

RT-2015-0300

LAPORAN AKHIR

Insentif Riset SINas 2015

Judul Topik Penelitian yang diusulkan

**Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas dan Tahan
Sugarcane Mosaic Virus melalui Penerapan Teknologi
*Pathogen-Derived Resistance***

Bidang Prioritas Iptek:

10. Teknologi Pangan
10.03. Riset Pengembangan Perkebunan

Jenis Insentif Riset :

Riset Terapan (RT)

UNIVERSITAS JEMBER
Jl. Kalimantan 37 Kampus Tegalboto Jember 68121
30 Nopember 2015

LEMBAR PENGESAHAN LAPORAN AKHIR

Judul Topik Penelitian Insentif Riset SINas Tahun 2015:

Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas dan Tahan *Sugarcane Mosaic Virus* melalui Penerapan Teknologi *Pathogen-Derived Resistance*

Pengusul wajib memilih dengan melingkari nomor yang sesuai untuk hal berikut,

Bidang Prioritas Iptek:

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| ①. Teknologi Pangan | 5. Teknologi Informasi dan Komunikasi |
| 2. Teknologi Kesehatan dan Obat | 6. Teknologi Pertahanan dan Keamanan |
| 3. Teknologi Energi | 7. Teknologi Material |
| 4. Teknologi Transportasi | |

Jenis Insentif Riset :

- | | |
|-----------------------|---|
| 1. Riset Dasar (RD) | 3. Riset Peningkatan Kapasitas Iptek Sistem Produksi (KP) |
| ②. Riset Terapan (RT) | 4. Percepatan Difusi dan Pemanfaatan Iptek (DF) |

Cara Pelaksanaan Kegiatan/ Riset :


- ①. Non Konsorsium (Individual)
2. Konsorsium Riset (KR)

Lokasi Penelitian: Laboratorium CDAST Universitas Jember

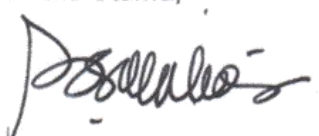
Keterangan Lembaga Pelaksana/Pengelola Penelitian	
A. Lembaga Pelaksana Penelitian	
Nama Peneliti Utama	Prof. Ir. Bambang Sugiharto, M.Agr. Ph.D
Nama Lembaga/Institusi	Lembaga Penelitian Universitas Jember
Unit Organisasi	CDAST-Divisi Biologi molekuler dan Bioteknologi
Alamat	Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegalboto Jember
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	0331-321825/0811350314/0331-321825 bbsghrt@yahoo.com & sugiharto.fmipa@unej.ac.id
B. Anggota Mitra	
Nama Pimpinan Lembaga/ Mitra Industri	Ir. Adig Suwandi, MSc
Nama Lembaga/ Mitra Industri	Bidang Penelitian dan Pengembangan Usaha PT. Perkebunan Nusantara XI
Alamat	Jl. Merak No. 1 Surabaya
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	Tel : 031-352-1074, 031-352-1074

Rekapitulasi Biaya

No.	Uraian	Jumlah (Rp)
1.	Gaji dan Upah	60.000.000,-
2.	Bahan Habis Pakai	100.000.000,-
3.	Perjalanan (tidak untuk perjalanan luar negeri)	20.000.000,-
4.	Lain-Lain	20.000.000,-
	Jumlah biaya tahun yang diusulkan	200.000.000,-

Ketua Lembaga Penelitian
Universitas Jember

Prof. Dr. Achmad Subagyo, M.Agr
NIP.19660517992011001

Jember, 30 Nopember 2015
Peneliti Utama,


Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, MSc
NIP.195510221982121001

Ringkasan / Executive summary

Peningkatan kualitas dan kuantitas produk tebu perlu dilakukan untuk mencapai swasembada gula nasional. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu peningkatan rendemen gula melalui produksi benih unggul tebu. Meskipun penelitian terakhir menunjukkan adanya keberhasilan produksi benih unggul tebu produk rekayasa genetika (PRG) toleran kekeringan dan rendemen gula tinggi, namun permasalahan yang ditemui adalah rawannya benih tebu terhadap kontaminasi dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh virus tebu terutama *sugarcane mosaic virus* (ScMV). Oleh karena itu diperlukan upaya penanganan dan pencegahan yang tepat untuk meminimalkan penyebaran dan penekanan serangan ScMV diantaranya dengan penggunaan benih bebas dan tahan virus. Beberapa teknik yang umum dilakukan adalah teknologi pemuliaan melalui pemanfaatan bioteknologi seperti kemoterapi untuk menghasilkan benih bebas virus dan teknik Pathogen-derived resistance (PDR) ataupun teknik *gene silencing* (RNAi) untuk menghasilkan benih tahan virus berbasis Coat Protein virus. Meskipun teknologi tersebut telah banyak diterapkan pada beberapa spesies tanaman, namun teknologi ini belum banyak diterapkan untuk menghasilkan benih unggul tebu. Oleh karena itu melalui penelitian ini dapat diketahui informasi tentang coat protein ScMV yang menyerang tebu, diperoleh benih tebu bebas ScMV melalui kemoterapi ribavirin dan acyclovir, diperoleh plasmid-DNA pengkode coat-protein ScMV, diperoleh antibodi poliklonal untuk deteksi penyakit ScMV, dan diperoleh prototype benih tebu PRG yang bebas dan tahan ScMV melalui transformasi gen coat protein-ScMV.

Untuk mencapai tujuan tersebut maka dilakukan penelitian dan berikut ini adalah ringkasan hasil penelitian yang telah dilakukan sampai dengan tahun ke 2. Pada tahun I (pertama) dilakukan survei lapangan dan penentuan insidensi penyakit ScMV di kebun tebu milik PT. Perkebunan Nusantara XI (PTPN XI). Hasil survey menunjukkan bahwa beberapa varietas tebu yang ditanam telah terserang ScMV dengan tingkat serangan sampai dengan 80% seperti varietas PS881, VMC, dan Cokro. Pengembangan bibit tebu bebas ScMV melalui kultur jaringan dengan perlakuan kemoterapi ribavirin dan acyclovir mampu mengembangkan bibit tebu bebas virus ScMV yang telah dikonfirmasi dengan analisa DAS-ELISA dan RT-PCR. Namun demikian, bibit tebu bebas ScMV tersebut masih dimungkinkan terinfeksi kembali ScMV, sehingga dikembangkan tanaman tebu tahan (*resistant*) ScMV melalui transformasi genetik menggunakan gen penyandi untuk coat protein. Pada tahun ke 2 telah dilakukan isolasi (*cloning*) DNA pengkode (penyandi) coat protein dari daun tebu yang terinfeksi ScMV. Isolasi DNA menemukan cDNA penyandi coat protein sebesar 900 bp dan analisa bioinformatika menunjukkan kesamaan tinggi dengan DNA-coat protein ScMV isolat dari Argentina dan China. Untuk pembuatan antibodi poliklonal, cDNA-coat protein dikonstruksi pada vektor ekspresi pET28 (Invitrogen) dan digunakan untuk produksi coat protein rekombinan. Saat ini sedang dilakukan produksi protein rekombinan dan pembuatan antibodi poliklonal dilakukan dengan menyuntikkan protein rekombinan pada tubuh kelinci. Selain itu untuk merakit tebu tahan terhadap ScMV juga dilakukan konstruksi cDNA-coat protein pada vektor pRI101-ON (Takara) dan pGreenII 0179 (SnapGene). Konstruksi vektor pRI-ON dan vektor pGreen ditujukan untuk merakit tebu tahan ScMV dengan teknik PDR dan RNAi. Saat ini kedua konstruksi ekspresi tersebut telah tersedia dan siap digunakan untuk transformasi genetik menggunakan eksplant kultur jaringan tebu.

