



**PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP
PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum* L.) BEBAS VIRUS
SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA *IN-VITRO***

*The effect of Kind and Concentration Antiviral to Sugarcane Planlet
Production of Free Virus SCMV With invitro Culture*

T E S I S

Oleh

**Choirul Ainiyati, S.P
NIM 121520101004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP
PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum* L.) BEBAS VIRUS
SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA *IN-VITRO***

*The effect of Kind and Concentration Antiviral to Sugarcane Planlet
Production of Free Virus SCMV With invitro Culture*

TESIS

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk
menyelesaikan Program Studi Magister Agronomi
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

Choirul Ainiyati, S.P
NIM 121520101004

**PROGRAM STUDI MAGISTER AGRONOMI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

TESIS BERJUDUL

**PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP
PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum* L.) BEBAS VIRUS
SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA *IN-VITRO***

*The effect of Kind and Concentration Antiviral to Sugarcane Planlet
Production of Free Virus SCMV With invitro Culture*

Oleh

**Choirul Ainiyati, S.P
NIM 121520101004**

Pembimbing

Pembimbing Utama : Prof. Tri Agus Siswoyo, SP., M.Agr. Ph.D

Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP

PENGESAHAN

Tesis berjudul **“PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum* L.) BEBAS VIRUS SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA *IN-VITRO*”** telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Pertanian pada :

Hari :
Tanggal : Juni 2015
Tempat : Fakultas Pertanian, Universitas Jember

Dosen Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Prof. Tri Agus Siswoyo, SP.,M.Agr.Ph.D
NIP. 19700810 199803 1 001

Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P
NIP. 19650425 199002 2 002

Dosen Penguji

Penguji 1

Penguji 2

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D
NIP. 19600506 198702 1 001

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS
NIP. 196003171983032001

Mengetahui/Menyetujui
Ketua Program Studi,

Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS
NIP. 196003171983032001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Pertanian,

Dr. Ir. Jani Januar, MT.
NIP. 195901021988031002

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Choirul Ainiyati, S.P

NIM : 1231520101004

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah (tesis) dengan judul: **PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum L.*) BEBAS VIRUS SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA IN-VITRO**, benar-benar hasil karya sendiri kecuali jika disebut sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta 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 manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juni 2015
Yang menyatakan,

Choirul Ainiyati, S.P
NIM. 121520101004

ABSTRAK

Pengaruh Macam dan Konsentrasi Antiviral terhadap Produksi Bibit Tebu (*Saccharum Officinarum* L.) Bebas Virus SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) Secara *In-vitro*. Choirul Ainiyati, S.P. Program Studi Pascasarjana Agronomi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember.

Tebu (*Saccharum officinarum*) merupakan tanaman penghasil gula yang rentan terhadap penyakit yang disebabkan virus SCMV. Pengendalian penyebaran virus ini dilaksanakan dengan menggunakan antiviral. Tujuan percobaan adalah menentukan macam antiviral dan konsentrasi antiviral terbaik untuk menghasilkan planlet tebu bebas virus SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) secara *in-vitro* yang dibuktikan dengan uji DAS-ELISA dan RT-PCR. Percobaan ini dilakukan di laboratorium CDAST Universitas Jember dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 2 (dua) faktor. Faktor pertama macam antiviral yaitu ribavirin dan acyclovir. Faktor kedua konsentrasi antiviral yaitu 0 mg/l, 20 mg/l dan 40 mg/l. Hasil penelitian menunjukkan penggunaan antiviral jenis acyclovir dengan konsentrasi 20 mg/l memberikan respon terbaik terhadap produksi planlet tebu bebas virus dibandingkan dengan antiviral jenis ribavirin dengan konsentrasi 20 mg/l dan 40 mg/l. Dan telah diperoleh planlet tebu bebas virus SCMV secara *in-vitro* sebesar 100% berdasarkan uji DAS-ELISA dan RT-PCR.

Kata kunci : Tebu, Antiviral, SCMV.

SUMMARY

The effect of Kind and Concentration Antiviral to Sugarcane Seedlings Production Free of Virus SCMV invitro. Choirul Ainiyati, S.P. Agronomy Department Faculty of Agriculture, University of Jember.

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) is a sugar producing plants which susceptible to viral diseases SCMV. Controlling the spread of the virus was carried out by using antivirals. The purpose of the experiment is determining the kinds and concentrations of antiviral best to produce virus-free plantlets of sugarcane SCMV (Sugarcane Mosaic Virus) in in-vitro test as evidenced by DAS-ELISA and RT-PCR. The experiment was conducted in the laboratory of CDAST (Center For Development of Scient Advance) University of Jember using a completely randomized design (CRD), which consists of two (2) factors. The first factor is kind of antiviral consist of ribavirin and acyclovir. The second factor is the concentration of antiviral consist of 0 mg/l, 20 mg/l and 40 mg/l. The results showed that the use of antiviral type acyclovir at a concentration of 20 mg / l gave the best response to the production of virus-free plantlets of sugarcane compared with the antiviral ribavirin type with a concentration of 20 mg / l and 40 mg / l. And has acquired SCMV virus-free plantlets of sugarcane in vitro 100% based on test DAS-ELISA and RT-PCR.

Keywords: Sugarcane, Antiviral, Sugarcane Mosaic Virus

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini dengan judul **“PENGARUH MACAM DAN KONSENTRASI ANTIVIRAL TERHADAP PRODUKSI PLANLET TEBU (*Saccharum Officinarum L.*) BEBAS VIRUS SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) SECARA *IN-VITRO*”** di Laboratorium CDAST (*Central Development Advance of Science Technology*) Universitas Jember.

Penyusunan tesis ini dapat terlaksana tidak terlepas dari bantuan dan bimbingan yang berarti dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan terimakasih kepada:

1. Rektor, Pembantu Rektor I, dan Direktur Pascasarjana, Universitas Jember yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk menempuh pendidikan Program Pascasarjana serta melaksanakan kegiatan penelitian.
2. Direktur Proyek (PTPN XI) dan Tim peneliti dengan ketua Prof. Bambang Suguharto, D.Agr.Sc, yang telah memberikan kesempatan dan bantuan berupa material serta dedikasi yang tulus untuk proses pelaksanaan penelitian sehingga tesis tersebut dapat diselesaikan.
3. Ketua Program Studi Agronomi Program Pascasarjana, Universitas Jember yang telah memberikan bimbingan akademik kepada penulis.
4. Prof. Tri Agus Siswoyo, SP.,M.Agr.Ph.D, Dr. Ir. Parawita Dewanti, M.P., Ir.Sigit Soeparjono, MS., Ph.D., Prof. Dr. Ir. Sri Hartatik, MS masing-masing sebagai Dosen Pembimbing Utama, Dosen Pembimbing Anggota, Anggota Tim Penguji 1 dan Tim Penguji 2 dengan penuh kesabaran dan perhatian telah banyak memberikan petunjuk, bimbingan dan arahan sehingga penelitian ini dapat terlaksana.
5. Bapakku Darwis Purnomo, S.Pd dan Ibuku Nurul Nurdaeni, Abah Ichsan Mochamad Munadi, Lek Rahayu, Putriku Naditia Figuritma,

saudara/saudariku, Cindy, Imas, Galuh, *someone*, bu Dwi Soeparjono sekeluarga atas motivasi, dukungan dan doa yang tulus.

