatic leaves in plants classified as susceptible lines. Immunoblot analysis confirmed presence of viral CP with a molecular size of 37 kDa in the susceptible lines. Collectively, these results indicated that the RNAi approach targeting the gene for CP effectively produces more resistance against the SCMV infection in transgenic sugarcane compared to the PDR approach.

**KEYWORDS:** Sugarcane mosaic virus (SCMV); pathogen-derived resistance; RNA interference; viral resistance; transgenic sugarcane

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “Perbandingan Ketahanan Tebu Transgenik Berbasis Teknik *pathogen-derived resistance* Dan RNA *Interference* Terhadap Serangan *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV). Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Program Studi Magister Bioteknologi, Pascasarjana Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto M.Agr.Sc selaku Dosen Pembimbing Utama dan Hardian Susilo Addy, S.P.,M.P.,Ph.D selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan pengarahan, bimbingan, dan motivasi kepada penulis selama melakukan penelitian
2. Laboratorium *Center for Development of Advanced Science and Technology* (CDAST), Universitas Jember yang memberikan dukungan fasilitas penelitian
3. Bapak Noto Sumarno dan Ibu Musa'adah selaku orang tua yang telah memberikan dorongan dan do'anya demi terselesaikannya tesis ini
4. Ibu Kasminah dan Bapak Saeri, terima kasih telah mendidik sejak kecil dengan ketulusan
5. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan karya ilmiah tertulis ini masih banyak kekurangan, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Semoga karya ilmiah tertulis ini dapat memberikan manfaat.

Jember, 08 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL .....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iii
HALAMAN MOTO .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN .....	viii
SUMMARY.....	ix
PRAKATA .....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL .....	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
<b>BAB 1. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Latar Belakang .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Tujuan Penelitian .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Rumusan Masalah.....</b>	<b>2</b>
<b>1.4 Manfaat Penelitian .....</b>	<b>2</b>
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Profil <i>Sugarcane mosaic virus</i> (SCMV) .....</b>	<b>2</b>
<b>2.2 Mekanisme <i>pathogen-derived resistance</i> (PDR) .....</b>	<b>5</b>
<b>2.3 Mekanisme RNA <i>interference</i> (RNAi) .....</b>	<b>6</b>
<b>2.4 Pengamatan Gejala Mosaik.....</b>	<b>8</b>
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>4</b>
<b>3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2 Rancangan Penelitian.....</b>	<b>4</b>
<b>3.3 Jenis dan Sumber Data .....</b>	<b>10</b>

<b>3.4 Kerangka Pemecahan Masalah</b> .....	10
3.4.2 Uji Tular .....	11
3.4.3 Analisis Ekspresi .....	12
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	11
<b>4.1 Hasil penelitian</b> .....	11
4.1.1 Konfirmasi tebu transgenik .....	11
4.1.4 Analisis ekspresi protein menggunakan western blot .....	20
4.1.5 Analisis <i>Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	22
<b>4.2 Pembahasan</b> .....	23
<b>BAB 5. KESIMPULAN</b> .....	27
<b>5.1 Kesimpulan</b> .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	27

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
Tabel 4. 1 Pengamatan gejala setelah infeksi virus.....	19



**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
Gambar 2. 1 Struktur genom dari potyvirus.....	2
Gambar 2. 2 Mekanisme infeksi RNA virus pada sel tanaman .....	5
Gambar 2. 3 Skema pembungkaman gen melalui strategi RNAi .....	7
Gambar 2. 4 Persen skala gejala pada area daun yang terinfeksi.....	8
Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian ketahanan tebu transgenik .....	4
Gambar 3. 2 skema kerangka pemecahan masalah .....	10
Gambar 4. 1 Analisis (PCR) tanaman transgenik. ....	17
Gambar 4. 2 Pola sebaran gejala mosaik setelah infeksi .....	20
Gambar 4. 3 Analisis ekspresi protein CP-SCMV .....	21
Gambar 4. 4 Amplifikasi cDNA virus .....	23



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Sugarcane mosaic virus* (SCMV) termasuk dalam kelompok *Potyvirus* yang dapat menyerang tanaman monokotil terutama pada jagung dan tebu. Tebu menjadi komoditas penting di Indonesia karena tanaman ini memiliki potensi di bidang industri sebagai penghasil gula, produksi bioetanol, industrial enzim, dan pakan ternak serta bernilai ekonomi tinggi (Sulaiman et al. 2019). Dampak dari infeksi SCMV dapat mengurangi jumlah ruas, berat batang dan klorosis pada daun, sehingga dapat menurunkan produktivitas tebu hingga mencapai 50%. Gejala infeksi SCMV ditandai dengan warna kekuning-kuningan pada helaian daun, sehingga secara signifikan dapat menurunkan laju fotosintesis, laju transpirasi, kandungan klorofil, dan konduktansi stomata (Akbar et al. 2020).

Pendekatan bioteknologi tanaman digunakan sebagai suatu cara mengatasi infeksi SCMV melalui transformasi genetik pada tanaman tebu. Teknik transformasi menggunakan vektor *Agrobacterium tumefaciens* dinilai memiliki efisiensi transformasi yang lebih tinggi dan dapat dilakukan dengan peralatan laboratorium yang sederhana. Pemanfaatan bioteknologi tanaman mempunyai keuntungan antara lain dapat mengurangi biaya produksi dan dapat mengurangi polusi lingkungan yang disebabkan oleh penggunaan pestisida dan herbisida (Singh et al, 2013).

Metode resistensi virus pertama kali dipublikasi yaitu *Pathogen Derived Resistance* (PDR) yang telah berhasil dilakukan untuk ketahanan pada tembakau terhadap *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Lindbo and Dougherty 1992). Konsep pertahanan pada tanaman transgenik PDR yaitu dengan menggunakan ekspresi sekuens nukleotida *coat protein* (CP) untuk menimbulkan resistensi terhadap infeksi virus (Sharma and Purohit 2020). Kemudian metode resistensi RNAi berkembang dengan konsep yang menjelaskan proses ketika *double strand RNA* (dsRNA), paling umum dikenal sebagai *small-interering RNA* (siRNA) dapat



menyebabkan pembungkaman mRNA target yang se-homolog. siRNA akan bertemu dengan protein RISC (*RNA induced silencing complex*) yang mengatur hibridisasi urutan *antisense* siRNA ke urutan target komplementernya dan membungkam proses mRNA target (Guo et al. 2015). Resistensi menggunakan RNAi telah berhasil diaplikasikan pada tomat transgenik untuk melawan *Tomatto yellow leaf curl virus-Oman* (TYLCV-OM) (Ammara et al. 2015). Oleh karena itu, pada penelitian ini dibandingkan antara kedua metode resistensi tersebut untuk mendapatkan strategi pertahanan dengan kemampuan lebih baik dalam menghambat infeksi virus SCMV pada tebu transgenik.

## 1.2 Tujuan Penelitian

Uji ketahanan tebu transgenik dengan metode *Pathogen Derived Resistance* (PDR) dan *RNA interference* (RNAi) untuk mendapatkan metode terbaik dalam menghambat infeksi *Sugarcane mosaic virus* (SCMV).

## 1.3 Rumusan Masalah

Tebu transgenik PDR dan RNAi memiliki perbedaan strategi pertahanan dalam menghambat infeksi SCMV. Sehingga, dapat ditentukan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimanakah respon tanaman transgenik PDR dan RNAi terhadap infeksi SCMV melalui uji tular?
2. Apakah terdapat hubungan antara gejala mosaik dengan analisis molekuler yang meliputi analisis ekspresi gen dan protein SCMV?

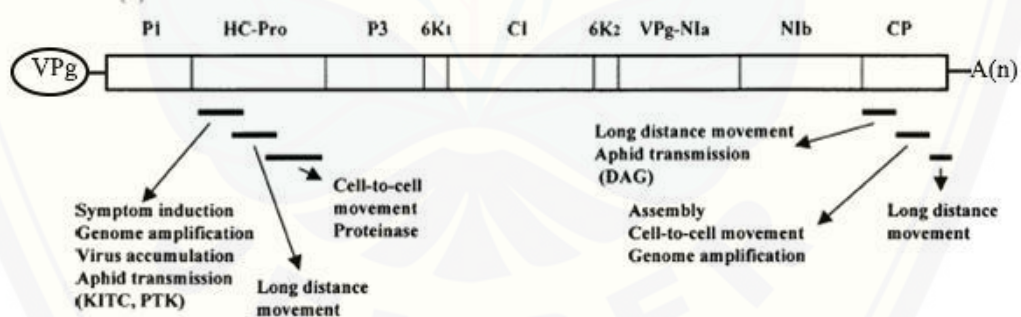
## 1.4 Manfaat Penelitian

Pada penelitian ini, kajian mengenai perbandingan antara strategi ketahanan tebu transgenik PDR dan RNAi diharapkan dapat memberi kontribusi dibidang ilmu pengetahuan dan sebagai sumber referensi untuk penelitian selanjutnya.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Profil *Sugarcane mosaic virus* (SCMV)

*Sugarcane mosaic virus* (SCMV) termasuk dalam kelompok genus *Potyvirus* yang dapat menginfeksi tanaman seperti jagung, sorgum, tebu dan tanaman *Poaceae* lainnya. *Potyvirus* merupakan kelompok virus yang genomnya adalah positif *single-strand* RNA (+ssRNA), dengan struktur genom sederhana yang mengkode 10 macam protein antara lain *first protein* (P1), *helper component protein* (HC-pro), *third protein* (P3), *first 6K protein* (6K1), *cylindrical inclusion protein* (CI), *second 6K protein* (6K2), *viral genome-linked* (VPg), *nuclear inclusion a protein* (NIa), *nuclear inclusion b protein* (NIb), dan *Coat protein* (CP) (Guo et al. 2015). Peran protein tersebut digunakan untuk replikasi RNA, perakitan partikel virus dan transmisi potyvirus oleh vektor serangga (Hong et al. 1995).