Pada tahun ke 3 (2016) akan dikembangkan metoda deteksi infeksi ScMV menggunakan antibodi poliklonal dan transformasi genetik untuk merakit tebu tahan ScMV. Pada akhir tahun ke 3 diharapkan dapat diperoleh prototype tebu tahan ScMV dan metoda deteksi ScMV secara cepat dan akurat menggunakan antibodi poliklonal.

Kata Kunci: Sugarcane Mosaic Virus (ScMV), coat protein ScMV, tebu bebas ScMV, tebu tahan ScMV, metoda deteksi ScMV dengan antibodi poliklonal.

Kata Pengantar

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, atas rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Laporan Penelitian yang berjudul “Inovasi Benih Unggul Tebu Bebas dan Tahan *Sugarcane Mosaic Virus* melalui Penerapan Teknologi *Pathogen-Derived Resistance*”. Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan Surat Keputusan KEPUTUSAN MENTERI RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI REPUBLIK INDONESIA NOMOR 147/M/Kp/IV/2015 tertanggal 5 April 2015 dengan sumberdana Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara Tahun Anggaran 2015.

Tersusunnya Laporan penelitian ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Drs. Moh. Hasan, Ph.D selaku Rektor Universitas Jember
2. Prof. Dr. Achmad Subagyo, M.Agr. selaku Ketua Lembaga Penelitian Universitas Jember
3. Ir. Adig Suwandi, MSc selaku Ketua Bidang Penelitian dan Pengembangan Usaha PT. Perkebunan Nusantara XI yang juga merupakan mitra penelitian kami, serta
4. Semua pihak yang telah membantu dalam penulisan Laporan Penelitian ini.

Penulis berharap semoga laporan kemajuan ini memberikan manfaat bagi para penggunanya.

Jember, Nopember 2015

Penulis

Daftar Isi

	Halaman
Lembar Identitas dan Pengesahan.....	1
Ringkasan / Abstrak.....	2
Kata Pengantar.....	3
Daftar Isi.....	4
BAB 1.PENDAHULUAN.....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT.....	7
BAB 4. METODE.....	8
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	10
BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.....	18
6.1 Kesimpulan.....	18
6.2 Saran.....	18
DAFTAR PUSTAKA.....	18
LAMPIRAN.....	21

BAB 1. PENDAHULUAN.

1.1 Latar Belakang

Peningkatan kualitas dan kuantitas produk tebu perlu dilakukan untuk mencapai swasembada gula nasional. Salah satu upaya yang dapat dilakukan yaitu peningkatan rendemen gula yang baik melalui produksi benih unggul tebu. Meskipun penelitian terakhir menunjukkan adanya keberhasilan produksi benih unggul tebu dengan tebu PRG toleran kekeringan dan rendemen gula yang cukup baik, namun permasalahan yang ditemui adalah rawannya benih tebu terhadap kontaminasi dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh virus tebu terutama *sugarcane mosaic virus* (SCMV). Oleh karena itu diperlukan upaya penanganan dan pencegahan yang tepat untuk meminimalkan penyebaran dan penekanan serangan SCMV diantaranya dengan penggunaan benih bebas dan tahan virus. Beberapa teknik yang umum dilakukan adalah teknologi pemuliaan melalui pemanfaatan bioteknologi seperti kemoterapi untuk menghasilkan benih bebas virus serta teknik *Pathogen-derived resistance* (PDR) dan *gene silencing* (RNAi) untuk menghasilkan benih tahan virus berbasis *Coat Protein* virus. Meskipun teknologi tersebut telah banyak diterapkan pada beberapa spesies tanaman, namun teknologi ini belum banyak diterapkan untuk menghasilkan benih unggul tebu. Oleh karena itu melalui penelitian ini dapat diketahui informasi tentang *Coat Protein Sugarcane Mosaic Virus* yang menyerang tebu, diperoleh benih tebu bebas SCMV melalui kemoterapi, diperoleh plasmid untuk keperluan transformasi gen cp-SCMV berbasis *Agrobacterium*-mediated plant transformation dan diperoleh benih unggul tebu yang bebas dan tahan SCMV.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

Peningkatan kualitas dan kuantitas produk tebu terus dilakukan mulai dari hilir sampai hulu. Di sektor hilir, upaya peningkatan dilakukan dengan melakukan seleksi dan pengembangan benih unggul tebu yang mampu menghasilkan tebu dengan rendemen gula yang baik. Salah satu di antaranya melalui teknologi tebu transgenik seperti yang ditemukan oleh Miswar *et al.* (2007) dan Sugiharto & Safitri (2011) dengan memanfaatkan sinergisme aktivitas gen *Sucrose Phosphate Synthase* (SPS) dan gen *Sucrose Transporter* (SUT). Menurut Miswar *et al.* (2007) bahwa produk tebu transgenik yang telah dikembangkan mampu

meningkatkan rendemen tebu hingga 20-30% lebih tinggi dibandingkan dengan tebu rakyat. Meskipun demikian, permasalahan yang ditemui di lapangan bukan hanya dari keterbatasan kualitas dan ketersediaan benih unggul tebu, namun juga pada teknik perbanyakan benih tebu di lapangan (Jalaja *et al.*, 2008). Biasanya petani melakukan perbanyakan benih tebu menggunakan bagal tebu yang tentunya rawan terhadap kontaminasi dan penyebaran penyakit yang disebabkan oleh virus tebu terutama *sugarcane mosaic virus* (SCMV), dan telah dilaporkan dapat menurunkan produksi gula tebu sekitar 30-40% dan bahkan dapat mencapai 80% (Reddy and Sreenivasulu, 2011).

Sugarcane mosaic virus (SCMV) merupakan salah satu virus tumbuhan penting yang menyerang tanaman tebu. Dilaporkan virus ini memiliki beberapa kisaran inang seperti jagung, sorgum, dan beberapa tanaman dari kelompok *graminaceous* dan telah tersebar ke seluruh dunia (Jeffery *et al.*, 1998; Cheng *et al.* 2001). Virus ini juga dilaporkan memiliki kelompok filogenetik yang berbeda tergantung pada inang dan area distribusi virus tersebut (Li *et al.*, 2013; Viswanathan *et al.*, 2009) yang diketahui menular secara mekanik maupun melalui serangga vektor dengan cara non-persisten dengan periode inkubasi sekitar 3 hari pada varietas rentan, bahkan makin awal tanaman terinfeksi oleh SCMV, makin tinggi persentase serangannya (Muis, 2002). Oleh karena itu untuk meminimalkan penyebaran dan tingginya kerusakan tanaman tebu akibat serangan SCMV maka perlu dilakukan upaya penanganan dan pencegahan yang tepat.