6. Rekan-rekan seangkatan 2012, tim CDAST UNEJ yang telah memberikan bantuan dan dorongan untuk menyelesaikan tesis.
7. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Semoga bantuan dan bimbingan dari saudara/saudari, Ibu/Bapak mendapat balasan yang baik dari Allah SWT.

Demikian penyusunan tesis ini sebagai laporan pertanggungjawaban penelitian dengan harapan tesis tersebut dapat bermanfaat bagi pengembangan pengetahuan dan informasi yang dapat digunakan sebagai acuan bagi para peneliti atau pihak yang terkait.

Jember, Juni 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PEMBIMBING.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
PRAKATA.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Sistematika dan Morfologi Tanaman Tebu (<i>Saccharum Officinarum</i>).....	4
2.2 Teknik Kultur <i>In-Vitro</i>	5
2.3 Penyakit Mosaik Tebu	7
2.4 Khemoterapi Antiviral.....	9
2.5 DAS ELISA	12
2.6 Hipotesis	13
III. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	14

3.3 Metode Penelitian	15
3.4 Pelaksanaan Penelitian	15
3.5 Parameter Pengamatan	21
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	23
4.1 Hasil Pemberian Antiviral Terhadap Pertumbuhan Vegetatif.....	23
4.2 Pengaruh Antiviral terhadap Produksi Planlet Tebu Bebas Virus SCMV	26
4.2.1 Pengaruh Interaksi Macam dan Konsentrasi Antiviral Produksi Planlet Tebu Bebas Virus SCMV	26
4.2.2 Pengaruh Macam Antiviral terhadap Produksi Planlet Tebu Bebas Virus SCMV	27
4.2.3 Pengaruh Konsentrasi Antiviral terhadap Produksi Planlet Tebu Bebas Virus SCMV	28
4.3 Hasil Deteksi <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV) dengan Metode DAS-ELISA (<i>Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	31
4.4 Hasil Uji Teknik <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> (RT-PCR).....	33
4.5 Pembahasan Umum	34
V. KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1 Kesimpulan.....	37
5.2 Saran	37
DAFTAR PUSTAKA	38
LAMPIRAN-LAMPIRAN	39

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Rangkuman hasil analisis ragam parameter utama	23
Tabel 4.2 Rata-rata panjang tunas planlet tebu yang dipengaruhi interaksi macam dan konsentrasi antiviral umur 3 minggu	24
Tabel 4.3 Rata-rata panjang tunas planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan macam antiviral	24
Tabel 4.4 Rata-rata jumlah tunas, panjang tunas, jumlah akar dan panjang akar planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan konsentrasi antiviral	25
Tabel 4.5 Data hasil pengujian metode DAS-ELISA pada kombinasi perlakuan jenis dan konsentrasi antiviral	30

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 4.1 Rata-rata panjang tunas planlet tebu umur 3 minggu yang dipengaruhi interaksi macam dan konsentrasi antiviral	26
Gambar 4.2 Rata-rata panjang tunas planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan macam antiviral	27
Gambar 4.3 Rata-rata jumlah tunas planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan konsentrasi antiviral.....	28
Gambar 4.4 Rata-rata panjang tunas planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan konsentrasi antiviral.....	29
Gambar 4.5 Rata-rata jumlah akar planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan konsentrasi antiviral.....	30
Gambar 4.6 Rata-rata panjang akar planlet tebu umur 3 dan 6 minggu yang dipengaruhi perlakuan konsentrasi antiviral.....	31
Gambar 4.7 Hasil visualisasi RT-PCR.....	34

DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Komposisi Media MS
- Lampiran 2. Hasil Analisis Varian Jumlah Tunas 3 Minggu
- Lampiran 3. Hasil Analisis Varian Jumlah Tunas 6 Minggu
- Lampiran 4. Hasil Analisis Varian Panjang Tunas 6 Minggu
- Lampiran 5. Hasil Analisis Varian Jumlah Akar 3 Minggu
- Lampiran 6. Hasil Analisis Varian Jumlah Akar 6 Minggu
- Lampiran 7. Hasil Analisis Varian Panjang Akar 3 Minggu
- Lampiran 8. Hasil Analisis Varian Panjang Akar 6 Minggu

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tebu adalah tanaman jenis rumput-rumputan yang dipanen sampai umur mencapai kurang lebih 1 tahun. Tanaman ini dapat tumbuh di daerah beriklim tropis dan subtropis. Di Indonesia tebu banyak dibudidayakan di pulau Jawa dan Sumatra. Tanaman tebu termasuk komoditi utama sebagai bahan baku gula, vetsin dan bioetanol. Pada tahun 2013 luas lahan di Jawa Timur mencapai 212.580 ha dengan produksi tebu 17,186 juta ton dengan rendemen 8.05 persen (Kadisbun Jatim, 2013).

Budidaya tanaman tebu juga memiliki kendala yaitu serangan penyakit, yang banyak merugikan secara ekonomis adalah penyakit mosaik (Hunsigi, 2001). Gejala dari penyakit mosaik pada tanaman tebu dapat dilihat secara morfologi pada daun yaitu garis-garis pendek berwarna kuning kehijauan latar belakang warna hijau hingga menyerupai gambaran mosaik yang tampak jelas pada daun muda (Comstock and Gilbert, 2009). Serangan *sugarcane mosaic virus* (SCMV) dilaporkan dapat menurunkan produksi gula tebu sekitar 30-40% dan bahkan dapat mencapai 80% (Reddy and Sreenivasulu, 2011). Menurut hasil survei PTPN XI (2015) tingkat serangan SCMV pada kebun bibit tebu mencapai 38,55 % perhektar.

Penyebaran penyakit mosaik di lahan dalam skala luas pada umumnya melalui perlakuan mekanis, transmisi oleh serangga (aphid) dan penggunaan bibit sakit (Comstock and Gilbert, 2009, Damayanti *et al.*, 2010; Hunsigi, 2001). Pengendalian virus masih terbatas dengan penggunaan varietas tahan (Zhang *et al.*, 2006). Pengendalian penyebaran virus paling efektif adalah penggantian bibit sakit dengan bibit sehat yang berasal dari stok bibit bebas penyakit (Balamuralikrishnan *et al.*, 2002, Reddy *et al.*, 2011). Menurut survei lapang di kebun PTPN XI Sukosari-Jatiroto Kabupaten Lumajang penggunaan bibit secara konvensional sering mengalami kendala terhadap serangan penyakit virus lebih dari 50 %, sedangkan bibit dari hasil perbanyakan tanaman melalui kultur jaringan belum dapat memastikan 100 % bebas dari virus. Hasil penelitian Rita Noveriza,