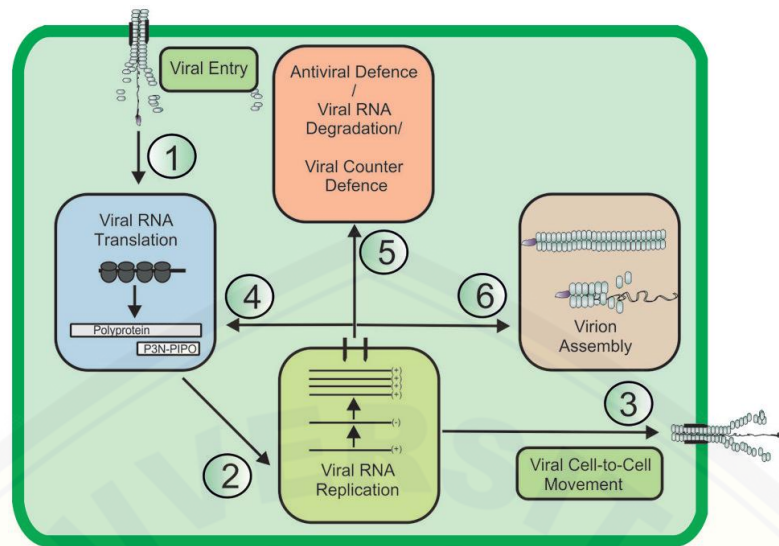


Gambar 2. 1 Struktur genom dari potyvirus (Andrejeva et al. 1999)

Serangga *Aphids* sp. merupakan vektor penyebaran virus Scmv dari tanaman terinfeksi ke tanaman lainnya menggunakan mulut styletnya untuk menusuk ke jaringan tanaman. Transmisi virus tanaman oleh serangga dikategorikan menjadi empat tipe berdasarkan lokalisasi virus pada vektor yaitu non-persisten, semi-persisten, persisten sirkulatif dan persisten propagatif. Penyebaran dari *Potyvirus*

umum terjadi secara non-persisten yang penularannya dalam waktu beberapa detik hingga menit menggunakan stylet Aphids. Peran protein CP dan Hc-Pro sebagai media transmisi karena berikatan langsung dengan reseptor pada stylet Aphids (Gadhawe et al. 2020). Telah diketahui terdapat tiga pasang asam amino *Aspartic-Alanin-Glycine* (DAG) yang merupakan daerah konservatif berada di dekat N-terminal dan berperan dalam proses transmisi oleh Aphid (Atreya, 1995).

Replikasi *Potyvirus* dipermanenkan oleh protein 6K yang menginduksi pembentukan membran-vesikel pada retikulum endoplasma (RE). Lokalisasi vesikel-6K dari RE ke kloroplas pada sel yang terinfeksi virus untuk proses replikasi genom. *Virus replication complex* (VRCs) melibatkan gen NIa, 6K-NIa, NIb, CI yang berasosiasi dengan vesikel-6K didalam kloroplas selama proses infeksi virus (Wei et al. 2010). Pada tahap infeksi selanjutnya, VRC menyatu dengan kloroplas mulai berkumpul menjadi struktur tubular. Akhirnya, struktur globular yang mengandung VRC, kloroplas, dan penanda RE dan Golgi muncul di area perinuklear sel yang terinfeksi (Grangeon et al. 2013). Enkapsidasi RNA potyvirus melibatkan *viral protein-genome* (VPg) yang diperlukan untuk melindungi vRNA selama proses pembongkaran atau pada saat translasi polisom dan mengamankan secara efisien produksi *coat protein* (CP) untuk pembentukan virion (Eskelin et al. 2011). Plasmodesmata adalah saluran yang menghubungkan sitoplasma dan RE dari dua sel yang berdekatan. Virus tumbuhan memanfaatkan saluran ini dalam pergerakan dari sel-ke-sel untuk infeksi. Potyvirus menyandikan beberapa protein, yang berperan langsung dalam pergerakan yaitu P3N-PIPO, CI, dan CP (Mäkinen and Hafrén 2014).



Gambar 2. 2 Mekanisme infeksi RNA virus pada sel tanaman. (1) Di sel yang baru terinfeksi, polisom menerjemahkan RNA virus (vRNA), (2) dan direkrut ke VRCs. (3) vRNA yang direplikasi diangkut ke plasmodesmata untuk memfasilitasi pergerakan sel ke sel. (4) Untuk mencapai infeksi produktif, ekspresi vRNA berlanjut melalui jalur translasi/replikasi baru. (5) Mekanisme pertahanan sel inang yang menyebabkan degradasi RNA secara aktif bersaing dengan substrat vRNA melalui mekanisme pertahanan melawan virus. (6) Enkapsidasi vRNA melengkapi siklus infeksi, memungkinkan virus yang dienkapsidasi diangkut dan menginfeksi tanaman sehat di sekitarnya (Mäkinen and Hafrén 2014)

## 2.2 Mekanisme *pathogen-derived resistance* (PDR) pada Tanaman Transgenik

*Pathogen-derived resistance* (PDR) adalah teori yang menjelaskan bahwa hubungan normal antara inang dan pathogen dapat dikacaukan jika inang mengekspresikan gen turunan yang resisten terhadap pathogen. Tanaman transgenik yang mengekspresikan *coat protein* (CP) dapat menjadi resisten terhadap infeksi virus yang se-homolog dengan mengganggu siklus replikasi (Lindbo dan Dougherty, 1992).

PDR atau *protein-mediated resistance* memiliki mekanisme pertahanan pada tanaman transgenik dengan mencegah infeksi virus dari saat proses penguraian di tahap co-translasi yang merupakan fase awal dari infeksi. partikel virus terurai dimulai dari bagian ujung 5' RNA virus. Sehingga, ribosom



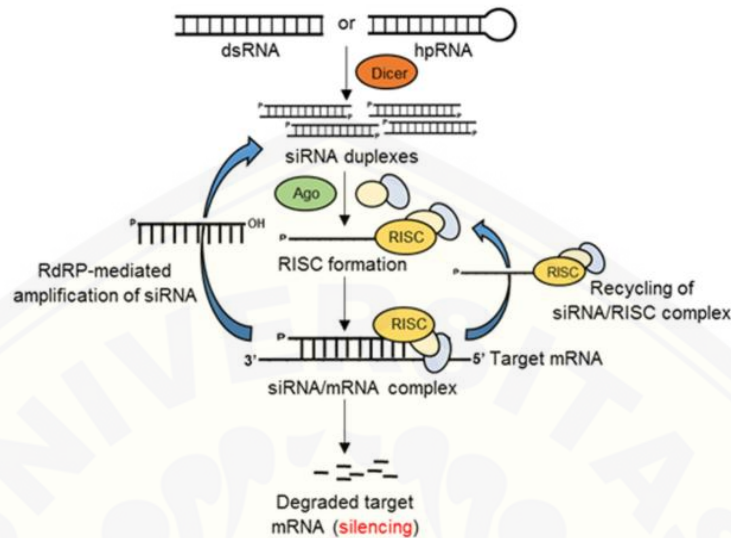
dapat menempel di *coat protein* (CP) untuk memulai translasi di *open reading frame* (ORF). Hal ini menunjukkan bahwa ketika sel tanaman terinfeksi, virus melepaskan subunit terminal CP ujung 5', kemudian ekspresi CP tanaman transgenik dengan segera menyelubungi kembali saat penguraian virus untuk mencegah infeksi (Lin et al. 2007).

Resistensi melalui PDR telah terbukti dapat melindungi tanaman melawan infeksi virus. Berbagai penelitian telah diaplikasikan pada tanaman transgenik seperti kacang tanah (*Arachis hypogea* L.) terhadap *Tobacco streak virus* (TSV) (Mehta et al. 2013), transgenik pepaya (*Carica papaya*) terhadap *Papaya ringspot virus* (PRSV) (Lius et al. 1997). Namun, kekurangan dari strategi PDR yaitu ditentukan dari korelasi antara akumulasi tingkat ekspresi CP dan tingkat ketahanan virus. Pada tanaman transgenik yang terinfeksi, tingkat ketahanan virus lebih tinggi dan tidak banyak mengekspresikan viral CP. Sedangkan, keberadaan CP RNA virus hanya sedikit pada tanaman transgenik yang resisten/tahan (Lin et al. 2007). Sehingga, tingkat resistensinya kurang memuaskan. Kemudian, perkembangan teknologi memunculkan strategi baru untuk ketahanan tanaman yang mengarah ke metode RNA silencing atau *post-transcriptional gene silencing* (PTGS).

### **2.3 Mekanisme RNA *interference* (RNAi) pada Tanaman Transgenik**

RNA *silencing* atau RNA *interference* merupakan mekanisme pada sel hidup yang bertujuan untuk mengendalikan ekspresi gen. Pada proses tersebut hasil transkripsi didestruksi sehingga translasi tidak dapat berlangsung (*Post-Transcriptional Gene Silencing*) (Lin et al. 2007). Mekanisme RNAi diperantarai oleh dsRNA yang memicu degradasi mRNA target spesifik, sehingga ekspresi gen mengalami *down-regulation*. dsRNA atau hairpin RNA (hpRNA) kemudian dipecah kedalam bentuk *small-interfering* RNA (siRNA) dengan panjang 21-28 nt oleh DICER (RNase tipe III). Tahap selanjutnya, siRNA berikatan dengan RNA-induced silencing complex (RISC) dan protein Argonaute (Ago) yang merupakan komponen katalitik dari RISC menggunakan siRNA sebagai template untuk

mengenali dan merusak mRNA target yang komplementer (Katoch and Thakur 2013).