Menurut Pedersen *et al.* (2007), satu-satunya upaya yang dianggap paling efektif dalam mengendalikan penyakit virus adalah melalui penggunaan benih bebas dan tahan virus. Secara umum perolehan benih unggul yang sehat dan bebas virus dilakukan sebagai langkah produksi benih unggul tebu melalui beberapa metoda seperti perlakuan pemanasan (HWT, *hot water treatment*) suhu 53°C selama 10 menit atau 55°C selama 10-20 menit (Damayanti *et al.*, 2010). Namun upaya ini tidak mampu mengatasi kejadian infeksi SCMV pada tebu di lapangan (Goldbach *et al.*, 2003), sehingga diperlukan upaya cara lain yang lebih efektif dalam perakitan varietas baru yang tahan terhadap virus secara cepat dan tepat. Secara umum teknologi perakitan varietas baru kedelai dapat dilakukan melalui beberapa cara di antaranya melalui teknologi transfer genetik atau transgenik (Bonny, 2011; Goldbach *et al.*, 2003).

Menurut Panattoni *et al.*, (2013) salah satu teknik pemuliaan yang dianggap mampu menghasilkan benih yang bebas virus dapat dilakukan melalui terapi kimia (kemoterapi) seperti kemoterapi dengan Ribavirin (Kentsis *et al.*, 2004). Pemanfaatan ribavirin itu sendiri telah banyak dilaporkan berhasil dalam upaya produksi benih tanaman bebas virus seperti yang dilaporkan pada Bambu untuk mengeliminasi Bamboo mosaic virus (Chen and Lu, 2000), Kentang terhadap Leaf Curl Virus (Green *et al.*, 1992) maupun Potato virus S (Horackova, 1992), pada Jeruk untuk mengeliminasi Citrus latent virus dari benih (Iwanami and Ieki, 1994), bahkan pada tebu sendiri telah dilakukan untuk mengeliminasi sugarcane yellow leaf virus (Fitch *et al.*, 2001).

Di samping itu, Sanford and Johnston (1985) menambahkan bahwa salah satu teknologi pengembangan tanaman transgenik yang dapat menghasilkan tanaman tahan terhadap virus dapat dilakukan melalui pendekatan *Pathogen-derived resistance* (PDR), yang merupakan salah satu teknologi perolehan mekanisme ketahanan tanaman melalui mekanisme transformasi genetik dari bagian tertentu virus ke dalam tanaman inang (Wilson, 1993; Prins *et al.*, 2008). Salah satu metode dalam teknologi PDR ini adalah *Coat protein-mediated resistance* (CP-MR) yang dilaporkan berhasil dilakukan pada tanaman monokotil maupun dikotil untuk memperoleh tanaman yang tahan terhadap beberapa virus tumbuhan (Marano and Baulcombe, 1998; Dasgupta *et al.*, 2003). Contohnya adalah ketahanan tembakau transgenik terhadap Tobacco Mosaic Virus (TMV) (Powell-Abel *et al.*, 1986), ketahanan Alfalfa terhadap Alfalfa Mosaic Virus (AIMV) (Brederode *et al.*, 1995), dan ketahanan tomat transgenik terhadap Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) (Yang *et al.*, 2004).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

3.1 Tujuan penelitian

Tujuan dari Penelitian pada tahun berjalan ini (tahun ke-2) adalah untuk membuat konstruksi plasmid untuk keperluan transformasi gen *cp-SCMV* berbasis *Agrobacterium-mediated plant transformation*.

3.2 Manfaat penelitian

Adapun manfaat dari penelitian pada tahun ini (tahun ke-2) yaitu menghasilkan sebuah konstruk plasmid yang membawa kode genetik penyandi coat protein virus SCMV yang siap ditransformasikan pada ke tanaman tebu guna menghasilkan tebu transgenik yang tahan terhadap serangan virus SCMV untuk mengantisipasi penurunan hasil tebu akibat serangan penyakit SCMV.

BAB 4. METODE

4.1 Kloning cDNA untuk coat protein

Isolasi total RNA daun tebu terinfeksi ScMV

Isolasi total RNA dari dilakukan dengan menggerus 3 gram daun tebu PS881 terinfeksi ScMV menggunakan N2 cair padamortal-stumpler. Isolasi RNA dilakukan menggunakan metoda gradien CsCl₂ seperti disebutkan oleh Sambrook et al (2001) dengan ultra centrifugasi pada kecepatan 35.000 rpm selama 16 jam. Total RNA yang didapat kemudian digunakan untuk sintesis cDNA untuk coat protein ScMV.

Sintesis cDNA untuk coat protein dilakukan seperti metoda yang disebutkan dalam manual kit RT-PCR (Roche). Sesudah didapat cDNA kemudian diligasikan pada T-vector (pJET1.2 – Genetica Science). Penentuan urutan nukleotida (*sequencing*) dilakukan perusahaan Genetica Science.

4.2 Konstruksi cDNA coat protein pada vektor pET28 untuk produksi protein rekombinan

Konstruksi dilakukan dengan menentukan daerah konservatif dari cDNA coat protein dan memperbanyak fragmen cDNA tersebut menggunakan PCR. Sedangkan primer PCR dirancang dengan tempat pemotongan enzim restriksi XhoI dan BamHI sehingga rancangan primernya adalah untuk primer forward : 5'-CAGCGGATCCGTCGATGCAGGTGCTC-3' dan primer reverse : 5'-CTGCTCGAGTCCCAACAGAGAGTGCAT-3'. DNA yang teramplifikasi dengan PCR kemudian dipotong dengan enzim restriksi XhoI dan BamHI serta diligasikan pada vektor pET28a (Invitrogen). Konfirmasi keberhasilan pembuatan konstruk cDNA coat protein pada plasmid pET dilakukan dengan penentuan urutan nukleotida (*sequencing*).

4.3 Konstruksi cDNA coat protein pada vektor pRI101-ON dan pGreenII untuk perakitan tebu toleran kekeringan.

Konstruksi cDNA dilakukan dengan cara yang serupa pada konstruksi untuk produksi coat protein rekombinan, tetapi menggunakan vektor yang berbeda yaitu vektor pRI101-ON (Takara) dengan tehnik overekspresi (PDR) dan pada vektor pGreenII-0179 (SnapGene) dengan tehnik antisense. Keberhasilan konstruksi diyakinkan dengan penentuan urutan nukleotidanya. Konstruksi DNA coat protein yang sudah tepat kemudian ditransformasikan pada *Agrobacterium tumefaciens* untuk digunakan dalam penelitian selanjutnya.