dkk (2012) bahwa hasil perbanyakan kultur meristem stek batang nilam menghasilkan 33,3 % tanaman bebas virus. Hal ini sama dengan hasil penelitian Putri, 2009 yang menyatakan bahwa perlakuan *Hot Water Treatment* 55 ° celcius selama 10 menit pada tebu varietas Ps.864 menurunkan tingkat keparahan penyakit dari 60% menjadi 12%. Oleh sebab itu diperlukan penelitian untuk penyediaan stok bibit tebu bebas virus melalui teknik kultur jaringan. Metode kultur jaringan meristem untuk bibit bebas virus antara lain meristem apikal (Naz *et al.*, 2009, Reddy *et al.*, 2011), embriogenesis somatik dan penambahan bahan khemoterapeutan (Balamuralikrishnan *et al.*, 2002). Bahan khemoterapeutan yang banyak digunakan sebagai terapi penyakit virus diantaranya adalah dithiouracil, ribavirin (Oana *et al.*, 2009) dan acyclovir (<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed>, 2013). Dengan banyaknya bahan khemoterapi yang ada, maka dalam penelitian ini menggunakan beberapa macam antiviral yaitu ribavirin dan acyclovir untuk mengetahui macam dan konsentrasi antiviral mana yang paling baik dalam menekan penyakit virus pada tebu secara kultur *in-vitro*.

Keberhasilan dari penelitian ini dapat diketahui dengan uji serologi melalui kandungan protein virus metode DAS- ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) dan metode uji asam nukleat virus dengan RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*).

1.2 Perumusan Masalah

Hasil perbanyakan tanaman tebu melalui kultur *in-vitro* belum dapat dipastikan 100 % bebas dari virus. Untuk mengurangi serangan penyakit virus dapat ditekan melalui perbanyakan planlet secara kultur jaringan apikal dan pemberian antiviral. Beberapa antiviral yang bisa digunakan yaitu ribavirin dan acyclovir. Namun belum diketahui berapa konsentrasi yang tepat untuk menekan virus.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

Menentukan macam antiviral dan konsentrasi antiviral terbaik untuk menghasilkan planlet tebu bebas virus SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) secara *in-vitro* yang dibuktikan dengan uji DAS-ELISA dan RT-PCR.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk menjadi acuan ilmiah pengadaan bibit tebu bebas virus melalui kultur jaringan dengan perlakuan media antiviral. Sehingga hasil penelitian ini dapat juga digunakan oleh perusahaan yang sudah memiliki laboratorium kultur jaringan untuk pengadaan bibit tebu bebas virus dalam skala besar.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sistematika dan Morfologi Tanaman Tebu (*Saccharum Officinarum* L.)

Tanaman tebu memiliki sistematika sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledone
Ordo	: Graminales
Famil	: Graminae
Genus	: Saccharum
Species	: <i>Saccharum officinarum</i> L.

Tanaman tebu terdiri dari akar, batang, daun dan bunga. Akar pada tanaman tebu berupa akar serabut yang bisa mencapai panjang 2 meter pada kondisi lingkungan yang optimum. Batang tebu biasanya tumbuh tegak lurus mencapai ketinggian antara 2,5 meter – 4 meter atau lebih. Batangnya tersusun beruas-ruas dan dibatasi oleh buku-buku ruas dimana terletak mata tunas untuk tumbuh menjadi kuncup tanaman baru, disamping itu juga terdapat mata akar untuk kehidupan kuncup baru tersebut. Daun tebu merupakan daun tidak lengkap yang tersusun dari pelepah daun dan helai daun. Disisi luar terdapat segitiga daun, sedangkan disisi dalam terdapat lidah daun. Selain itu juga terdapat bulu pada daun. Helai daun panjangnya bisa mencapai 1-2 meter dan lebarnya 2-7 cm sesuai dengan varietas dan kondisi lingkungan (Setyamidjaja dan Azharni, 1992). Seperti halnya famili *graminae*, bunga tebu tersusun dalam malai dan bentuknya piramida dengan panjang antara 50-80 cm. Tipe penyerbukan tanaman tebu adalah menyerbuk silang yang secara alami dibantu oleh angin. Dan, pembungaan terjadi setelah mencapai umur dewasa yaitu 12-14 bulan.

Tanaman tebu tergolong tanaman rumput-rumputan berumur kurang lebih 1 tahun dengan nama latin *Saccharum officinarum*. Di daerah Jawa Barat disebut Tiwu, di daerah Jawa Tengah dan Jawa Timur disebut Tebu atau Rosan. Menurut Setyamidjaja dan Azharni (1992) spesies *Saccharum officinarum* memiliki

kandungan sukrosa terbesar dan kandungan serat paling rendah dibanding spesies *Saccharum sinense*, *Saccharum barberi*, *Saccharum spontaneum*, dan *Saccharum robustum*. Sehingga, menjadi salah satu komoditas tanaman yang banyak dibudidayakan pada tropis dan subtropis, dimana setiap tahun memberikan sumbangan 60-70% gula dunia. Gula merupakan salah satu kebutuhan pokok masyarakat, baik untuk konsumsi maupun untuk industri. Di Indonesia tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) digunakan sebagai bahan baku utama untuk menghasilkan gula sukrosa.

Tanaman tebu varietas Pasuruan atau Ps. 864 sebelumnya dikenal dengan seri Ps. 86-10029, merupakan keturunan dari PR 1117 (polycross) yang dilepas Menteri Pertanian pada tahun 2004. Perkecambahannya varietas ini adalah sangat baik dengan anakan yang serempak, klenyekan mudah. Sifat dasar pembungaan adalah sedikit atau sporadis, tetapi akan menjadi lebat apabila ditanam pada lahan-lahan marginal, terganggu drainasenya dan atau kekurangan pupuk Nitrogen (karena respon terhadap N yang sangat tinggi). Walaupun terjadi pembungaan, karena diikuti munculnya siwil sekitar 3 mata pucuk, maka proses penggabusan akan dihentikan oleh adanya siwilan tersebut. Sehingga walaupun ditebang agak terlambat, Ps. 864 masih dapat bertahan. Pada lahan-lahan bertekstur ringan sampai berat, Ps. 864 masih cukup baik pertumbuhannya. Bahkan pada lahan tegalan dimana kondisi kering panjang terjadi, dijumpai keadaan tanaman tinggal 3-5 daun hijau, masih menunjukkan tingkat kelengasan batang yang cukup tinggi. Potensi produksi tebu cukup tinggi dengan rendemen sedikit dibawah Ps. 851. Tipe kemasakan terdapat kecenderungan pada kelompok tengah lambat. Kadar sabut berkisar 13% Ps. 864 menunjukkan tingkat toleransi kekeringan yang lebih tinggi dibandingkan Ps. 851. Untuk daerah tegalan dengan pola tanam awal penghujan varietas ini akan cocok dikembangkan (www.ditjenbun.pertanian.go.id, 2014)

2.2 Teknik Kultur *In-Vitro*

Teknik kultur in-vitro tanaman dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman dalam jumlah banyak dan bebas penyakit, demikian juga halnya pada

tanaman tebu. Teknik ini didasarkan pada kemampuan organ tanaman untuk berkembang menjadi tanaman lengkap yang dikenal sebagai totipotensi. Dalam kultur jaringan tanaman tebu, daun muda yang masih menggulung (*spindle leaf*) banyak digunakan sebagai eksplan, selain itu *apical meristem* juga sering digunakan. Ada beberapa tahapan yang harus dilalui dalam kultur jaringan tebu, yaitu tahap pembentukan kalus, pembentukan tunas, pembentukan akar dan aklimatisasi. Pembentukan kalus dari eksplan *spindle leaf* lebih cepat dibandingkan eksplan dari *apical meristem* (Sorory and Hosien, 2000). Perbanyakan secara *invitro* yang paling umum digunakan untuk tanaman tebu adalah dengan merangsang terbentuknya tunas-tunas lateral. Ada 2 metode produksi tunas lateral yang dilakukan yaitu kultur pucuk (*shoot culture* atau *shoot-tip culture*) dan kultur mata tunas (satu mata tunas: *single-node culture*; lebih dari satu mata tunas: *multiple-node culture*) (Erwin, 2009). Perbanyakan dengan kultur pucuk merupakan perbanyakan melalui meristem apikal atau meristem pucuk suatu tanaman.