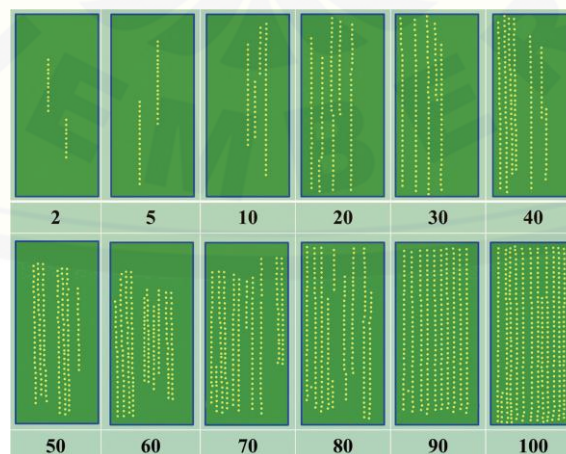
Gambar 2. 3 Skema pembungkaman gen melalui strategi RNAi. Double-stranded RNA (dsRNA) atau hairpin RNA (hpRNA) menghasilkan siRNA oleh Dicer. RNA strand berikatan dengan Argonaute (Ago) untuk membentuk RNA-induced silencing complex (RISC). siRNA/RISC kompleks kemudian berikatan dengan sekuens target mRNA menghasilkan degradasi target transkripsi atau menghambat translasi. Komponen siRNA/mRNA kompleks dapat di daur ulang menjadi RISC kompleks atau menghasilkan siRNA dupleks oleh *RNA-dependent RNA-polymerase* (RdRp) (Majumdar et al. 2017)

Pada tanaman transgenik yang memanfaatkan strategi RNAi sebagai media resistensi virus terdapat konstruksi *sense* dan *anti-sense* sekuens target dengan sekuens spacer dalam satu vektor. Sehingga, terjadi proses pembentukan dsRNA/hpRNA untuk mRNA target yang spesifik. Tebu transgenik RNAi yang digunakan untuk penelitian ini diperoleh dari proses transformasi genetik pada penelitian sebelumnya (Widyaningrum et al. 2021). Mekanisme resistensi yang diperantarai oleh RNAi memiliki kemampuan melindungi terhadap inokulum dengan sangat tinggi, karena targetnya sangat spesifik. Sedangkan, resistensi yang diperantarai oleh protein umumnya memiliki tingkat resistensi yang lebih rendah, tetapi dengan spektrum yang lebih luas (Lomonosoff 1995).

## 2.4 Pengamatan Gejala Mosaik

Selama proses infeksi virus memiliki dua kemungkinan interaksi antara virus dengan inang yaitu interaksi kompatibel dan inkompatibel. Pada interaksi kompatibel, infeksi ber dampak pada proses fisiologi, biokimia, proses metabolik, munculnya gejala sistematis setelah infeksi, aktivasi, dan tekanan ekspresi gen pada sel inang. Sedangkan, interaksi inkompatibel menjelaskan bahwa terjadi interaksi antara gen resisten tanaman dan protein viral avirulen (Avr). Selama terjadi infeksi oleh virus di dalam tanaman juga melakukan respon pertahanan untuk melawan infeksi (Soosaar et al. 2005). Respon tanaman tersebut ditandai dengan beberapa perubahan biokimia seperti enzim yang berhubungan dengan sistem pertahanan, akumulasi karbohidrat, fotosintesis dan aktivitas fotoasimilasi (Yang *et al.*, 2007).

Infeksi dari virus SCMV mengakibatkan gejala mosaik yang tampak pada daun. Sehingga, pengamatan mosaik dilandaskan pada skala Cobb untuk menentukan skoring gejalanya. Persentase mosaik pada daun dievaluasi dari 1% - 100% dengan pembagian kelompok berdasarkan keparahannya. Pengelompokan penampakan gejala kurang dari 5% (*resistance*), 5 – 10% (*moderately resistance*), 11 – 25 % (*moderately susceptible*), 26 – 50% (*susceptible*), dan lebih dari 50% (*highly susceptible*) (Manandhar et al. 2016).



Gambar 2. 4 Persen skala gejala pada area daun yang terinfeksi (Mahmoud et al. 2015)



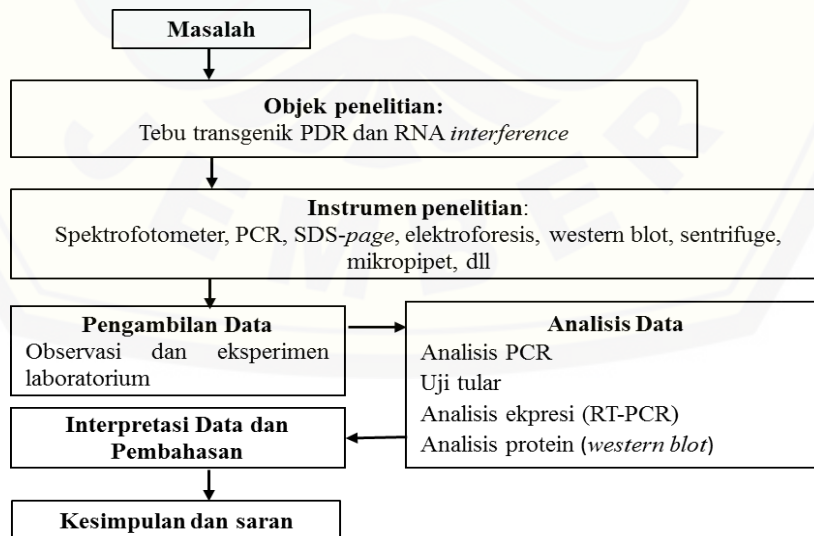
### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) divisi biologi molekuler dan bioteknologi tanaman Universitas Jember.

#### 3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan pada penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif. Tujuan dari penelitian deskriptif ini adalah membuat deskripsi atau gambaran secara sistematis serta hubungan antara fenomena yang diselidiki atau hasil observasi. Sedangkan, penelitian kualitatif digunakan untuk meneliti objek secara alamiah. Analisis data kualitatif bersifat induktif, yaitu suatu analisis berdasarkan data yang diperoleh, selanjutnya dikembangkan pola hubungan tertentu atau menjadi hipotesis (Gambar 3.1).



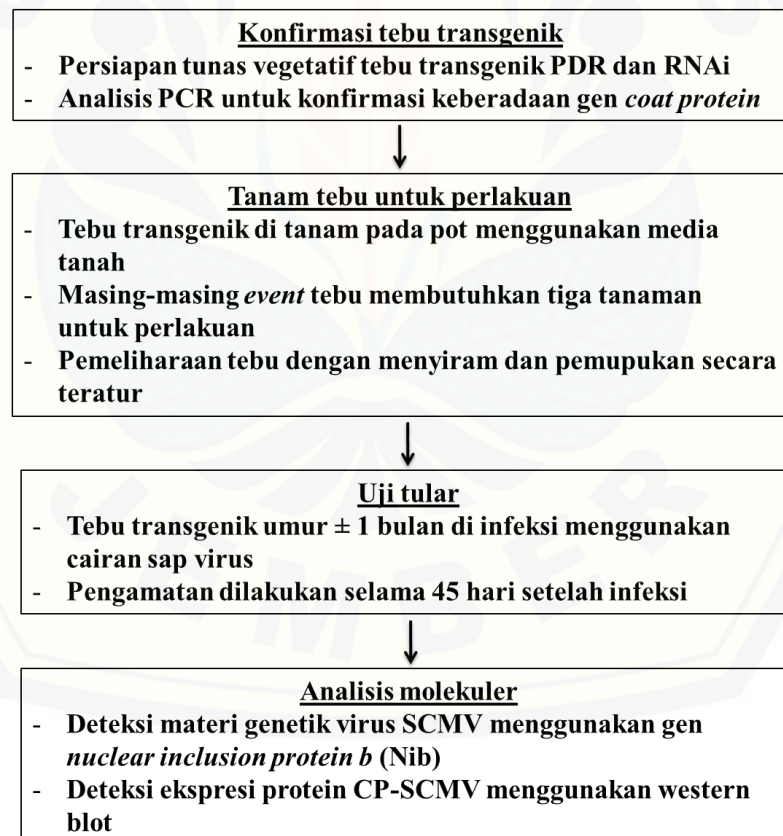
Gambar 3. 1 Skema rancangan penelitian ketahanan tebu transgenik

### 3.3 Jenis dan Sumber Data

Jenis data penelitian ini merupakan data hasil observasi dan analisis molekuler secara kualitatif. Sumber data penelitian merupakan data primer yaitu data yang diperoleh langsung dari hasil penelitian.

### 3.4 Kerangka Pemecahan Masalah

Mekanisme ketahanan tanaman transgenik PDR dan RNA *interference* dibandingkan untuk diuji efektifitasnya dalam menghadapi serangan virus. Oleh karena itu, diperlukan skema pemecahan masalah.



Gambar 3. 2 skema kerangka pemecahan masalah

### 3.4.1 Persiapan eksplan tunas tebu vegetatif

Tebu transgenik yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari penelitian sebelumnya. Tebu transgenik PDR (Apriasti et al. 2018) dan RNAi (Widyaningrum et al. 2021) diperbanyak secara vegetatif pada media tanah di *green house*. Terdapat tiga *event* tebu transgenik PDR yaitu A10, A11, A13 dan empat *event* tebu transgenik RNAi yaitu C16, C18, U1, U8. Masing-masing *event* diperbanyak sebanyak tiga kali ulangan. Tebu yang digunakan untuk uji tular dikonfirmasi dahulu menggunakan PCR untuk memastikan keberadaan gen *coat protein*. Uji tular dilakukan pada saat usia tebu  $\pm$  1 bulan menggunakan cairan sap virus.