4.4 Transformasi Konstruksi DNA pada sel *Escherichia coli* strain BL21 dan pada sel *Agrobacterium tumefaciens*.

Plasmid hasil konstruksi cDNA coat protein pada vektor ekspresi pET28 serta vektor ekspresi pRI101-ON dan pGreenII ditransformasikan pada sel target, yaitu konstruksi pET28-Cp ditransformasikan pada sel *E. coli* strain BL21, sedangkan vektor ekspresi pRI101-ON-Cp dan pGreenII-Cp ditransformasikan ke sel *Agrobacterium* strain GV1301. Transformasi ke dalam sel *E. coli* BL21 dilakukan menggunakan metoda heat shock dan transformasi ke dalam sel *Agrobacterium* dilakukan dengan metoda freeze-thawing seperti metoda yang disebutkan dalam Sambrook *et al* (2001). Keberhasilan transformasi diyakini dengan seleksi sel transforman *E. coli* atau *Agrobacterium* pada media seleksi yang mengandung antibiotik dan analisis PCR.

4.5 Persiapan eksplan tebu untuk transformasi

Untuk transformasi digunakan eksplan kalus tebu dan tanaman tebu *in vitro* sebagaimana telah dilakukan sebelumnya (Sugiharto *et al.*, 2005 dan Setyati *et al.*, 2007). Eksplan kalus tebu disiapkan dari pucuk tebu varietas BL umur 5-9 bulan. Pembuatan kalus dilakukan dengan isolasi pucuk daun meristem tebu dalam Laminar air flow dan kemudian diinkubasikan pada media kultur jaringan MS mengandung 3 ppm 2,4 D. Induksi kalus dilakukan dengan inkubasi pada kondisi gelap selama 2-3 minggu. Kalus yang terbentuk kemudian di sub-kultur pada media MS baru untuk memperbanyak. Sedangkan tanaman tebu *in vitro* disiapkan dengan menanam tunas apikal dan lateral tebu secara aseptis pada

media MS. Perbanyak tunas tebu in vitro dilakukan dengan sub-kultur pada media MS setiap 2-3 minggu sekali.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN.

Isolasi (cloning) cDNA untuk coat protein ScMV diawali dengan isolasi total RNA dari daun tebu terinfeksi SCMV yang dilanjutkan dengan sintesis cDNA menggunakan primer spesifik untuk fragmen coat protein. cDNA yang diperoleh kemudian diamplifikasi menggunakan sepasang primer spesifik yang menghasilkan ampikon fragmen penyandi coat protein. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Total RNA yang diperoleh dengan teknik Guanidine Thiocyniate menggunakan Gradien Cesium Chloride pada 4 sampel menghasilkan konsentrasi total RNA yang bervariasi mencapai 4.732 ng/ μ l (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan total RNA hasil ekstraksi dari tanaman tebu

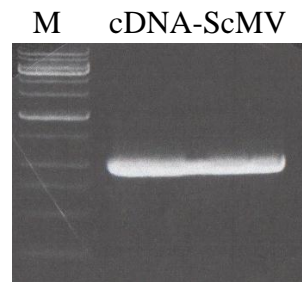
No	Nama Sampel	Konsentrasi (ng/ μ l)	Nilai*	
			A260/A280	A260/A230
1.	Sampel 1	4.732	1,708	1,874
2.	Sampel 2	2.081	1,985	2,248
3.	Sampel 3	4.358	1,850	2,071
4.	Sampel 4	3.544	1,963	2,190

- hasil diperoleh menggunakan NanoVue Plus

Meskipun demikian, tingkat kemurnian dari total RNA yang diperoleh berbeda-beda terlihat dari Nilai rasio A260:A280 dan A260:A230. Secara umum sampel 2-4 merupakan sampel total RNA dengan tingkat kemurnian yang cukup baik untuk digunakan sebagai template pada percobaan selanjutnya. Hal ini sesuai dengan Keer and Rich (2008) bahwa nilai A260/A280 mencapai 1,8 dan A260/A230 pada kisaran 2,0-2,2 merupakan nilai kemurnian asam nukleat yang tinggi.

Sintesis cDNA pertama dilakukan dengan teknik Reverse Transcription menggunakan cetakan (*template*) total RNA dan primer oligo dT. Isolasi cDNA coat protein dilakukan dengan teknik PCR menggunakan cetakan cDNA pertama dan primer yang dirancang untuk cDNA coat protein ScMV sebagaimana disebutkan pada Bahan dan Metoda. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cDNA terbentuk dan berhasil teramplifikasi menggunakan primer tersebut dengan ukuran

produk PCR sebesar 1.000 bp (Gambar 1). Hasil ini kemudian digunakan untuk kloning pada vektor pJET1.2 dan diperbanyak pada sel *E. coli*.



Gambar 1. Visualisasi cDNA coat protein pada gel agarose elektroforesis hasil RT-PCR menggunakan sampel total RNA daun tebu terinfeksi SCMV dan primer spesifik.