Teknik kultur *invitro* memainkan peranan penting selama tiga dekade terakhir dalam mengatasi permasalahan infeksi virus pada tanaman. Keberhasilan teknik *invitro* untuk mendapatkan tanaman bebas virus diawali dari keberhasilan white tahun 1934 dengan penelitian virus tembakau yang menginfeksi tanaman tomat (Jemal, 2009). Menurut International Potato Center (1999) berbagai tanaman perkebunan yang diperbanyak secara vegetatif menggunakan metode standar eradikasi penyakit virus melalui kombinasi termoterapi dan kultur meristem.

Kultur meristem apikal adalah metode kultur jaringan yang paling *viable* dan banyak digunakan untuk mengeliminasi virus. Meristem adalah jaringan pada tumbuhan berwujud sekumpulan sel-sel puncak yang aktif melakukan pembelahan sel. Jaringan ini mudah ditemukan pada bagian titik-titik tumbuh batang maupun akar. Meristem di bagian ini disebut sebagai meristem primer, karena mengawali pertumbuhan biomassa (Nurheti, 2010). Metode yang paling umum dipakai adalah kultur meristem untuk mengeliminasi virus (Jemal, 2009). Tidak semua sel tanaman terinfeksi oleh patogen. Pada umumnya jaringan meristematis dan ujung

kecambah dari tanaman terinfeksi adalah jaringan tanaman bebas patogen. Kadangkala, hanya kubah meristem dengan satu atau dua daun primodial yang bebas virus (Gout, 1999).

Pada tanaman tebu, untuk pembentukan kalus digunakan media Murashige and skoog (MS) yang ditambah dengan hormone tanaman 2,4-D dengan berbagai konsentrasi. Pada umumnya tanaman tebu untuk pembentukan kalus digunakan media Murashige and skoog (MS) yang ditambah dengan hormon tanaman 2,4-D dengan berbagai konsentrasi.

2.3 Penyakit Mosaik Tebu

Penyakit mosaik tebu disebabkan oleh virus yang disebut sebagai *sugarcane mosaic virus* (SCMV). Gejala khas mosaik adalah adanya garis-garis pendek berwarna kuning kehijauan dengan latar belakang warna hijau daun hingga menyerupai gambaran mosaik pada daun, yang tampak makin jelas pada daun muda seperti yang terlihat pada Gambar 1. berikut ini :



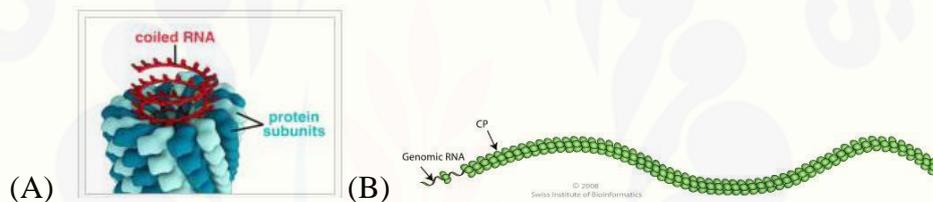
Gambar 1. Daun tebu terserang virus mosaik (Damayanti *et al.*, 2010).

Ada tiga penyakit utama tanaman tebu yang disebabkan oleh virus yaitu mosaik, streak mosaik dan yellow leaf. Penyakit mosaik pada tanaman tebu disebabkan oleh tiga jenis virus yaitu *sugarcane mosaic virus* (SCMV, Genus Potyvirus, family Potyviridae), *sorghum mosaic virus* (SrMV, genus Potyvirus, family Potyviridae) dan *sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV, genus belum diketahui, family Potyviridae) (Xie *et al.*, 2009).

Dari ketiga virus ini, virus SCMV telah tersebar meluas ke seluruh dunia. Penyakit SCMV dapat ditularkan secara mekanik maupun melalui serangga

vektor. Menurut Teakle *et al.*, (1989), kisaran inang penyakit SCMV meliputi kelompok *Poaceae*. Selanjutnya Brunt *et al.*, (1995) menyatakan bahwa kisaran inang alami SCMV adalah *Saccharum bicolor*, *Panicum* spp., *Eleusine* spp., *Setaria* spp., dan *Zea mays*. Menurut Brunt *et al.*, (1995), serangga vektor yang dapat menularkan SCMV adalah *Dactynotus ambrosiane*, *Hysteroneura setariae*, *R. Maidis*, *Toxopteragaminum* spp dan beberapa spesies *aphid*. Pada tanaman tebu infeksi SCMV terjadi secara sistemik pada seluruh fase pertumbuhan tanaman, dan yang lebih tinggi terjadi pada tanaman tebu muda.

Secara molekuler ciri dari partikel virus SCMV berbentuk filamen lentur dengan panjang 730 nm dan diameter 13 nm terdiri dari 5-6 % RNA rantai tunggal dan mempunyai berat molekul RNA sekitar $2,7-3,1 \times 10^6$ dalton seperti yang dapat dilihat pada Gambar.2 berikut ini:



Gambar 2. Struktur virus mosaik (A) *Coat protein* tersusun heliks, dan (B) struktur

virion lonjong (Teakle *et al.*, 1989).

Penyebaran dari virus SCMV ditransmisikan oleh serangga golongan *aphids* (kutu), bersifat *non persisten* serta menyebar melalui jaringan terbuka (Nursusilawati, 2011; Goodman *et al.*, 1998). Genus *Potyvirus* sendiri termasuk kelompok virus yang paling banyak menyerang tanaman, yaitu mencapai lebih dari 100 jenis virus. *Potyvirus* memiliki selubung protein yang berfungsi untuk penularan melalui kutu daun, pergerakan virus dari sel ke sel dan pergerakan virus secara sistemik, pembentukan selubung virus, dan replikasi virus (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Replikasi virus mempunyai genom +ssRNA terjadi melalui beberapa tahap, yaitu 1) virus masuk ke dalam sitoplasma tanaman inang, 2) komponen virus akan terpisah antara selubung protein dan asam nukleat, 3) RNA virus bergabung dengan ribosom tanaman inang dan sintesis polimerase untuk replikasi RNA, sehingga dihasilkan untai negatif RNA, 4) sintesis untai RNA

positif dan m-RNA protein selubung menggunakan untai RNA negatif sebagai cetaknya, 5) pembentukan sub-unit protein selubung dalam jumlah besar, dan 6) virion terbentuk melalui penggabungan antara untai positif RNA dengan protein selubung. Selanjutnya virus menyebar ke sel sekelilingnya melalui plasmodesmata (Akin, 2006).