### 3.4.2 Uji Tular

Inokulasi virus diawali dengan pembuatan sap (cairan tanaman) dari daun tebu yang bergejala mosaik (gejala paling jelas). Pembuatan sap memerlukan sebanyak 2 gram daun tebu yang terinfeksi oleh SCMV, kemudian digerus menggunakan mortar dan pestel steril dalam keadaan dingin (*on ice*). Kemudian sampel yang telah digerus dimasukkan dalam *falcon tube* yang berisi campuran 0,1 M buffer posfat pH 7,0 (Yuan et al., 2003), sampel daun (10:1) artinya setiap 10 ml buffer posfat dibutuhkan 1 gram sampel. Sebanyak 2% PVP (*Polyvinil Pyrrolidon*) dari volume larutan ditambahkan pada saat penggerusan dan *on ice*.

Cairan hasil penggerusan dari tanaman sakit segera diinokulasikan pada helai daun kedua dan ketiga dengan cara mengoleskan ke permukaan daun yang terlebih dahulu dilukai dengan mengoleskan karborundum 600 mesh. Pengolesan dilakukan searah dengan pertulangan daun agar perlakuan yang ditimbulkan tidak merusak daun. Kemudian permukaan daun tanaman yang telah diolesi cairan sap didiamkan selama 3 menit. Setelah itu, dibilas menggunakan aquades steril untuk menghilangkan sisa-sisa karborundum dan cairan sap yang masih melekat.

Proses inokulasi cairan sap tanaman yang terinfeksi SCMV ini dilakukan dilakukan secara mekanis pada sore hari. Kemudian, tanaman di inkubasi pada

tempat gelap (terhindar dari cahaya) selama satu malam (*overnight*) dan dikeluarkan ke tempat terang pada pagi harinya. Pemeliharaan dilakukan dengan penyiraman dan pemberian pupuk secara teratur. Pengamatan gejala mosaik dilakukan setiap hari selama 45 hari setelah infeksi (Hidayati et al. 2021).

### 3.4.3 Analisis Ekspresi

Tebu yang telah di infeksi, selanjutnya dilakukan analisis ekspresi gen *nuclear inclusion protein b (Nib)* menggunakan RT-PCR dan deteksi ekspresi protein CP-SCMV menggunakan analisis *western blot*.

#### a. RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)

Tahapan dalam proses RT-PCR yaitu isolasi RNA, sintesis cDNA, dan PCR.

##### 1. Isolasi RNA

Isolasi RNA total yang dihasilkan menggunakan prinsip dasar pelisisan sel dan pemisahan berdasarkan berat molekul (Sambrook and Russel, 2001). Sampel daun tebu sebanyak 0,1 gram digerus dengan menggunakan N2 cair pada mortar dengan tujuan pelisisan dinding sel dengan perlakuan fisik. Sampel yang sudah menjadi bubuk kemudian dimasukkan dalam sentrifuge tube dan ditambahkan buffer ekstraksi (buffer SL 600  $\mu$ l dan 5%  $\beta$ -mercaptoethanol), vortex hingga homogen dan sentrifuge 12000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipindahkan ke RNase-free spin column CS, sentrifuge 12000 rpm selama 2 menit. Supernatan dipindah ke ependorf (1,5ml) dan ditambahkan 0,4x etanol PA (pipeting), selanjutnya supernatan di pindah pada RNase-free spin column CR3, sentrifuge 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan ditambahkan 350  $\mu$ l buffer RW1, sentrifuge 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan ditambahkan 80  $\mu$ l DNase (10  $\mu$ l DNase dan 70  $\mu$ l buffer RDD), inkubasi selama 15 menit, 20-30°C, selanjutnya menambahkan 350  $\mu$ l buffer RW1 dan sentrifuge 12000 rpm selama 15 detik. Mencuci pellet dengan 500  $\mu$ l buffer RW 2 $\times$  dan sentrifuge 12000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan sentrifuge 12000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan. Pellet ditambah 40  $\mu$ l RNase-free water dan inkubasi selama 5 menit, sentrifuge 12000 rpm selama 2 menit.

RNA dicek konsentrasinya dan dielektroforesis pada 1% gel agarose untuk mengetahui kualitas RNA yang didapat dan RNA disimpan pada  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 2. Sintesis cDNA (*complementary DNA*)

RNA yang diperoleh dari hasil isolasi RNA total, selanjutnya ditranskripsi terbalik menjadi komplemen DNA atau *complementary DNA* (cDNA) dengan menggunakan Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Bio Rad). Sintesis cDNA yang dilakukan bertujuan untuk mendapat salinan dari materi genetik virus, karena materi genetik yang ada pada anggota potyvirus berupa RNA maka perlu diubah terlebih dahulu menjadi DNA dengan cara transkripsi terbalik.

Proses transkripsi terbalik ini dilakukan dengan metode *one step*. Konsentrasi RNA yang digunakan adalah 1  $\mu\text{g}$  dengan menambahkan 1  $\mu\text{l}$  iScript Reverse Transcriptase, 4  $\mu\text{l}$   $5\times$  iScript Reaction Mix dan Nuclease free water hingga volume total mencapai 20  $\mu\text{l}$ . Selanjutnya dilakukan inkubasi dengan program priming  $25^{\circ}\text{C}$  selama 5 menit, reverse transcription  $46^{\circ}\text{C}$  selama 20 menit, RT inactivation  $95^{\circ}\text{C}$  selama 1 menit.

## 3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Konsentrasi cDNA yang telah disintesis diukur kembali dengan menggunakan nano drop dan dilanjutkan dengan proses amplifikasi cDNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Amplifikasi cDNA dari hasil reverse bertujuan untuk memperbanyak salinan materi genetik dari virus yang sudah diperoleh, selain itu cDNA tersebut masih berupa utas tunggal karena template yang digunakan berasal dari RNA virus.

Volume total yang digunakan dalam satu kali reaksi amplifikasi adalah 50  $\mu\text{L}$  yang terdiri dari master mix Roche 25  $\mu\text{L}$ , primer *forward* 2  $\mu\text{L}$ , primer *reverse* 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 19  $\mu\text{L}$  dan cDNA template sebanyak 2  $\mu\text{L}$ . Program yang digunakan dalam PCR meliputi pre-denaturation  $95^{\circ}\text{C}$  selama 3 menit, denaturation  $95^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, annealing  $63^{\circ}\text{C}$  selama 30 detik, elongation  $72^{\circ}\text{C}$  selama 1



menit dan *final elongation* 72°C selama 5 menit dan dilakukan sebanyak 25 siklus.

Konfirmasi hasil PCR dilakukan dengan cara elektroforesis cDNA pada gel agarose 1% menggunakan buffer TAE (Tris-Acetate-EDTA) 50× yang terlebih dahulu telah diencerkan. Elektroforesis ini merupakan salah satu metode untuk konfirmasi hasil PCR berdasarkan prinsip migrasi molekul DNA karena perbedaan muatan molekul yang dialiri muatan listrik. Elektroforesis dilakukan selama 25 menit dengan tegangan 100V pada buffer TAE (Tris-Acetate-EDTA) dan menggunakan marker DNA berukuran 1 Kb. Pita DNA yang diperoleh dari hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan *gel doc*.

#### **b. Western Blot**

Sebelum melakukan western blot pertama kali dilakukan ekstraksi protein terlarut (*Soluble protein*) dengan menggerus 1 gram daun tebu menggunakan nitrogen cair lalu ditambahkan buffer ekstraksi (50 mM Mops-NaOH (pH7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA 2,5 mM DTT, 10µM PSMF) dan 10% PVP dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm, suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh mengandung protein terlarut, sedangkan pelet mengandung protein tidak terlarut.

*Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamide Gel Electroforesis* (SDS-PAGE) dengan konsentrasi acrylamide 30%. Sampel protein yang digunakan sebanyak 5 µg ditambahkan bufer SDS (0,5 tris-HCl, 20 %SDS, 60% glyserol, *bromophenol blue*, 5% β-mercaptoetanol) dengan perbandingan 1:1 selanjutnya dipanaskan 95°C selama 3 menit. Sampel selanjutnya dimasukkan dalam sumur gel dan dielektroforesis pada 50 Volt selama 3 jam. Setelah selesai gel dikeluarkan dan dicuci dengan ddH<sub>2</sub>O, pindahkan gel hasil elektroforesis SDS-PAGE diatas membran nitroselulosa dan diantara gel dan membran letakkan *filter paper* yang khusus dipakai elektrotransfer.

*Western Blot* dilakukan dengan menggunakan metode Towbin (Towbin, 1979). Protein dalam gel yang telah dielektroforesis ditransfer ke membran

nitroselulosa menggunakan elektroblot 250 mA selama 2 jam, selanjutnya membran dicuci dengan *Tris Bufer Saline* (TBS) sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit. Selanjutnya diinkubasi dengan skim milk dalam TBS selama 30 menit. Protein CP-SCMV pada membran direaksikan dengan antibodi polikonal CP-SCMV (antibodi 1) diinkubasi semalam dalam skim milk dengan perbandingan 1:5000 (Xia *et al*, 2016). Membran dicuci dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit, selanjutnya diinkubasi dengan antibodi dua 10µl *goat anti-rabbit IgG conjugate* (antibodi 2) selama 1 jam. Membran dicuci lagi dengan TBS sebanyak 3 kali masing-masing 10 menit dan dibilas *Alkaline Phosphatase* pH 9,5. Visualisasi warna menggunakan 1 ml *5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate* (BCIP) atau *Nitroblue Tetrazolium* (NBT) setiap 2 ml bufer *Alkaline Phosphatase*.



## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil penelitian

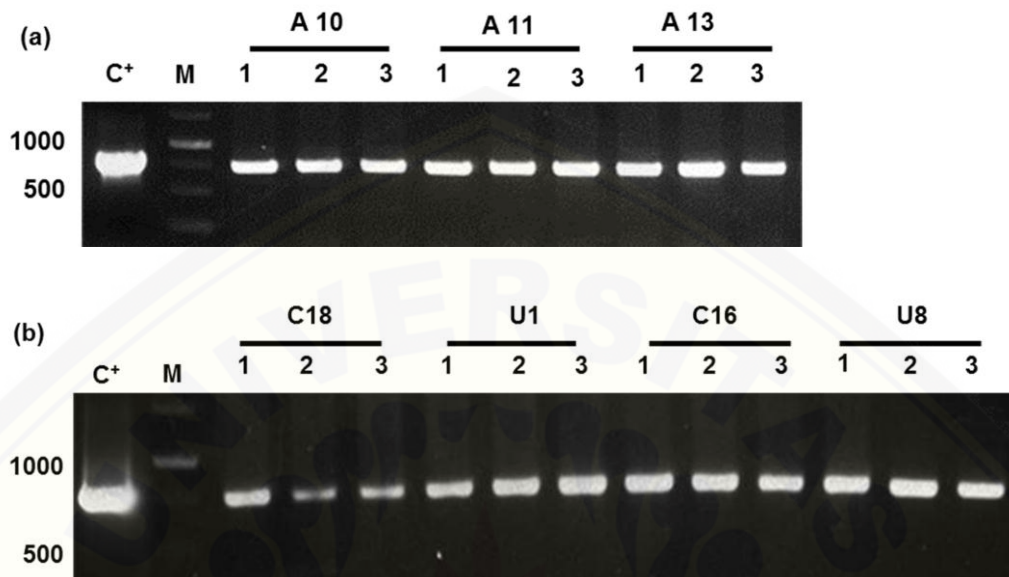
Hasil penelitian ketahanan tebu transgenik melalui pendekatan *pathogen-derived resistance* dan *RNA interference* menyebutkan bahwa kedua metode tersebut memiliki mekanisme pertahanan berbeda terhadap infeksi *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). Oleh karena itu, untuk membandingkan ketahanan antara kedua metode tersebut perlu dilakukan analisis molekuler, uji tular dan pengamatan gejala mosaik secara visual.

#### 4.1.1 Konfirmasi tebu transgenik PDR dan RNAi

Konfirmasi tebu transgenik diperlukan untuk menentukan tebu yang digunakan untuk penelitian. Proses skrining dilakukan dengan analisis DNA genom menggunakan *polymerase chain reaction* (PCR). Konfirmasi gen target menggunakan PCR dengan sepasang primer CP yaitu primer *forward* 5'- CCC CAT ATG ACA GTC GAT GCA GGT GCTC -3' dan primer *reverse* 5'- ATG GAT CCT AGT GGT GCT GCT GCA CTCCC -3'. Hasil dari analisis PCR menunjukkan bahwa genom tebu transgenik memunculkan pita DNA dengan ukuran  $\pm 702$  bp.

Pada penelitian ini terdapat sembilan sampel tebu PDR dan 12 sampel tebu RNAi yang terkonfirmasi sebagai positif transforman. Sampel tersebut meliputi *event* tebu dengan masing-masing memiliki tiga ulangan. Tebu yang telah terkonfirmasi kemudian dilanjutkan dengan penanaman pada media tanah. Tanaman ditumbuhkan hingga umur satu bulan untuk proses infeksi menggunakan cairan sap virus.

Berikut ini adalah hasil dari visualisasi DNA tebu transgenik yang telah terkonfirmasi:



Gambar 4. 1 Analisis (PCR) menggunakan primer oligonukleotida CP (F – R) dengan ukuran  $\pm 702$  bp (a) Sembilan tanaman tebu PDR terkonfirmasi (B) 12 tanaman tebu RNAi terkonfirmasi. C<sup>+</sup>= kontrol positif, M= Marker, 1 Kb.

#### 4.1.3 Pengamatan gejala mosaik setelah uji tular

Perlakuan untuk proses uji tular menggunakan cairan sap virus pada usia tebu  $\pm 1$  bulan. Bagian daun tebu yang paling muda dilukai menggunakan carborundum dan diinkubasi pada tempat gelap dengan tujuan virus dapat menginfeksi maksimal. Berdasarkan data pengamatan kemunculan gejala menunjukkan bahwa gejala muncul pada tebu transgenik PDR lebih lambat dibandingkan dengan transgenik RNAi. Persentase kemunculan gejala pada tebu transgenik PDR sebesar 77 % yaitu sebanyak tujuh tanaman yang terinfeksi dari sembilan tanaman. Sedangkan, persentase dari kemunculan gejala pada tebu transgenik RNAi sebesar 50 % yaitu sebanyak enam tanaman yang terinfeksi dari 12 tanaman.

Pengamatan dilakukan sehari setelah proses infeksi virus hingga hari terakhir kemunculan gejala. Gejala muncul pertama pada 21 hari setelah inokulasi dan kemunculan gejala terakhir pada 45 hari setelah inokulasi. Berdasarkan hasil masa inkubasi virus diketahui bahwa transgenik RNAi memiliki masa inkubasi lebih lambat daripada transgenik PDR yang memiliki masa inkubasi lebih cepa.

Terdapat tiga *event* (A10, A11, A13) pada transgenik PDR dengan jumlah total sembilan tanaman. Gejala muncul pertama kali pada 21 hari setelah inokulasi. Sedangkan, terdapat empat *event* (C16, C18, U6, U8) dengan total 12 tanaman pada transgenik RNAi, gejala muncul pertama kali pada 26 hari setelah inokulasi dan gejala terakhir muncul pada 45 hari setelah inokulasi.

Gejala mosaik pada daun tebu yang terinfeksi virus menunjukkan pola sebaran yang berbeda. Pola sebaran tersebut ditentukan dari kerapatan bercak mosaik dalam persentase berdasarkan skala Cobb. Pada tebu transgenik PDR terdapat tujuh tanaman terinfeksi dengan pola mosaik yang memiliki rentang 2–100% . Sedangkan, pada tebu transgenik RNAi terdapat enam tanaman terinfeksi dengan rentang pola mosaik antara 5-20% (Tabel 4.1).

Pola sebaran mosaik pada daun tebu dengan persentase mencapai 100% menunjukkan bahwa tanaman tersebut merupakan tanaman yang rentan. Gejala mosaik yang mencapai 30% merupakan tanaman dengan gejala moderat (Nagaraj et al. 2019). Sedangkan, pola mosaik yang hanya mencapai 10% termasuk kedalam tanaman yang tahan (Bock et al. 2010). Pada transgenik PDR terdapat tiga tanaman resisten, satu tanaman dengan gejala *moderately resistance*, satu tanaman *susceptible* dan dua termasuk *highly susceptible*. Total 12 tebu transgenik RNAi yang diinfeksi virus terdapat enam tanaman termasuk resisten, tiga tanaman *moderately resistance*, dan tiga tanaman *moderately susceptible*. Tidak terdapat tanaman dengan kategori *susceptible* maupun *highly susceptible*.

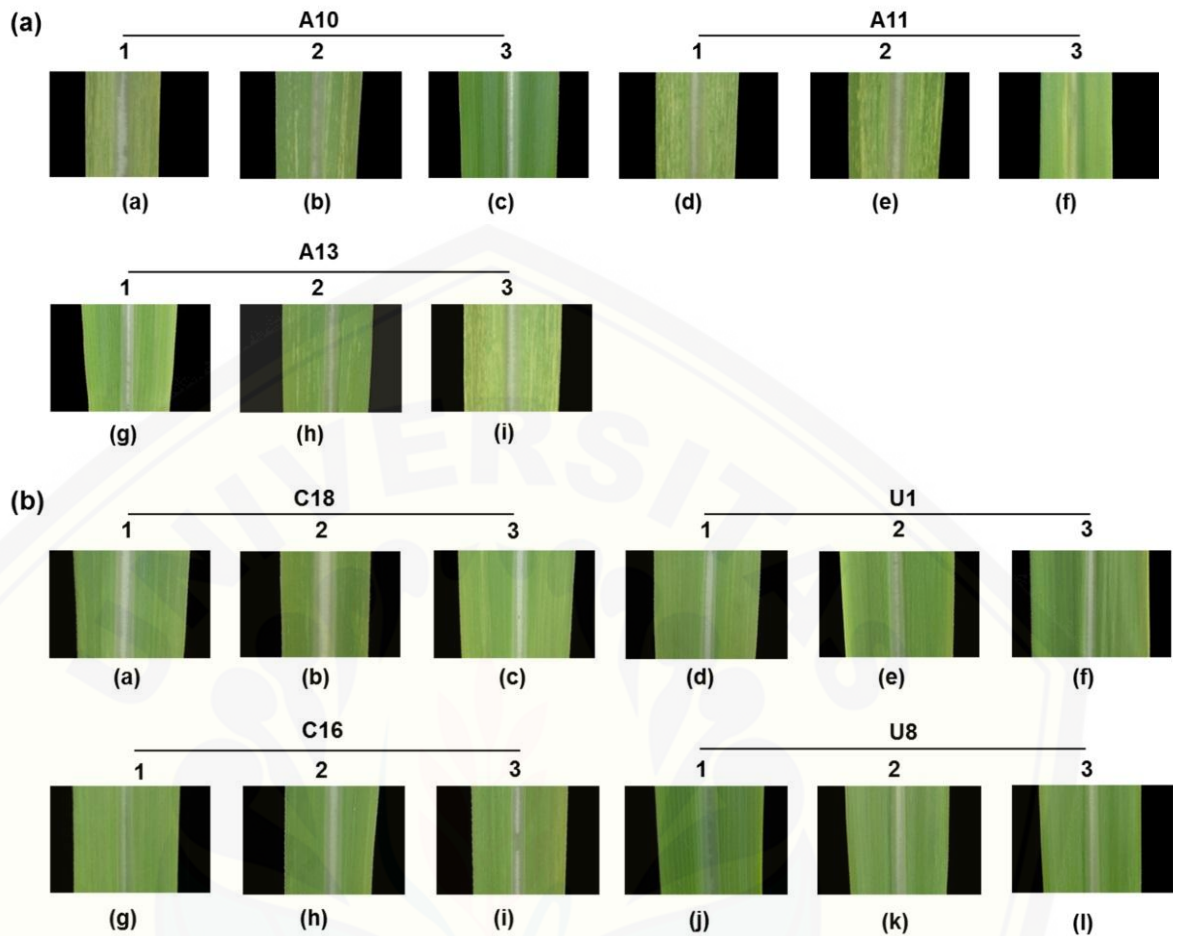
Berdasarkan hasil observasi respon tanaman terhadap infeksi virus yang meliputi masa inkubasi dan pola sebaran mosaik, dapat diketahui adanya hubungan antara waktu kemunculan gejala dengan tingkat keparahannya. Pada transgenik PDR terdapat tanaman dengan masa inkubasi virus tercepat dengan kategori gejala *highly susceptible* yang merupakan gejala paling parah, jika