Untuk konfirmasi fragmen yang diperoleh merupakan fragmen penyandi coat protein SCMV, maka dilakukan penentuan urutan nukleotidanya (*sequencing*) dan hasilnya disajikan pada Gambar 2. Sesudah dilakukan analisa bioinformatika dengan analisa NCBI Blast dan penjajaran (*alignment*) dengan cDNA coat protein dari isolat lain menunjukkan bahwa fragmen berukuran 1.000 bp diketahui bahwa fragment tersebut memiliki homologi yang tinggi dengan urutan nukleotida coat protein ScMV pada database NCBI (Gambar 3).

```

10      20      30      40      50      60
CTCCCTGGGTATTTAGAGGATTACAACGAAGAAGTTTTCCACCAAGCTGGAACAGTCGAT
L P G Y L E D Y N E E V F H Q A G T V D

      70      80      90      100     110     120
GCAGGTGCTCAAGGAGGAGGTGAAACGCCGGAACCTCAGCCGCCGACTGGGGCAGCA
A G A Q G G G G N A G T Q P P A T G A A

      130     140     150     160     170     180
GCTCAAGGAGGAGCTCAACCACCAGCAACTGGAGCAGCTGCGCAACCACCCGCAAATCAA
A Q G G A Q P P A T G A A A Q P P A N Q

      190     200     210     220     230     240
GGTTCACAACCGCCACAGGAGGAGCTACTGGTGGAGGTGGTGCACAAACAGGAGCTGGT
G S Q P P T G G A T G G G G A Q T G A G

      250     260     270     280     290     300
GCAGCTGGCTCAGTTACAGGAGGCCAAAGAGACAAGGATGTAGATGCTGGTACGACAGGC
A A G S V T G G Q R D K D V D A G T T G

      310     320     330     340     350     360
AAAATCACAGTGCCAAAACCTTAAAGCCATGTGCAAGAAAATGCGCTTGCCAAAAGCAAAA
K I T V P K L K A M S K K M R L P K A K

      370     380     390     400     410     420
GGAAAAGATGTTTTGCATCTGGACTTTCTGTTAACATACAAGCCACAGCAGCAAGACATA
G K D V L H L D F L L T Y K P Q Q Q D I

      430     440     450     460     470     480
GCAAATACAAGAGCAACTAAGGAAGAATTCGATAGATGGTACGATGCCATAAAGAGGGAA
A N T R A T K E E F D R W Y D A I K R E

      490     500     510     520     530     540
TATGAGCTTGATGACACAAATGACAGTTATCATGAGCGCCTTATGGTATGGTGTATT
Y E L D D T Q M T V I M S G L M V W C I

      550     560     570     580     590     600
GAGAACGGTTGCTCACCAAACATAAATGAAAATTGGACAATGATGGATGGAGATGAACAG
E N G C S P N I N G N W T M M D G D E Q

      610     620     630     640     650     660
AGGGTTTTTCCACTCAACCAGTCATTGAAAATGCATCTCCAACCTTCCGACAAATTATG
R V F P L K P V I E N A S P T F R Q I M

      670     680     690     700     710     720
CATCACTTTAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAGAATACAGGAATTCCTACTGAACGATAC
H H F S D A A E A Y I E Y R N S T E R Y

      730     740     750     760     770     780
ATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCGACTATAGCTTAGCACGGTATGCATTT
M P R Y G L Q R N L T D Y S L A R Y A F

      790     800     810     820     830     840
GATTTCTATGAAATGACTTCGCGCACACCTGCTAGAGCTAAAGAAGCCACATGCAGATG
D F Y E M T S R T P A R A K E A H M Q M

      850     860     870     880     890     900
AAAGCCGACGAGTTCTGGTTCAAACACACGACTGTTCTGGTCTGGACGAAAATGTCGGC
K A A A V R G S N T R L F G L D G N V G

      910     920     930     940     950     960
GAGACCCAGGAGAATACAGAGACACACAGCTGGTGACGTCAGCCGCAATATGCACTCT
E T Q E N T E R H T A G D V S R N M H S

      970     980     990
CTGTTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTGGAA
L L G V Q Q H H * S P G

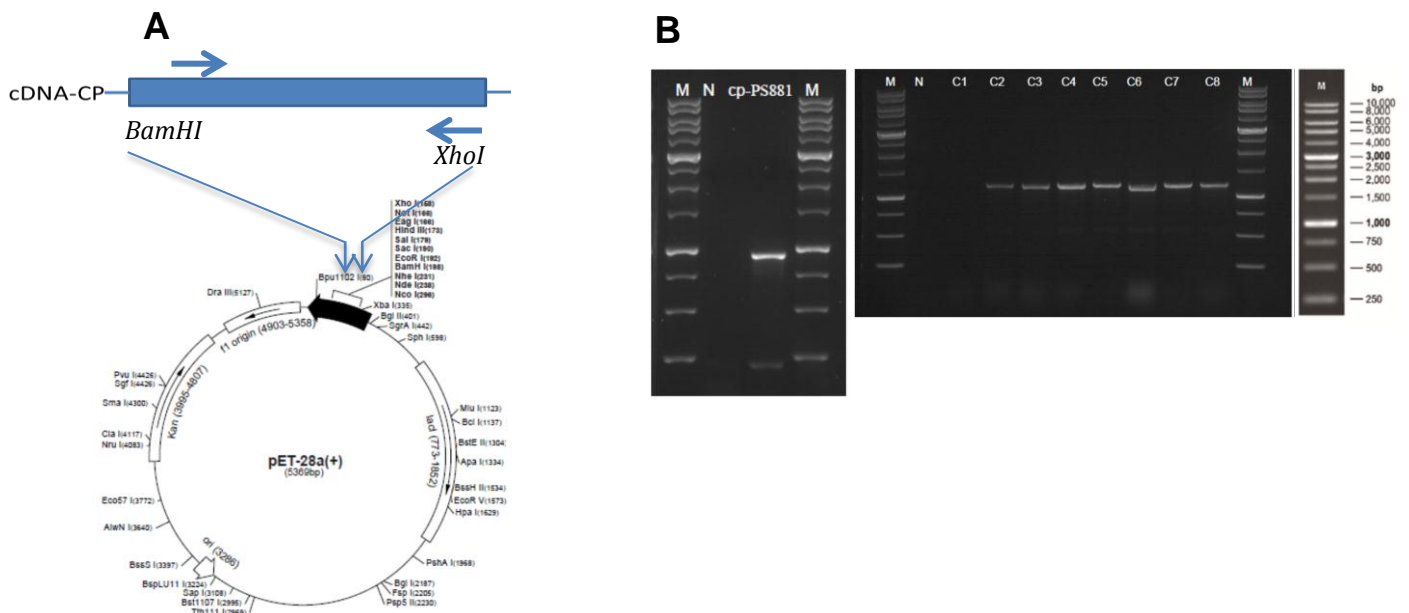
```

Gambar 2. Urutan nukleotida (sequence) cDNA coat protein dan prediksi urutan asam amino coat protein ScMV isolat Jawa Timur. Urutan nukleotida ditentukan menggunakan analisa sequencing di Genetica Science dan prediksi urutan asam amino ditentukan menggunakan software Genetyx

AA ARG 130	1	-FHQAGTVDAGAQQGGGNAGTQPPATGAAVAQGGGAQPPATGAAAQPPA	TQGSQPPTGGAT	58
AA ARG 345	1	-FHQAGTVDAGAQQGGGNAGTQPPATGAAVAQGGGAQPPATGAAAQPPA	TQGSQPPTGGAT	58
AA AU	1	--HQAGTVDAGAQQGGGNAGTQPPATGAAVAQGGGAQPPATGAAAQPPA	TQGSQPPTGGAT	58
AA ps 881	1	TKFPSWTVDAGAQQGGGNAGTQPPATGAAVAQGGGAQPPATGAAAQPPA	NQGSQPPTGGAT	59
AA ARG 130	59	GGGGAQTGAGETGAVTGGQRDKDVDAGTTGKITVPKLKAMSKKMRLPKAKGKDVHLHDFL		118
AA ARG 345	59	GGGGAQTGAGETGAVTGGQRDKDVDAGTTGKITVPKLKAMSKKMRLPKAKGKDVHLHDFL		118
AA AU	59	GGGGAQTGAGETGAVTGGQRDKDVDAGTTGKITVPKLKAMSKKMRLPKAKGKDVHLHDFL		118
AA ps 881	60	GGGGAQTGAGAGSVTGGQRDKDVDAGTTGKITVPKLKAMSKKMRLPKAKGKDVHLHDFL		119
AA ARG 130	119	LTYPQQQDISNTRATREEFDRWYEAIKKKEYEIDDTQMTVVMHSGLMVWCIEGCSFNING		178
AA ARG 345	119	LTYPQQQDISNTRATREEFDRWYEAIKKKEYEIDDTQMTVVMHSGLMVWCIEGCSFNING		178
AA AU	119	LTYPQQQDISNTRATREEFDRWYEAIKKKEYEIDDTQMTVVMHSGLMVWCIEGCSFNING		178
AA ps 881	120	LTYPQQQDISNTRATREEFDRWYDAIKRKEYEIDDTQMTVVMHSGLMVWCIEGCSFNING		179
AA ARG 130	179	SWTMMDGDEQRVFFLPKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQRNL		238
AA ARG 345	179	SWTMMDGDEQRVFFLPKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQRNL		238
AA AU	179	SWTMMDGDEQRVFFLPKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQRNL		238
AA ps 881	180	NWTMMDGDEQRVFFLPKPVIEASPTFRQIMHHFSDAAEAYIEYRNSTERYMPRYGLQRNL		239
AA ARG 130	239	TDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFLDGNVGETQENTERHT		298
AA ARG 345	239	TDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFLDGNVGETQENTERHT		298
AA AU	239	TDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFLDGNVGETQENTERHT		298
AA ps 881	240	TDYSLARYAFDFYEMNSRTPARAKEAHMQKAAAVRGSNTRLFLDGNVGETQENTERHT		299
AA ARG 130	299	AGDVSRRNMHSLLGQQHH		316
AA ARG 345	299	AGDVSRRNMHSLLGQQHH		316
AA AU	299	AGDVSRRNMHSLLGQQHH		316
AA ps 881	300	AGDVSRRNMHSLLGQQHH		317