Penyakit *streak mosaic* adalah penyakit baru pada pertanaman tebu di Indonesia dengan tingkat sebaran yang cukup luas khususnya di Jawa. Rekomendasi pengendaliannya masih terbatas pada penggunaan bibit sehat dan pembatasan penanaman varietas Ps. 864 yang berdasarkan pengamatan lapang terindikasi rentan lebih dari 50 persen (Puslit Sukosari PTPN XI Jatiroto, 2013). Penyakit mosaik dapat menyebabkan penurunan produktivitas sampai dengan 42 persen pada varietas yang rentan pada tingkat serangan lebih dari 50 persen (Goodman *et al.*, 2008).

2.4 Khemoterapi Antiviral

Khemoterapi adalah metode yang sangat tepat untuk memperoleh tanaman bebas virus antar sel dan jaringan tanaman (Oana *et al.*, 2009). Antiviral adalah bahan kimia yang mampu menghambat replikasi virus namun juga mampu meningkatkan resistensi tanaman terhadap penyakit virus. Bahan kimia antiviral banyak dimanfaatkan dalam kultur *in vitro* sebagai suplemen terapeutik dalam program integrasi terkontrol mengatasi penyakit virus tanaman (Nascimento, 2003). Banyak jenis bahan kimia telah diuji coba, namun tidak semuanya efektif. Beberapa jenis yang banyak dipakai adalah analog sintetik dari *guanosine* yaitu ribavirin (Al Maari *et al.*, 2012, Hauptmanova dan Polak, 2011, Krizan *et al.*, 2009, Oana *et al.*, 2009) dan *dithiouracil* (Loythala *et al.*, 2008, Wannakrairoj dan Gladpan, 2001).

Ribavirin (*1-beta-D-ribofuranosyl-1-H-1,2,4-triazole-3-carboxamide*) adalah bahan antiviral spektrum luas untuk melawan DNA atau RNA virus yang menyerang manusia, hewan maupun tanaman (Al Maari *et al.*, 2012) Ribavirin juga menghambat enzim RNA pada *coat protein* sehingga *translasi* mRNA akan sangat terganggu (Al Maari *et al.*, 2012, Oana *et al.*, 2009). Sebagai analog dari

adenine dan *guanine*, ketika ribavirin bergabung dalam RNA, maka akan berpasangan dengan uracil atau cytosine sehingga memacu terjadinya mutasi pada replikasi RNA virus. Terjadinya *hypermutsasi* akan berefek mematikan bagi virus (Elia *et al.*, 2008, Schinkel *et al.*, 2003).

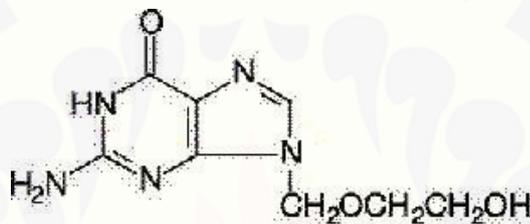
Beberapa hasil penelitian tanaman hortikultura dengan menggunakan ribavirin dan kultur jaringan meristem pada apel, plum, dan aprikot mampu mengeliminasi penyakit virus (Hauptmanova dan Polak, 2011). Pada tanaman pangan dan industri, telah berhasil dilakukan pada kentang, ubi, dan tebu (Al Maari *et al.*, 2012, Balamuralikrishnan *et al.*, 2002, Oana *et al.*, 2009). Keberhasilan khemoterapi pada kultur jaringan meristem tebu mencapai 65-100% tanaman bebas virus pada penambahan ribavirin mampu mengeliminasi 100% SCMV pada konsentrasi minimal 30 mg/L (nurmalasari, 2013)

Hasil penelitian Danci *et al.* (2012), pemberian ribavirin pada media kultur tanaman kentang menunjukkan perbedaan regenerasi sel pada pucuk tunas, panjang batang, jumlah tunas dan jumlah akar. Pada planlet yang ditanam pada media mengandung ribavirin menunjukkan pertumbuhan yang lebih lambat dari pada kontrol. Hal ini membuktikan bahwa ribavirin dapat mengakibatkan *phytotoxic* pada tanaman yakni dapat menghambat kegiatan sel tanaman bahkan dapat mempengaruhi sintesa RNA pada sel tanaman tergantung seberapa besar konsentrasi yang digunakan. Pemberian ribavirin dengan konsentrasi 60 mg/L, 80 mg/L, dan 100 mg/L juga menunjukkan gejala *phytotoxic* seperti kelainan bentuk daun, klorosis dan nekrosis pada daun dan seluruh bagian tunas anggur. Hasil penelitian Nurmalasari (2013) varietas NXI-6T dengan penambahan ribavirin 40 mg/L menunjukkan pertunasan yang sama baiknya dengan kontrol. Pertumbuhan tunas yang normal pada media induksi pertunasan menunjukkan bahwa pengaruh penghambatan pertumbuhan dari ribavirin bersifat temporer. Setelah tanaman dipindah ke media tanpa ribavirin maka potensi pertumbuhannya kembali normal.

Gejala fitotoksisitas pada kultur jaringan juga dapat diamati melalui organ daun yang menunjukkan gejala nekrosis (Budiarto *et al.*, 2011). Hansen *et al.*, 1985 menyatakan bahwa ribavirin konsentrasi 10-20 mg/L tidak menghambat

pertumbuhan namun menyebabkan klorosis ringan pada tanaman apel. Menurut Helliot *et al.*, 2004, gejala fitotoksisitas dapat berupa klorosis ringan, berat atau nekrosis tergantung patogenisitas virus.

Acyclovir adalah analog nukleosida sintetik aktif terhadap virus herpes dengan rumus molekul $C_8H_{11}N_5O_3$, dan berat molekul 225,20. Kelarutan maksimum dalam air pada $37^{\circ}C$ adalah 2,5 mg / mL. Analog guanosin efektif melawan virus mosaik kedelai emas, Chrysantemum virus B, dan Indian Citrus ringspot virus (Suzuki *et al.*, 2006). Nama kimia dari acyclovir adalah 9 - [(2-Hydroxyethoxy) metil] guanin, memiliki rumus struktur berikut:

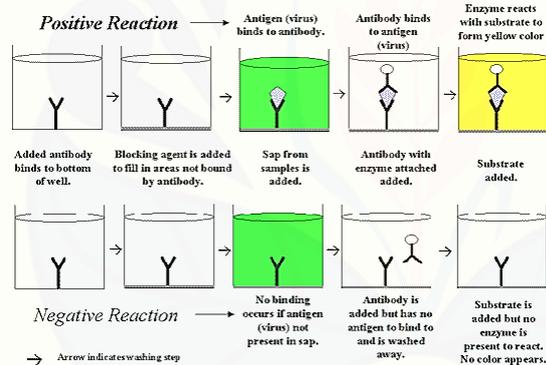


Gambar 3. Struktur kimia acyclovir. (Sumber: Wu *et al.*, 2004)

Mekanisme kerja dari acyclovir dilakukan dalam tiga cara: 1) penghambatan kompetitif polimerase DNA virus, 2) penggabungan ke dan pemutusan rantai DNA virus berkembang, dan 3) inaktivasi polimerase DNA virus (Wu *et al.*, 2004).