dibandingkan dengan transgenik RNAi dengan masa inkubasi virus lebih lambat dengan respon gejala hanya sampai kategori *moderately susceptible*. Sehingga, pada observasi ini, tebu transgenik PDR merupakan tanaman paling rentan terhadap serangan SCMV (Tabel 4.1).

Tabel 4. 1 Pengamatan gejala setelah infeksi virus

Transgenic lines	Symptoms observation		Resistance	
	Incubation period (dpi)	Mosaic distribution pattern (%)		
A10.1	45	100	Highly susceptible	
A10.2	37	30	Susceptible	
A10.3	0	0	Resistant	
PDR	A11.1	26	100	Highly susceptible
	A11.2	26	90	Highly susceptible
	A11.3	45	2	Resistant
	A13.1	0	0	Resistant
	A13.2	34	20	Moderately susceptible
	A13.3	21	100	Highly susceptible
RNAi	C18.1	45	20	Moderately susceptible
	C18.2	45	5	Moderately resistant
	C18.3	26	20	Moderately susceptible
	U1.1	34	10	Moderately resistant
	U1.2	0	0	Resistant
	U1.3	0	0	Resistant
	C16.1	0	0	Resistant
	C16.2	34	10	Moderately resistant
	C16.3	34	20	Moderately susceptible
	U8.1	0	0	Resistant
	U8.2	0	0	Resistant
	U8.3	0	0	Resistant

Sumber: (Hidayati et al. 2021)



Gambar 4. 2 Tanaman transgenik yang menunjukkan gejala mosaik dari 0 – 45 hari setelah infeksi. (a) transgenik PDR dengan gejala mosaik *highly susceptible* (a,d,e,i), *susceptible* (b), *moderately susceptible* (h), dan resisten (c,f,g) (b) transgenik RNAi dengan gejala mosaik *moderately susceptible* (a,c,i), *moderately resistant* (b,d,h), *resistant* (e,f,g,j,k,l).

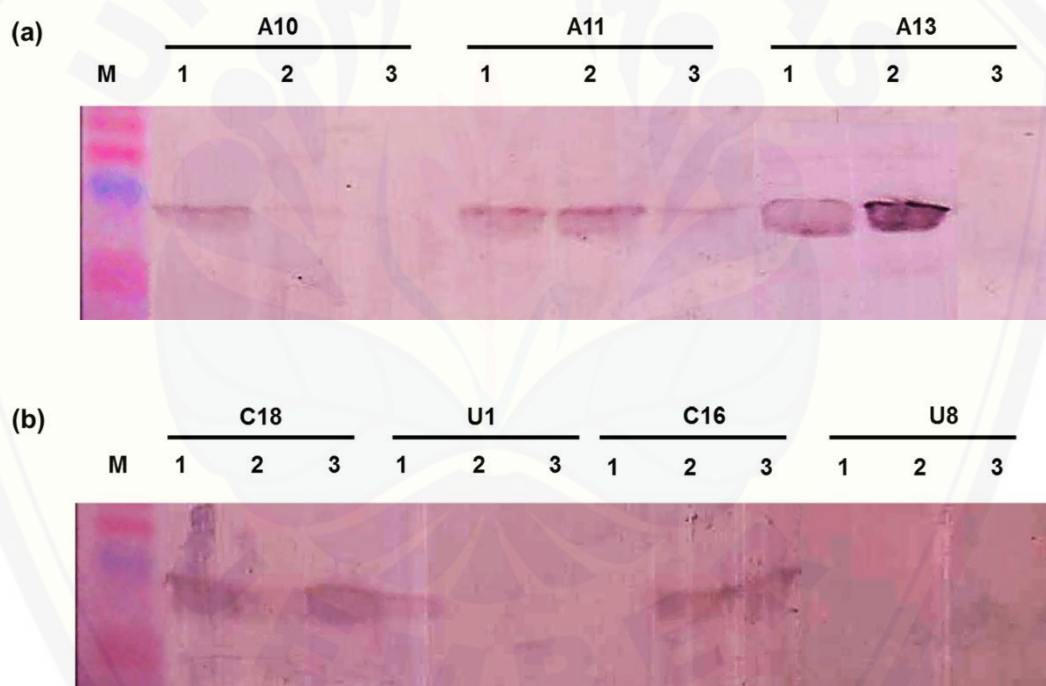
#### 4.1.4 Analisis ekspresi protein CP menggunakan western blot

Analisis western blot digunakan untuk deteksi ekspresi protein dengan ikatan antigen dan antibodi sehingga memunculkan pita protein yang spesifik. Western blot dilakukan pada seluruh tanaman setelah perlakuan uji tular. Tanaman yang terinfeksi oleh virus akan terdeteksi protein CP-SCMV dengan ukuran  $\pm 36,7$  Kda. Analisis molekuler ini, dilakukan untuk validasi dari data hasil observasi dan memastikan bahwa gejala yang muncul merupakan gejala mosaik



dari infeksi SCMV, bukan dari virus mosaik lainnya. Transgenik PDR menghasilkan sebanyak tujuh tanaman rentan dan dua tanaman tahan terhadap serangan virus SCMV. Hal ini di buktikan dengan analisis western blot yang menunjukkan terdapat pita protein pada masing-masing event yaitu dua tanaman pada event A10, tiga tanaman pada event A11, dan dua tanaman pada event A13 (Gambar 4.2 a).

Pada tanaman transgenik RNAi terdapat enam tebu yang terinfeksi yaitu tiga tanaman pada *event* C18, dua tanaman pada *event* C16 dan satu tanaman dari *event* U1. Sedangkan, terdapat enam tanaman yang tidak terinfeksi (Gambar 4.2 b).



Gambar 4. 3 Analisis ekspresi protein CP-SCMV pada tebu transgenik dengan ukuran protein  $\pm 36,7$  kDa (A) tujuh tanaman transgenik PDR terinfeksi oleh virus (B) enam tanaman transgenik RNAi terinfeksi oleh virus. M= marker protein Tris-Glycine 15%

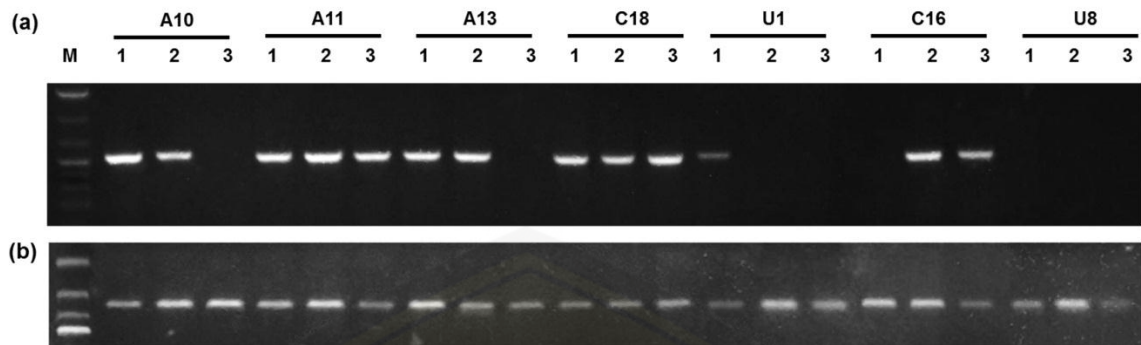


#### 4.1.5 Konfirmasi virus SCMV pada tebu setelah uji tular

*Reverse transcriptase polymerase chains reaction* (RT-PCR) merupakan analisis yang digunakan untuk deteksi cDNA dari sampel hasil isolasi RNA. Isolasi RNA virus pada daun yang terinfeksi dan tidak terinfeksi bertujuan untuk mengetahui keberadaan virus SCMV pada sel tanaman. Analisis RT-PCR diperlukan untuk memastikan kembali bahwa virus yang menginfeksi merupakan virus SCMV. Deteksi materi genetik berupa RNA virus lebih sensitif menggunakan RT-PCR dengan mengubahnya menjadi cDNA.