Gambar 3. Perbandingan *multiple alignment* prediksi urutan asam amino coat protein dari ScMV isolat Jawa Timur dengan urutan asam amino coat protein isolat Argentina (ARG) dan Australia (AU).

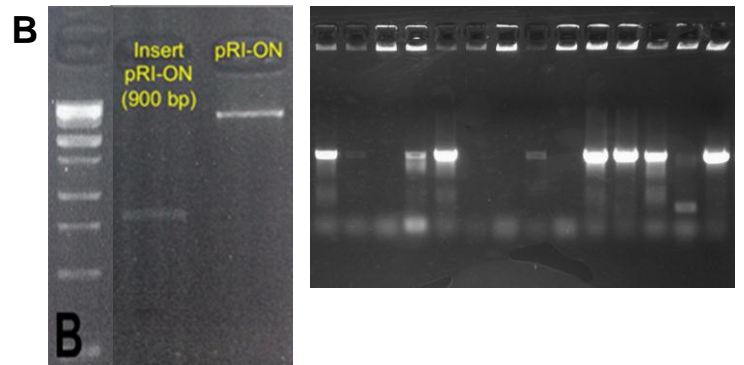
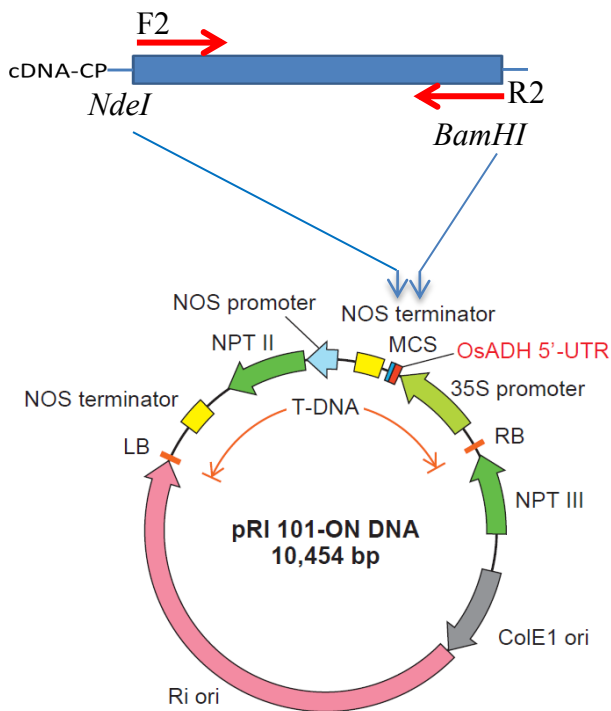
Pada Gambar 3 terlihat jelas bahwa urutan asam amino coat protein dari ScMV isolat Jawa Timur mempunyai kesamaan (*homology*) tinggi dengan isolat Argentina dan Australia, termasuk isolat China (data tidak ditampilkan). Hasil analisa bioinformatika tersebut menunjukkan bahwa cDNA yang diperoleh merupakan cDNA coat protein dari ScMV. Oleh karena itu, percobaan selanjutnya adalah melakukan kloning fragment tersebut pada vektor pET28A+ (Invitrogen) untuk produksi rekombinan coat protein. Kloning fragment cDNA coat protein dimulai dari asam amino DAGAQQGG pada posisi ujung N dan diakhiri dengan asam amino GVVQHH pada ujung C dengan ukuran 308 asam amino. Hasil percobaan menunjukkan bahwa fragmen tersebut telah berhasil diligasikan pada vektor pET28 seperti ditunjukkan pada Gambar 4B. Konstruksi pET28A yang mengandung inserti cDNA coat protein, kemudian ditransformasi pada sel *E. coli* BL21 untuk produksi protein rekombinan. Saat ini sedang dilakukan produksi protein rekombinan untuk pembuatan antibody poliklonal untuk coat protein ScMV.



Gambar 4. Konstruksi cDNA coat protein pada vektor ekspresi pET28a (A) dan konfirmasi keberhasilan konstruksi dengan PCR koloni (B). Konstruksi dilakukan dengan insersi fragmen cDNA coat protein yang telah dipotong dengan enzim *Bam*HI dan *Xho*I pada plasmid pET28, dan kemudian ditransformasikan sel *E. coli*. Konfirmasi keberhasilan insersi dilakukan dengan melakukan PCR koloni.