2.5 DAS ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Deteksi dan identifikasi virus SCMV dapat dilakukan dengan uji serologi kandungan protein virus dengan metode DAS - ELISA (*Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). Metode ini pertama kali dikembangkan oleh Clark dan Adam (1977). ELISA adalah suatu teknik deteksi dengan metode serologis yang berdasarkan atas reaksi spesifik antara antigen dan antibodi, mempunyai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi dengan menggunakan enzim sebagai indikator. Prinsip kerjanya adalah penilaian berdasarkan data antigen dan antibodi. Prinsip dasarnya adalah analisis interaksi antara antigen dan antibodi yang teradsorbsi secara pasif pada permukaan fase padat dengan menggunakan konjugat antibodi atau antigen yang dilabel enzim. Enzim ini akan bereaksi dengan substrat dan menghasilkan warna, seperti yang terlihat pada Gambar 4. berikut ini:



Gambar 4. Mekanisme reaksi pengikatan antigen-antibodi pada uji serologi DAS-ELISA (Crowther, 2001).

Gambar 4. warna yang timbul dapat ditentukan secara kualitatif dengan pandangan mata atau kuantitatif dengan penilaian absorbansi pada ELISA *plate reader* (Crowther, 2001). Kelebihan dari teknik ELISA adalah mampu mendeteksi virus pada konsentrasi rendah dengan konsentrasi 1-10 ng/ml (Crook dan Christopher, 1980), dapat diaplikasikan pada sampel pengujian dalam jumlah besar dan efisien, serta penggunaan antibodi dalam jumlah sedikit (Departemen Pertanian, 2009). Teknik deteksi serologi ini digunakan dalam penelitian Nurmalasari (2013) bahwa perlakuan khemoterapi menggunakan ribavirin

berhasil memperoleh 100% tanaman bebas virus dengan konsentrasi ribavirin minimal 30 mg/L. Hasil penelitian Narita (2015) uji DAS-ELISA pada tanaman propagasi menunjukkan bahwa keseluruhan tanaman propagasi yang bergejala mosaik bereaksi negatif terhadap antibodi SCMV, ditunjukkan dengan nilai rata-rata absorban sampel yang berada dibawah nilai *cut off* yaitu 0.107.

2.6 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah :

Didapat antiviral yang memberikan pengaruh terbaik dengan konsentrasi tertentu terhadap produksi planlet tebu bebas virus SCMV.

Diperoleh planlet tebu bebas virus SCMV secara *in-vitro* berdasar uji DAS-ELISA dan RT-PCR.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium CDAST (*Center Development Of Advance Science Technology*), Universitas Jember dimulai bulan Desember 2013 sampai dengan bulan Agustus 2014.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan

Pada penelitian ini ada empat bahan yang digunakan yaitu:

1. Bahan tanam yang digunakan dalam percobaan ini adalah pucuk tebu varietas Ps.864 (Pasuruan 864) umur 5-6 bulan yang berasal dari kebun PT. Perkebunan Nusantara XI (Persero) kebun Jatiroto Kabupaten Lumajang.
2. Bahan media pertumbuhan yang digunakan adalah *Murashige and Skoog* (MS) standart (Lampiran 1) + PVP 300 mg/L digunakan untuk perbanyakan, media MS0+PVP 300 mg/L ditambah stok antiviral yaitu Ribavirin dan Acyclovir sesuai perlakuan 20 mg/L dan 40 mg/L digunakan untuk mengeliminasi virus SCMV, media MS0+PVP 300 mg/L ditambah arginin 50 mg/L, BA 2 mg/L, PVP 300 mg/L dan kinetin 0,5 mg/L digunakan untuk induksi pertunasan, dan media $\frac{1}{2}$ MS0 di tambah vitamin tanpa hormon digunakan untuk induksi perakaran. *Aquadest*, alkohol 70 % dan 90 %, *ethanol absolute*.
3. Bahan ELISA Kit dari AC Diagnostic. Inc terdiri dari *mikroplate*, *coating antibody*, *coating buffer*, *PBST powder*, *Tween-20*, *SB 1 Buffer*, *AP enzyme conjugate*, *PNP Tablets*, *positif control* dan *negative control*).
4. Bahan RT-PCR menggunakan Kit yaitu *buffer*, *dNTPs* yang terdiri dari *d CTP*, *d TTP*, *d ATP*, *d GTP*, 2 *DNA primer*, *Taq DNA Polymerase* (*Reverse Transcriptase*) *m RNA*.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan *digital*, *magnetic stirrer*, pH meter, *microwave*, *autoclave*, *ependorf*, *beaker glass*, *Erlenmeyer*, gelas ukur, cawan petri, mikropipet, tip, botol ukur, sendok pengaduk, mortar, pastel, scalpel, syring, gunting, penggaris, pinset, dan Bunsen, sentrifuge, vortex, oven, *freezer* -80 derajat, *freezer* -20 derajat. Elisa reader, alat RT-PCR dan Geldog.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial yang terdiri dari 2 (dua) faktor yaitu macam dan konsentrasi antiviral. Faktor macam antiviral terdiri dari 2 taraf perlakuan yaitu (A1) Acyclovir dan (A2) Ribavirin. Faktor konsentrasi antiviral terdiri dari 3 taraf perlakuan yaitu konsentrasi 0 mg/L, konsentrasi 20 mg/L dan konsentrasi 40 mg/L didapatkan 6 (enam) kombinasi perlakuan di ulang 4 (empat) kali. Untuk mengetahui pengaruh macam dan konsentrasi pada masing-masing antiviral dilakukan uji F dan untuk mengetahui perbedaan masing-masing perlakuan maka dilakukan uji banding (BNJ) α 5 % pada parameter pengamatan jumlah tunas, panjang tunas, jumlah akar dan panjang akar.

Adapun keberhasilan eliminasi virus SCMV dapat diketahui melalui uji serologis dengan DAS-ELISA dan uji RT-PCR.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini menggunakan media perbanyakan yang terdiri dari empat media yaitu media MS0, media MS0 dengan antiviral, media pertunasan, dan media perakaran. Adapun cara pembuatannya sebagai berikut ini:

1. Media MS0 : Pembuatan media MS0+PVP 300 mg/L dilakukan dengan cara memipet stok A-F sesuai kebutuhan (Lampiran 1) dicampur pada *beaker glass*, ditambah sukrosa dan *aquades*, kemudian distirer dan diukur pH 6,2. Selanjutnya agar kuljar dimasukan diaduk dan dimasukkan ke *microwave* selama 1 menit kemudian diaduk lagi dan dimasukkan lagi ke

microwave selama 2 menit mendidih. Media siap dimasukkan pada botol kultur selanjutnya disterilisasi menggunakan *autoclave* pada *temperature* 121⁰C, tekanan 15-17,5 psi dengan waktu antara 20 menit. Setelah dingin disimpan pada ruang inkubasi gelap selama 3-5 hari kemudian baru media siap digunakan.