Proses isolasi RNA menggunakan kit isolasi RNA (TIANGEN) menggunakan sampel yang berasal dari daun tebu. RNA hasil isolasi kemudian diubah menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase*. Analisis PCR dilakukan untuk deteksi gen actin yaitu gen yang selalu ada dan ditemukan pada seluruh organisme eukariot. Amplifikasi gen actin berfungsi sebagai penanda keberhasilan dari perubahan RNA menjadi cDNA. Analisis gen actin dengan menggunakan sepasang primer actin yaitu primer *forward* 5' GCA ACT GGG ATG ACA TGG AG 3' dan primer *reverse* 5' ATG GCT GGA AGA GGA CCT CAG 3' (Gambar 4.4 b).

cDNA yang diperoleh kemudian di analisis dengan PCR menggunakan sepasang primer *Nib* yaitu primer *forward* 5'-GCC ATA CTC GAG TGG GAT CG-3' dan primer *reverse* 5'-CCT TGT CTC TTT GGC CTC CTG-3'. Gen *Nib* merupakan salah satu dari gen yang dimiliki oleh virus SCMV. Fungsinya adalah untuk mengetahui keberadaan partikel virus SCMV pada tanaman yang terinfeksi. Pita DNA hasil amplifikasi gen *Nib* terbentuk pada ukuran  $\pm 483$ bp. Pada hasil elektroforesis tersebut terdapat pita DNA pada beberapa sampel dan tidak muncul pita DNA pada sampel yang lain. Hal ini menunjukkan bahwa cDNA virus telah teramplifikasi sebagai tanda sampel tersebut terinfeksi oleh virus SCMV (Gambar 4.4 a).



Gambar 4. 4 Amplifikasi cDNA virus pada sampel daun tebu (A) amplifikasi gen Nib pada tanaman transgenik yang terinfeksi virus dengan ukuran pita DNA  $\pm 483$  bp (B) amplifikasi gen actin pada ukuran  $\pm 568$  bp.

## 4.2 Pembahasan

Tanaman memiliki kemampuan pertahanan bawaan untuk menghadapi serangan patogen berupa jamur, bakteri dan virus. Serangan patogen dapat menurunkan produktivitas dari tanaman pertanian. Salah satu upaya untuk meningkatkan pertahanan tanaman terhadap serangan patogen yaitu melalui pendekatan bioteknologi. Pada penelitian ini, transformasi genetik pada tebu (*Saccharum officinarum*) dilakukan untuk mendapatkan tebu yang tahan terhadap serangan virus SCMV (*Sugarcane mosaic virus*) melalui strategi resistensi *patogen-derived Resistance* (PDR) dan *RNA interference*.

Transgenik RNAi merupakan pengembangan suatu teknik molekuler untuk meningkatkan sifat ketahanan tanaman terhadap patogen. Sistem pertahanan transgenik RNAi pada inang dapat menghambat infeksi patogen dengan melibatkan siRNA dalam resistensi penyakit. Keberhasilan implementasi transgenik RNAi bergantung pada rancangan *double-strand RNA* (dsRNA) pada vektor yang akan menghasilkan *small interfering RNA* (siRNA) untuk pembungkaman gen target dari patogen (Majumdar et al. 2017). Sedangkan, *patogen-derived resistance* (PDR) merupakan teknik resistensi berdasarkan *coat-protein mediated resistance* (CPMR) yang dikembangkan dengan overekspresi gen *coat protein* atau sekuens yang berasal dari virus untuk menginduksi gen

ketahanan terhadap virus yang menginfeksi. Mekanisme ketahanan CPMR melibatkan ekspresi *coat protein* pada tanaman transgenik untuk menghalangi replikasi dan menghalangi penyusunan ulang partikel utuh virus (Goldbach, 2003).

Sekuen utuh cDNA *coat protein* ditandai dengan keberadaan asam amino DAG (asp-ala-gly) pada tanaman transgenik berukuran 927 bp dan sekuen ujung N-terminal berukuran 702 bp (Apriasti et al, 2018). Tanaman transgenik yang telah dikonfirmasi dengan PCR menunjukkan pita DNA ukuran  $\pm 702$  bp sesuai dengan desain konstruk yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya (Widyaningrum et al. 2021)(Apriasti et al. 2018) (Gambar 4.1).

Pada penelitian ini, tanaman transgenik PDR dan transgenik RNAi yang telah dikonfirmasi sebagai positif transforman digunakan sebagai objek penelitian untuk uji ketahanan terhadap serangan SCMV. Perlakuan uji tular dengan cairan sap virus digunakan sebagai indikator untuk menentukan tingkat efektifitas ketahanan antara transgenik PDR dan transgenik RNAi. Variabel pengamatan meliputi pola sebaran mosaik dan masa inkubasi virus sebagai pembanding. Kemudian analisis molekuler meliputi uji ekspresi protein dan deteksi RNA virus dilakukan untuk validasi hasil pengamatan secara visual.

Respon gejala mosaik pada transgenik PDR diketahui mencapai kategori *highly susceptible* dengan masa inkubasi 21 hsi. Sedangkan, pada transgenik RNAi memberikan respon dengan kategori mencapai *moderately susceptible* dan masa inkubasinya selama 26 hsi. Respon gejala yang muncul pada transgenik PDR terlihat daun mengalami klorosis yang parah daripada transgenik RNAi. Sehingga, berdasarkan hasil pengamatan diketahui bahwa transgenik RNAi memiliki kemampuan menghambat infeksi SCMV dengan memperlambat waktu kemunculan gejala dan menekan respon gejala mosaik lebih baik dibandingkan dengan transgenik PDR (Tabel 4.1).

Infeksi virus pada inang tanaman melibatkan interaksi antara protein-protein dan asam nukleat yang menimbulkan respon antivirus sebagai pertahanan akibat dari infeksi virus yang membajak inang untuk replikasi. Mekanisme pertahanan yang digunakan oleh tanaman menentukan hasil interaksi virus

tersebut bersifat patogen atau tidak (Wu, Xiaoyun. 2019). Tanaman memiliki gen resisten (R) yang memberikan ketahanan terhadap patogen tertentu. Pertahanan yang diberikan oleh gen R yaitu *hypersensitive response* (HR) yang dapat melakukan *programed cell death* (PCD) pada sel yang terinfeksi dan *Systemic Acquired Reponse* (SAR) merupakan reaksi yang terjadi secara sistemik pada jaringan yang jauh dari sel yang terinfeksi sehingga menjadi kebal. Pertahanan yang diberikan tanaman akan memberikan respon berbeda yaitu ketika virus dapat menimbulkan penyakit yang membuat tanaman menjadi rentan, maka interaksi tersebut bersifat kompatibel. Sebaliknya, apabila infeksi virus tersebut bersifat avirulen dan mencegah munculnya penyakit yang membuat tanaman menjadi tahan, maka interaksi tersebut bersifat tidak kompatibel (Soosaar et al. 2005). Sehingga, dari pernyataan ini dapat dikatakan bahwa respon gejala mosaik yang muncul sebagai akibat uji tular termasuk interaksi yang bersifat kompatibel. Gen ketahanan yang ada pada tanaman transgenik PDR dan RNAi dapat meningkatkan mekanisme pertahanan tanaman untuk menghalangi replikasi dari virus yang menginfeksi. Hal ini dibuktikan dari hasil pengamatan gejala yang menunjukkan bahwa pada transgenik PDR terdapat tanaman yang tahan dan tidak bergejala meskipun persentase yang tahan lebih rendah (23%) dibandingkan transgenik RNAi (50%).

Analisis molekuler digunakan untuk memastikan bahwa partikel virus yang menginfeksi adalah dari virus SCMV bukan dari patogen lainnya. Uji immunoblot digunakan untuk deteksi ekspresi protein CP-SCMV yang hasilnya menunjukkan bahwa pada tanaman transgenik yang terinfeksi virus akan terdeteksi pita protein CP pada ukuran  $\pm 36,7$  kDa. Sebaliknya, untuk tanaman yang tahan tidak terdeteksi ekspresi dari protein CP-SCMV (Gambar 4.3). Dilanjutkan dengan analisis RT-PCR yang merupakan analisis yang lebih sensitif dikarenakan sampel uji yang digunakan adalah RNA virus yang kemudian diubah menjadi cDNA untuk amplifikasinya. Amplifikasi gen Nib dimanfaatkan untuk deteksi partikel virus yang terdapat pada tanaman yang terinfeksi. Sehingga dapat terlihat melalui visualisasi elektroforesis dan menunjukkan bahwa partikel virus yang menginfeksi



telah berhasil mengekspresikan proteinnya sehingga menimbulkan gejala mosaik pada daun.

Uji tular dengan sap virus memperlihatkan hasil mengenai masa inkubasi virus dan pola sebaran mosaik pada daun. Pengamatan masa inkubasi virus pada tanaman transgenik PDR lebih cepat dibandingkan transgenik RNAi. Hal ini disebabkan karena strategi ketahanan RNAi memiliki respon spesifik terhadap RNA virus dibandingkan dengan mekanisme pertahanan PDR. Mekanisme overekspresi CP membentuk agregat *coat protein* dalam tanaman untuk menghalangi replikasi virus. Reaksi tersebut tergantung dari tingkat akumulasi dari ekspresi *coat protein* (Sengoda, 2012). Sedangkan, pada tanaman transgenik RNAi yang telah dilakukan pada penelitian tomat transgenik melawan TYLCV-OM (*Tomato yellow leaf curl virus-Oman*) menyebutkan bahwa RNAi dapat menghambat replikasi virus dengan konsentrasi virus yang rendah dan mengakibatkan gejala yang tidak parah (Ammara, 2015). siRNA yang dihasilkan oleh dsRNA dapat memberikan resistensi untuk memicu pembungkaman gen yang berhubungan dengan replikasi virus, ketika ekspresi siRNA tinggi maka replikasi virus dapat dihambat (Kumari et al. 2018).