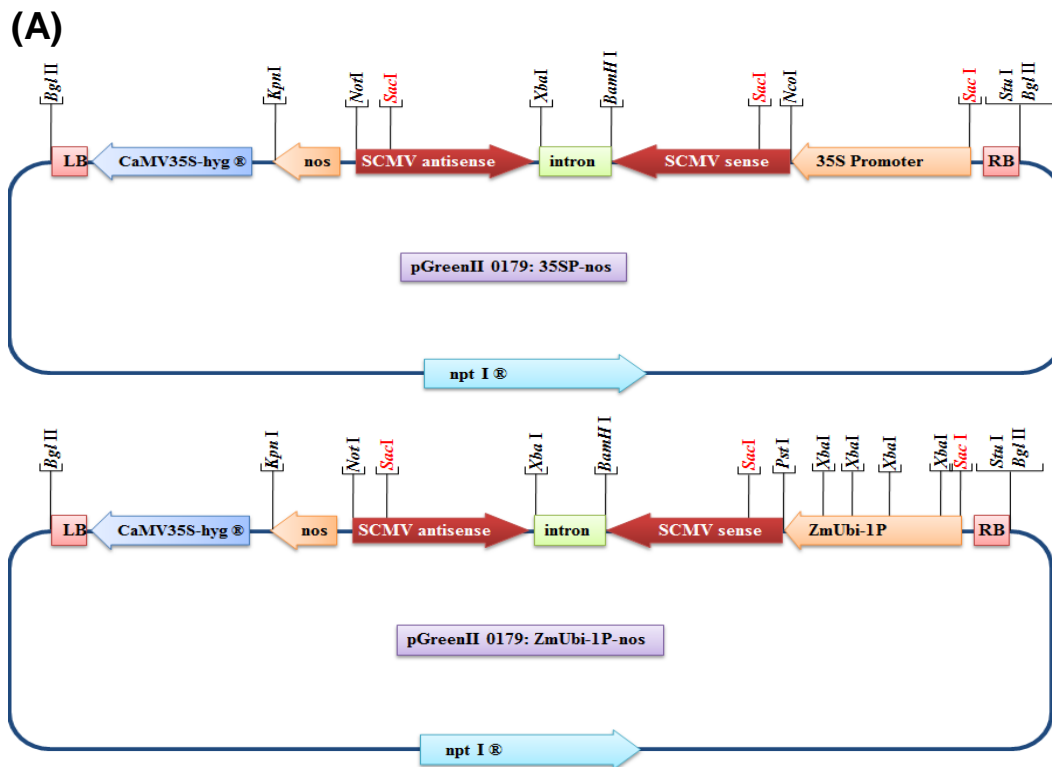
Konstruksi cDNA coat protein pada vektor ekspresi pRI101-ON ditujukan untuk overekspresi gen pengkode coat protein pada tanaman tebu sehingga tanaman tebu melakukan sintesis coat protein dan mencegah terjadinya sintesis protein yang sama oleh ScMV. Hal tersebut akan mencegah infeksi ScMV pada tanaman tebu sehingga didapatkan tebu yang tahan ScMV dan teknik ini dinamakan teknik PDR. Untuk itu cDNA coat protein dikonstruksi dalam vektor pRI101-ON pada tempat enzim restriksi *Nde*I dan *Bam*HI, sebagaimana disebutkan pada Gambar 5A. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cDNA coat protein telah diinsersikan pada plasmid pRI dan keberhasilan insersi diyakini dengan analisa PCR seperti disebutkan pada Gambar 5B. Saat ini konstruk pRI101-ON-Cp ditransformasikan pada sel *Agrobacterium tumefaciens* strain GV1301 dan siap digunakan untuk merakit tebu tahan ScMV melalui transformasi genetik.

A Kloning cDNA-CP pada vektor biner pRI101-ON untuk transformasi tebu tahan SCMV – pendekatan teknik PDR



Gambar 5. Konstruksi cDNA coat protein pada vektor ekspresi pRI101-ON (A) dan pemisahan DNA hasil PCR kolonidengan elektroforesis agarose (B). Konstruksi dilakukan dengan insersi fragmen cDNA coat protein yang telah dipotong dengan enzim *NdeI* dan *BamHI* ke plasmid pRI-ON, dan kemudian ditransformasikan sel *Ecoli*. Konfirmasi keberhasilan insersi dilakukan dengan

Konstruksi cDNA coat protein dengan tehnik RNAi (antisense) dilakukan dengan insersi cDNA coat protein pada plasmid pGreenII dengan orientasi DNA sense dan antisense seperti digambarkan pada peta plasmid pada Gambar 6 A dan konfirmasi keberhasilan konstruk dengan analisa pemotongan enzim restriksi seperti disebutkan pada Gambar 6B. Konstruksi dilakukan menggunakan dua macam promoter, yaitu dikendalikan oleh promoter CaMV35S dari mozaic virus dan promoter ZmUbi dari jagung. Kedua konstruk tersebut sengaja disiapkan untuk mengujian efektifitas ekspresi RNAi pada tanaman tebu transforman. Selain itu, dewasa ini promoter dari tanaman lebih disukai untuk ekspresi pada tanaman dari pada promoter dari organisme lain.

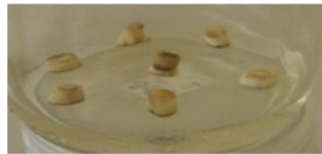


Gambar 6. Konstruksi cDNA coat protein pada vektor ekspresi pGreenII (A) dan pemisahan DNA hasil pemotongan dengan enzim restriksi pada elektroforesis agarose (B). Konstruk RNAi dilakukan dengan insersi cDNA coat protein dengan orientasi sense dan antisense dengan pemisahan intron dan promoter CaMV35S (6A-atas) dan promoter Ubiquitin jagung (6A-bawah). Konfirmasi keberhasilan konstruk dianalisa dengan enzim restriksi untuk pGreen-CaMV (6B-kiri) dan pGreen-ZmUbi (6B-kanan).

Untuk perakitan tanaman tebu tahan ScMV transformasi genetik dengan vektor *Agrobacterium* yang mengandung konstruk DNA dilakukan dengan menggunakan eksplant kalus dan tunas tebu *in vitro*. Induksi kalus dilakukan dengan inkubasi eksplant pucuk daun meristem tebu umur 5-9 bulan (Gambar 7A) pada media MS mengandung 2,4D pada kondisi gelap suhu 24-26°C selama 2-3 minggu. Propagasi (perbanyak) kalus tebu dilakukan dengan sub-kultur kalus pada media dan kondisi yang sama. Sedangkan tunas tebu *in vitro* ditumbuhkan dari tunas tebu apikal maupun lateral pada media dasar MS dengan penyinaran pada suhu 24-26°C selama 2-3 minggu. Tunas tebu yang terbentuk diisolasi dan diperbanyak pada media dan kondisi yang sama.

Persiapan eksplant kalus

Eksplant pucuk daun meristem



Induksi kalus pada media MS



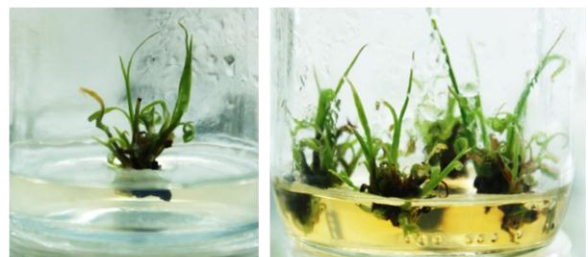
Propogasi kalus embrionik



Persiapan eksplant tebu tunas *in vitro*



Induksi tunas lateral *in vitro*



Pertumbuhan dan perbanyak tunas *in vitro*

Gambar 7. Persiapan dan perbanyak eksplant tebu untuk transformasi genetik melalui kalus (kiri) dan tunas tebu *in vitro* (kanan). Potongan transversal eksplant pucuk daun meristem digunakan untuk induksi kalus dan kalus yang terbentuk diperbanyak untuk membentuk kalus embrionik. Tunas tebu *in vitro* ditumbuhkan dari tunas lateral tebu dan diperbanyak secara aseptis di media MS dengan penyinaran.