2. Media MS0 dengan Antiviral : Pembuatan media MS0+PVP 300 mg/L dengan cara memipet stok A-F sesuai kebutuhan (Lampiran 1), kemudian ditambah dengan ribavirin dengan konsentrasi 20 mg/L dan 40 mg/L, Acyclovir dengan konsentrasi 20 mg/L dan 40 mg/L serta tanpa antiviral untuk kontrol. Adapun caranya sebagai berikut:

a). Pembuatan stok khemoterapi acyclovir dan ribavirin 10.000 mg/L dengan cara menghaluskan acyclovir/ribavirin kemudian ditimbang 0,1 gram lalu dimasukkan ke botol valcon 50 ml. Selanjutnya didalam LAF ditambahkan ethanol absolute 35 ml lalu di vortex, setelah homogen ditambahkan *aquadest* steril hingga volume mencapai 50 ml lalu divortex sampai homogen.

b). Pembuatan media antiviral acyclovir dan ribavirin dengan memasukkan semua bahan MS standart, vitamin dan PVP dicampur pada *beaker glass*, ditambah sukrosa, kemudian distirer dan diukur pH 6,2. Selanjutnya ditambah dengan *phytagel* diaduk sampai homogen dan dimasukkan ke *microwave* selama 1 menit kemudian dimasukkan lagi ke *microwave* selama 2 menit sampai mendidih. Selanjutnya media yang sudah siap dibotol kultur disterilisasi menggunakan *autoclave* pada *temperature* 121⁰C tekanan 15-17,5 psi dengan waktu antara 20 menit, setelah suhu media 37⁰ ditambahkan larutan antiviral dari stok yang sudah dibuat disesuaikan dengan perlakuan yaitu 20 mg/L dan 40 mg/L.

3. Media Pertunasan : Pembuatan media ini dengan memasukkan bahan MS standart (Lampiran 1) ditambah PVP 300 mg/L, arginin 50 mg/L, BA 2 mg/L, PVP 300 mg/L, kinetin 0,5 mg/L dan ditambah sukrosa dan aquades yang dicampur pada *beaker glass*, kemudian distirer dan diukur pH 6,2. Selanjutnya ditambah dengan *phytagel* diaduk sampai homogen dan

dimasukkan ke *microwave* selama 1 menit kemudian dimasukkan lagi ke *microwave* selama 2 menit sampai mendidih. Selanjutnya media yang sudah siap dibotol kultur disterilisasi menggunakan *autoclave* pada *temperature* 121⁰C tekanan 15-17,5 psi dengan waktu antara 20 menit, setelah itu media diinkubasi gelap selama 3-5 hari dan media pertunasan siap digunakan.

4. Media Perakaran : Pembuatan media ini dengan cara memasukkan bahan ½ MS standart di tambah vitamin tanpa hormon dicampur pada *beaker glass*, ditambah sukrosa dan aquades, kemudian distirer dan diukur pH 6,2, selanjutnya ditambah dengan *phytagel* diaduk sampai homogen dan dimasukkan ke *microwave* selama 1 menit kemudian dimasukkan lagi ke *microwave* selama 2 menit sampai mendidih. Selanjutnya media yang sudah siap dibotol kultur disterilisasi menggunakan *autoclave* pada *temperature* 121⁰C tekanan 15-17,5 psi dengan waktu antara 20 menit, setelah itu media diinkubasi gelap selama 3-5 hari dan media pertunasan siap digunakan.

3.4.1 Cara Penelitian

Pada penelitian ini pengambilan eksplan dilakukan dengan dua tahapan yaitu pertama mengambil pucuk tebu Ps. 864 di kebun PTPN XI yang berumur 5-6 bulan yang menunjukkan gejala atau serangan mosaik secara morfologi dan tahap kedua didalam LAF pucuk tebu dari lapang dicelup pada alcohol 70 % kemudian dibakar dan dikelupas satu keliling sampai diperoleh apikal berukuran 0,8-1,2 cm.

Apikal di tanam pada media pertunasan selama 8 (delapan) minggu pada ruangan dengan temperatur 25 ± 2^0 C dan photoperiode 16 jam. Setelah 8 (delapan) minggu pada media pertunasan, planlet dipindahkan ke media MS untuk menginduksi perakaran dan ditumbuhkan pada ruangan dengan temperatur 25 ± 2^0 C dan photoperiode 16 jam selama 4 (empat) minggu.

Planlet dengan ukuran +/- 2 cm ditanam pada media antiviral sesuai perlakuan selama 6 (enam) minggu diamati parameter pertumbuhan vegetatifnya kemudian di pindah ke media MS0+Glutamin 1mg/l selama 4

(empat) minggu kemudian diambil sampel untuk uji serologi DAS-ELISA dan molekuler RT-PCR.

3.4.2 Uji Serologi DAS- ELISA

Pengujian serologi DAS-ELISA dilakukan untuk mengetahui keberhasilan dari pemberian antiviral dilakukan dalam tiga tahapan sebagai berikut ini:

1. Preparasi Sampel

Menimbang sampel seberat 0,2 gram dimasukkan kedalam mortar dingin. Sampel digerus sampai halus dengan bantuan nitrogen cair. Setelah itu, masing-masing sampel, *positive control* dan *negative control* dilarutkan dengan SBI *buffer* dengan perbandingan 1:3.

2. Pelaksanaan Uji DAS-ELISA

Pelaksanaan uji DAS-ELISA terbagi dalam 4 tahapan yaitu:

1. Tahap ke-1: Tahapan ini digunakan 1 buah *mikroplate* yang masih steril kemudian memasukkan 100 μ l larutan *coating plate (antibody)* pada tiap-tiap *mikroplate*. Mikroplate diinkubasi pada suhu 4⁰C selama semalam atau 21-24⁰C selama 4 jam dalam *humid box (mikroplate dilapisi dengan aluminium foil agar kedap cahaya)*.
2. Tahap ke-2: Kelebihan larutan *coating plate (antibody)* didalam *mikroplate* dibuang. Dilakukan pembilasan 4-6 kali dengan larutan PBST *buffer* sebanyak 100 μ l ke dalam *mikroplate*. Selanjutnya ditambahkan larutan sampel (antigen) pada masing-masing lubang *mikroplate, positive control* dan *negative control*. Diinkubasi pada suhu 4⁰C selama semalam atau pada suhu ruang selama 2,5 jam dalam *humid box*.
3. Tahap ke-3: Kelebihan larutan *coating plate (antibody)* didalam *mikroplate* dibuang. Kemudian dilakukan pembilasan 4-6 kali dengan larutan PBST *buffer* sebanyak 100 μ l ke dalam mikroplate. Berikutnya ditambahkan larutan *enzyme conjugate* 100 μ l ke dalam *mikroplate*. Diinkubasi dengan menyimpan pada *humid box* selama 2,5 jam pada suhu ruang.