RNAi merupakan strategi baru dalam rekayasa genetik salah satunya adalah untuk resistensi virus. Selain itu, pembungkaman gen melalui *hairpin* RNA (*hpRNA*) merupakan metode dengan gen yang stabil pada tanaman. Jika dibandingkan dengan *protein-mediated* yang tingkat kestabilan gen yang masih belum jelas dan secara umum *protein-mediated* memiliki tingkat resistensi yang rendah. Sehingga, berdasarkan penelitian ini dapat diketahui bahwa mekanisme RNAi melalui siRNA dapat menahan gejala mosaik akibat infeksi virus pada tingkat yang memuaskan.



## BAB 5. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa strategi pendekatan RNAi dapat mengontrol infeksi virus pada tingkat yang memuaskan dibandingkan strategi PDR. Gejala mosaik muncul sebagai respon terhadap perlakuan uji tular dengan persentase kejadian pada transgenik PDR mencapai 77% dengan tingkat *highly susceptible*. Sedangkan pada transgenik RNAi dapat menahan infeksi virus dengan gejala *moderately susceptible* dengan persentase insiden 50%.
2. Berdasarkan masa inkubasi virus, pada transgenik PDR kemunculan gejala lebih cepat yaitu selama 21 hsi dibandingkan dengan transgenik RNAi yang lebih lambat yaitu 26 hsi
3. Analisis molekuler digunakan untuk konfirmasi keberadaan virus SCMV di tanaman. Hasil validasi immunoblot dan RT-PCR menunjukkan bahwa partikel virus yang menginfeksi telah berhasil mengekspresikan proteinnya sehingga menimbulkan gejala mosaik pada daun.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akbar S, Yao W, Yu K, Qin L, Ruan M, Powell CA, Chen B. 2020. Photosynthetic characterization and expression profiles of sugarcane infected by Sugarcane mosaic virus (SCMV). *Photosynth Res*. doi:10.1007/s11120-019-00706-w. <https://doi.org/10.1007/s11120-019-00706-w>.
- Ammara U e, Mansoor S, Saeed M, Amin I, Briddon RW, Al-sadi AM. 2015. RNA interference-based resistance in transgenic tomato plants against Tomato yellow leaf curl virus -Oman (TYLCV-OM) and its associated betasatellite. *Virology*. 12(38):1–12. doi:10.1186/s12985-015-0263-y.
- Andrejeva J, Puurand U, Merits A, Rabenstein F, Jarvekulg L, Valkonen JPT. 1999. Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation. *J Gen Virol*. 80(5):1133–1139.
- Apriasti R, Widyaningrum S, Hidayati WN, Sawitri WD, Darsono N. 2018. Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Mol Biol Rep*. 0(0):0. doi:10.1007/s11033-018-4326-1. <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-018-4326-1>.
- Atreya PL, Chu M, Atreya CD, Pirone TP. 2016. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. (1995):265–270.
- Bock CH, Poole GH, Parker PE, Gottwald TR. 2010. Plant Disease Severity Estimated Visually, by Digital Photography and Image Analysis, and by Hyperspectral Imaging. *Plant Sci*. 29:59–107. doi:10.1080/07352681003617285.
- Eskelin K, Hafre A, Rantalainen KI, Ma K. 2011. Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and Inhibits Reporter mRNA Translation In Planta □. *J Virol*. 85(17):9210–9221. doi:10.1128/JVI.00052-11.
- Gadhawe KR, Gautam S, Rasmussen DA, Srinivasan R. 2020. Aphid

Transmission of Potyvirus : The Largest Plant-Infecting RNA virus Genus. *Viruses*. 12(773):1–22. doi:10.3390/v12070773.

Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberté J. 2013. 6K 2 - induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Virology*. 4(December):1–10. doi:10.3389/fmicb.2013.00351.

Guo J, Gao S, Lin Q, Wang H, Que Y, Xu L. 2015. Transgenic Sugarcane Resistant to Sorghum mosaic virus Based on Coat Protein Gene Silencing by RNA Interference. *Biomed Res Int*. 2015:1–9. doi:10.1155/2015/861907. <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/861907/>.

Hidayati WN, Apriasti R, Addy HS, Sugiharto B. 2021. Distinguishing resistances of transgenic sugarcane generated from RNA interference and pathogen - derived resistance approaches to combating sugarcane mosaic virus. *Indones J Biotechnol*. 26(2):107–114. doi:10.22146/ijbiotech.64734.

Hong Y, Levay K, Murphy JF, Klein PG, Shaw JG, Hunt AG. 1995. A Potyvirus Polymerase Interacts with the Viral Coat Protein and VPg in Yeast Cells. 166:159–166.

Katoch R, Thakur N. 2013. RNA interference : a promising technique for the improvement of traditional crops. 64(March):248–259. doi:10.3109/09637486.2012.713918.

Kumari A, Hada A, Subramanyam K, Thebora J, Misra S, Ganapathi A. 2018. RNAi - mediated resistance to yellow mosaic viruses in soybean targeting coat protein gene. *Acta Physiol Plant*. 40(32):1–12. doi:10.1007/s11738-018-2608-9.

Lin S-S, Henriques R, Wu H-W, Niu Q-W, Yeh S-D, Chua N-H. 2007. Strategies and mechanisms of plant virus resistance. *Plant Biotechnol*. 1:125–134. doi:10.1007/s11816-007-0021-8.

Lindbo JA, Dougherty WG. 1992. Pathogen-derived resistance to a potyvirus: immune and resistant phenotypes in transgenic tobacco expressing altered forms of a potyvirus coat protein nucleotide sequence. *Mol Plant Microbe Interact*. 5(2):144–53. doi:10.1094/MPMI-5-144.

<http://europepmc.org/abstract/med/1617197>.

- Lius S, Manshardt RM, Fitch MMM, Slightom JL, Sanford JC, Gonsalves D. 1997. Pathogen-derived resistance provides papaya with effective protection against papaya ringspot virus. *Mol Breeding*. 3:161–168.
- Lomonosoff GP. 1995. RESISTANCE TO PLANT. *Annu Rev Phytopathol*. 33:323–343.
- Mahmoud AF, Hassan MI, Amein KA. 2015. Resistance potential of bread wheat genotypes against yellow rust disease under Egyptian climate. *Plant Pathol J*. 31(4):402–413. doi:10.5423/PPJ.OA.12.2014.0127.
- Majumdar R, Rajasekaran K, Cary JW. 2017. RNA Interference ( RNAi ) as a Potential Tool for Control of Mycotoxin Contamination in Crop Plants : Concepts and Considerations. *Front plant Sci*. 8(200):1–14. doi:10.3389/fpls.2017.00200.
- Mäkinen K, Hafrén A. 2014. Intracellular coordination of potyviral RNA functions in infection. *plant Physiol*. 5(March):1–12. doi:10.3389/fpls.2014.00110.
- Manandhar HK, Timila RD, Sharma S, Joshi S, Manandhar S, Gurung SB, Sthapit S, Palikhey E, Pandey A, Joshi B, et al. 2016. A field guide for identification and scoring methods of diseases in the mountain crops of Nepal. Nepal: NARC, DoA, LI-BIRD and Bioversity International.
- Mehta R, Radhakrishnan T, Kumar A. 2013. Coat protein-mediated transgenic resistance of peanut ( *Arachis hypogaea* L .) to peanut stem necrosis disease through *Agrobacterium* -mediated genetic transformation. *Indian J Virol*. 24(2):205–213. doi:10.1007/s13337-013-0157-9.
- Nagaraj, Basavaraj S, Padmaja AS, Nagaraju N, Ramesh S. 2019. Identification of stable sources of resistance to mungbean yellow mosaic virus ( MYMV ) disease in mungbean [ *Vigna radiata* ( L .) Wilczek ]. *plant Genet Resour.(May)*:1–9. doi:10.1017/S1479262119000121.

Sharma J, Purohit R. 2020. Conformational behavior of coat protein in plants and association with coat protein-mediated resistance against TMV. *Brazilian J Microbiol.* 51:893–908. doi:10.1007/s42770-020-00225-0.

Soosaar JLM, Burch-smith TM, Dinesh-kumar SP. 2005. MECHANISMS OF PLANT RESISTANCE TO VIRUSES. *Nature.* 3:789–798. doi:10.1038/nrmicro1239.

Sulaiman AA, Sulaeman Y, Mustikasari N, Nursyamsi D, Syakir AM. 2019. Land Suitability Analysis and Sugar. *land.* 8(61):1–17.

Wei T, Huang T, Mcneil J, Nelson RS, Wang A. 2010. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication □ †. *Virology.* 84(2):799–809. doi:10.1128/JVI.01824-09.

Widyaningrum S, Pujiasih DR, Sholeha W, Harmoko R, Sugiharto B. 2021. Induction of resistance to sugarcane mosaic virus by RNA interference targeting coat protein gene silencing in transgenic sugarcane. *Mol Biol Rep.* doi:10.1007/s11033-021-06325-w.

Wu, Xiaoyun. et al. 2019. The Tug-of-War between Plants and Viruses: Great Progress and Many Remaining Questions. *mdpi.* 1:1–25. doi:10.3390/v11030203.