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN.

6.1. Kesimpulan

Pada akhir tahun ke dua sesuai dengan rencana telah didapatkan cDNA coat protein dari ScMV isolat Jawa Timur. Hasil analisa bioinformatika menunjukkan bahwa cDNA coat protein tersebut mempunyai kesamaan tinggi dengan cDNA coat protein isolat dari Argentina, Australia dan China, sehingga dapat digunakan untuk produksi protein rekombinan dan transformasi genetik. Untuk produksi rekombinan protein telah berhasil dibuat konstruk cDNA coat protein pada vektor ekspresi pET28a, dan untuk transformasi genetik dibuat konstruk pada vektor pRI101-ON (teknik PDR) dan vektor pGreenII (teknik RNAi). Sambil menunggu pencairan dana berikutnya, saat ini sedang dilakukan produksi rekombinan protein untuk pembuatan poliklonal antibodi dan perbanyakan ekplant kalus dan tebu in vitro untuk transformasi genetik. Diharapkan sesuai dengan rencana dapat dihasilkan prototype tebu tahan ScMV pada akhir tahun ke 3.

6.2. Saran

Diperlukan bahan kimia Kit yang baik untuk keperluan analisa molekular sehingga dapat meningkatkan efektifitas pekerjaan rekombinan DNA dan transformasinya baik pada *E. coli* maupun pada *A. tumefaciens*.

Daftar Pustaka.

- Bonny, S. 2011. Herbicide-tolerant transgenic soybean over 15 years of cultivation: Pesticide use, weed resistance, and some economic issues. The case of the USA. *Sustainability* 3:1302-1322.
- Brederode, F. T., P. E. Taschner, E. Posthumus, and J. F. Bol. 1995. Replicase-mediated resistance to alfalfa mosaic virus. *Virology* 207:467-474.
- Chen, T.H., and Y.T. Lu. 2000. Application of ribavirin in tissue culture of green bamboo (*Bambusa oldhamii* Munro) for elimination of Bamboo mosaic virus. *Plant Prot. Bull* 42:159-168.
- Cheng, Y., J. Cheng, and J.P. Cheng. 2001. The complete sequence of a sugarcane mosaic virus isolate causing maize dwarf mosaic virus disease in China. *Sciences in China (series C)* 31, 497-504.
- Dasgupta, I., V. G. Malathi, and S. K. Mukherjee. 2003. Genetic engineering for virus resistance. *Curr. Sci.* 84(3): 341-354.
- Fitch, M.M.M; A.T Lehrer, E. Komor and P.H Moore. 2001. Elimination of Sugarcane yellow leaf virus from infected sugarcane plants by meristem tip culture visualized by tissue blot immunoassay. *Journal of Plant Pathology* 50, 676-680.
- Goldbach, R., E. Bucher, and M. Prins. 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an

- overview. *Virus Res.*92: 207–212.
- Green, S.K., C.Y. Luo, and S.F. Wu, 1992. Elimination of leafcurl virus of sweet potato by meristem tip culture, heat and ribavirin. *Plant Prot. Bull.* 34:1-7.
- Horackova, V. 1998. Potato virus S elimination by chemotherapy in vitro using ribavirin. *Rostlinna Vyroba* 44: 539-544.
- Iwanami, T., and H. Ieki, 1994. Elimination of citrus latent virus from shoots of potted citrus plants by ribavirin. *J. Phytopathol. Soc. Japan* 60:595-599.
- Jalaja, N.C, D. Neelamathi and T.V Sreenivasan. 2008. Micropropagation for Quality Seed Production in Sugarcane in Asia and the Pacific. United Nations : FAO, APCoAB and APAARI.
- Jefrey, S.H.H., B. Adams, T.J. Parsons, R. French, L.C. Lane and S.G. Jensen, 1998. Molecular cloning, sequencing, and phylogenetic relationship of a new potyvirus: sugarcane streak mosaic virus, and a reevaluation of the classification of the Potyviridae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 10: 323-332.
- Kentsis, A., I. Topisirovic, B. Culjkovic, L. Shao, and K. L. B. Borden. 2004. Ribavirin suppresses eIF4E-mediated oncogenic transformation by physical mimicry of the 7-methyl guanosine mRNA cap. *PNAS*101(52):18105-18110.
- Li, Y., R. Liu, T. Zhou, and Z. Fan. 2013. Genetic diversity and population structure of *Sugarcane mosaic virus*. *Virus Res.* 171(1):242-248.
- Marano, M.R. and Baulcombe, D. 1998. Pathogen-derived resistance targeted against the negative-strand RNA of tobacco mosaic virus: RNA strand-specific gene silencing? *Plant J.*13, 537–546.
- Miswar, Sugiharto, B., Soedarsono, J., dan Moeljapawiro, S. 2007. Transformasi gen *sucrose phosphate synthase* (SoSPS1) menggunakan *Agrobacterium tumefaciens* untuk meningkatkan sintesis sukrosa pada tanaman tebu (*saccharum officinarum* L.). *Berk. Penel. Hayati.* 12: 137-143.
- Muis, A. 2002. *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) penyebab penyakit mosaik pada tanaman jagung di Sulawesi. *Jurnal Litbang Pertanian* 21(2):64-68).
- Panattoni, A, A. Luvisi and E. Triolo. 2013. Review. Elimination of viruses in plants: twenty years of progress. *Spanish Journal of Agricultural Research* 11(1), 173-188
- Pedersen, P., Grau, C., Cullen, E., Koval, N., and Hill, J. H. 2007. Potential for integrated management of soybean virus disease. *Plant Dis.* 91:1255-1259.
- Powell-Abel, P., R.S. Nelson, De B. Hoffman, S.G. Rogers, R.T. Fraley, R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Prins, M., M. Laimer., E. Noris, J. Schubert, M. Wassenegger, and M. Tepfer. 2008. Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Mol. Plant Pathol.*9(1):73-83.
- Reddy, Ch.V Subba and P. Sreenivasulu. 2011. Generation of sugarcane streak mosaic virus-free sugarcane (*Saccharum spp* hybrid) from infected plants by in vitro meristem tip culture. *European Journal of Plant Pathology* 130:597-604.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sugiharto, B., and H. Safitri. 2011A comparison study for *Agrobacterium*-mediated transformation method in sugarcane (*Saccharum spp* L.). *Jurnal ILMU DASAR.* 12:140-147

- Viswanathan, R., R. Karuppaiah, and M. Balamuralikrishnan. 2009. Identification of new variants of SCMV causing sugarcane mosaic in India and assessing their genetic diversity in relation to SCMV type strains. *Virus Genes*. 39(3):375-386.
- Wilson, T.M.A. 1993. Strategies to protect crop plant against viruses: plant pathogen resistance blossoms. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA* 90: 3134-3141.
- Yang, Y., T. A. Sherwood, C. P. Patte, E. Hiebert, and J. E. Polston, 2004. Use of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Rep gene sequence to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology* 94: 490–496.