4. Tahap ke-4: Kelebihan larutan *coating plate* (*antibody*) didalam *mikroplate* dibuang. Kemudian dilakukan pembilasan 4-6 kali dengan larutan PBST *buffer* sebanyak 100 μ l ke dalam *mikroplate*. Berikutnya ditambahkan larutan *enzyme conjugate* 100 μ l ke dalam *mikroplate*. Berikutnya ditambahkan larutan substrat PNP 100 μ l ke dalam masing-masing lubang *mikroplate* dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu ruang.

3. Interpretasi Hasil DAS-ELISA

Interpretasi hasil DAS-ELISA dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, dengan melihat perubahan warna menjadi kuning pada reaksi pengujian di *mikroplate* jika sampel yang diuji mengandung virus. Semakin tinggi intensitas warna yang terbentuk, maka semakin tinggi pula konsentrasi virus yang terdapat pada sampel. Secara kuantitatif berdasarkan nilai absorbansi yang diukur dan terekam pada kertas hasil *print out* alat ELISA *reader* dengan panjang gelombang 405 nm.

Penentuan sampel positif terinfeksi dilakukan dengan cara yaitu metode *cut off value*, dengan cara menentukan batas nilai negatif dan positif berdasarkan rata-rata nilai absorbansi pada sampel tanaman sehat. Pengujian dengan metode DAS-ELISA menggunakan *cut off* sebagai nilai batas untuk menentukan kriteria positif terinfeksi atau negatif. Sesuai dengan *protocol Bioreba*, (2014) penentuan nilai *cut off* didasarkan pada rata-rata nilai absorbansi tanaman sehat, kontrol negatif atau buffer SB1 adalah nilai ambang yang lebih akurat dari pada berdasarkan tiga kali absorbansi tanaman sehat. Oleh karena itu pada penelitian ini dipergunakan perhitungan *cut off* berdasarkan nilai rerata absorbansi tanaman sehat. Penentuan kriteria tanaman terinfeksi virus SCMV berdasarkan pada nilai rata-rata absorbansi yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan nilai *cut off* (Nurmalasari, 2013). Rumus penentuan nilai *cut off* :

$$\text{Cut off} = (\text{Mean} + (3 * \text{stdev})) * 1.1$$

Atau

$$\text{Cut off} = (\text{Mean} + (3 * \text{stdev})) + 10 \%$$

Presentasi eliminasi *Sugarcane Mosaik Virus* (SCMV) ditentukan berdasarkan hasil deteksi di DAS-ELISA terhadap sampel dan tebu (*S. officinarum*) yang telah diberi perlakuan. Untuk mengukur jumlah persentase eliminasi yang terjadi pada tanaman digunakan rumus :

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

Keterangan:

P: Persentase eliminasi

n: Jumlah tanaman positif ELISA

N: Jumlah tanaman yang diuji

(Sumber: Widianingsih, 2009).

3.4.3 Deteksi RT-PCR

Deteksi tingkat molekuler juga bisa menggunakan metode uji asam nukleat virus dengan RT-PCR (*Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*). Untuk mengetahui keberhasilan pemberian antiviral dilakukan dalam dua tahap sebagai berikut ini:

1. Ekstraksi RNA

Menimbang sampel tebu 0,1 gram dihaluskan dengan nitrogen cair kemudian dimasukkan ke dalam *ependorf* dengan nitrogen cair, ditambah 700 µl *buffer* SL disentrifuge 2', 12.000 rpm diambil *supernatan* disaring dengan RNase free filter coloums CS yang dibawahnya adalah 2 ml *collection tube* disentrifuge 2', 12.000 rpm, *supernatan* diambil dipindah ke *ependorf* disentrifuge kembali 2', 12.000 rpm ditambah 0,4xVol.*supernatan* dengan 96 %-100 % ethanol, kemudian transfer ke RNase spin coloum CR3 pleed in*collection tube* 2 ml disentrifuge 15", 12.000 rpm kemudian *supernatant* dibuang diletakkan kembali ke CR3 (baru) pada *collection column* ditambah *buffer* RW1 350 µl disentrifuge 15", 12.000 rpm, dibuang *supernatan*, *filter* letakkan lagi pada *collection tube* ditambah 10 µl DNase I stok solution pada 70 µl *buffer* RDD campur ditambah DNase *working solution* 80 µl dibagian tengah CR3 inkubasi 15' suhu ruang kemudian ditambah 350 µl *buffer* RW I untuk spin CR3 disentrifuge 15", 12.000

rpm dibuang *supernatan* ditambah 500 µl *buffer* RW untuk *spin* CR3 *column* disentrifuge 15", 12.000 rpm dibuang *supernatan*, disentrifuge 2', 12.000 rpm, dipindah ke *spin column* 1,5 ml ditambah 50 µl *RNAse free water* diinkubasi 2' suhu ruang, disentrifuge 1', 12.000 rpm setelah disimpan minus 80 derajat diukur konsentrasi RNA yang direverse dengan nanodrop.

2. RT-PCR

Menurut (Haider *et al.*, 2011) pada RT-PCR ada tiga tahapan yaitu tahap pertama adalah *reverse transcription* (RT) atau transkripsi balik dimana RNA ditranskripsi balik menjadi c-DNA menggunakan enzim reverse transcriptase dan primer. Tahap kedua adalah denaturasi dsDNA at 95⁰ C, pada tahap ini dua untai DNA akan terpisah dan primer dapat mengikat pada untai tersebut. Tahap ketiga adalah amplifikasi PCR yang merupakan proses dimana dilakukannya perpanjangan DNA menggunakan primer yang memerlukan Taq DNA polymerase yang termostabil, biasanya pada suhu 72⁰ C, yang merupakan suhu optimal untuk aktifitas enzim *polymerase*. Produk PCR dapat dideteksi dengan elektroforesis pada gel agarosa 1%.

3.5 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan dilakukan untuk mendapatkan data utama dan data pendukung sebagai berikut:

1. Data Utama : Pengamatan pada pertumbuhan vegetatif dilakukan untuk mengetahui efek *phytotoxic* dari antiviral yang diberikan. Adapun parameter yang bisa diamati sebagai berikut:
 1. Jumlah Tunas: Dihitung setelah muncul tunas mulai 1cm panjangnya.
 2. Panjang Tunas: Dihitung menggunakan rerata jumlah tunas tertinggi planlet tebu yang sudah melewati media perlakuan antiviral, media pertunasan dan media perakaran.
 3. Jumlah Akar: Dihitung setelah tanaman muncul akar 1cm.
 4. Panjang Akar: Dihitung menggunakan rerata jumlah akar planlet tebu yang sudah melewati media perlakuan antiviral, media pertunasan dan media perakaran.

2. Data Pendukung : Untuk mengetahui ada tidaknya virus SCMV pada planlet tebu dilakukan uji DAS ELISA dan RT-PCR dari sampel tanaman in vitro dan invivo tebu.

