



**KLONING DAN KONSTRUKSI *c*DNA PENYANDI PROTEIN KAPSID
SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV) KE DALAM VEKTOR EKSPRESI
UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Biologi (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Sains

Oleh:

Retna Hermawati

NIM 111810401023

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS JEMBER**

2016

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan dengan penuh suka cita untuk:

1. Orang tua terhebat dan terbaik sedunia yaitu Ayahanda Abd. Rohman Soleh dan Ibunda Heri Winarni atas setiap do'a, perhatian, dukungan, motivasi serta kasih sayang yang tiada henti dan tiada duanya.
2. Alm. Kakek terhebat Kabul Hariyanto dan Nenek tercantik Narinten di Palembang yang tidak pernah lelah dalam memanjatkan do'a serta memberikan semangat agar kelak cucunya bisa menjadi kebanggaan orang tua.
3. Semua Pahlawan tanpa tanda jasa yang dengan penuh keikhlasan telah mendidik dan mengajarkan berbagai ilmu pengetahuan baik secara formal maupun informal.
4. Almamater Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

MOTTO

“Everything should be as simple as it possible, but not as a simpler ”

(Albert Einstein)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retna Hermawati

NIM : 111810401023

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Kloning dan Konstruksi cDNA Penyandi Protein Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) Ke Dalam Vektor Ekspresi Untuk Produksi Protein Rekombinan“ adalah benar-benar hasil karya ilmiah sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan skripsi ini belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenar-benarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 08 Mei 2016

Yang menyatakan,

Retna Hermawati

NIM 111810401023

SKRIPSI

**KLONING DAN KONSTRUKSI *c*DNA PENYANDI PROTEIN KAPSID
SUGARCANE MOSAIC VIRUS (SCMV) KE DALAM VEKTOR EKSPRESI
UNTUK PRODUKSI PROTEIN REKOMBINAN**

Oleh:

Retna Hermawati

NIM. 111810401023

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, M.S.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Kloning dan Konstruksi cDNA Penyandi Protein Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) Ke Dalam Vektor Ekspresi Untuk Produksi Protein Rekombinan” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Jember:

tanggal :
tempat : Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Jember.

Tim Penguji:

Ketua,

Sekretaris,

Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc.
NIP 195510221982121001

Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, M. S.
NIP 196504261994031001

Anggota I,

Anggota II,

Dr. rer. Nat. Kartika Senjarini, M.Si.
NIP 197509132000032001

Drs. Rudju Winarsa, M.Kes.
NIP 196008161989021001

Mengesahkan
Dekan,

Drs. Sudjito, Ph.D.
NIP 196102041987111001

RINGKASAN

Kloning dan Konstruksi cDNA Penyandi Protein Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) Ke Dalam Vektor Ekspresi Untuk Produksi Protein Rekombinan; Retna Hermawati, 111810401023; 2016: 43 halaman; Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

Salah satu penyakit yang menyerang tanaman tebu adalah penyakit mosaik yang disebabkan oleh *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) (Koesmihartono,2009). Kehadiran virus ini dapat menghambat fotosintesis, merusak tanaman dan menekan tingkat produktifitas tanaman tebu hingga 0.2%-50% tergantung dari seberapa berat infeksi virus dan ketahanan varietas terhadap *Sugarcane Mosaic Virus* (Duriat,1979). Salah satu upaya dalam mencegah penyebaran virus tersebut terutama di lapang adalah dengan cara deteksi dini melalui uji serologi. Untuk dapat melakukan uji serologi sebagai upaya uji deteksi dini perlu diproduksi protein rekombinan salah satu caranya adalah melalui kloning (perbanyakkan dalam sel bakteri) cDNA yang menyandikan protein mantel dan melakukan konstruksi ke dalam vektor ekspresi. Protein rekombinan yang dapat digunakan untuk memproduksi antigen dalam pembuatan antibodi.

Tahapan yang dilakukan adalah mengisolasi materi genetik yang ada pada SCMV berupa RNA dan mengubahnya menjadi cDNA untuk kemudian diamplifikasi menggunakan PCR dan diligasikan ke dalam vektor kloning yang akan ditransformasikan dalam *E.coli* XL10-gold. Hasil transformasi dilakukan *sequencing* dan dikonstruksikan ke dalam vektor ekspresi pET-28 a (+). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan klon cDNA penyandi protein kapsid berukuran ± 1000 bp yang diinsertkan ke dalam vektor kloning pJET1.2 dengan hasil *alignment* menunjukkan adanya homologi (kesamaan) yang tinggi dengan protein kapsid sekuens ARG-345 dan ARG-130 sebesar 92%. cDNA protein kapsid SCMV berukuran ± 700 pb telah berhasil dikonstruksikan ke dalam vektor ekspresi pET 28 a(+) yang memiliki sisi pemotongan enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI*. Hasil konstruksi tersebut telah diekspresikan pada *E.coli strain* BL21 dan dilihat pola protein yang terbentuk menggunakan SDS-PAGE.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan skripsi yang berjudul “Kloning dan Konstruksi cDNA Penyandi Protein Kapsid *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) Ke Dalam Vektor Ekspresi Untuk Produksi Protein Rekombinan”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata satu (S1) Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember

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

1. Drs. Sudjito Ph.D. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam;
2. Dr. rer. Nat. Kartika Senjarini, M.Si. selaku Ketua Jurusan Biologi atas kemudahan-kemudahan yang telah diberikan;
3. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M. Agr. Sc. dan Dr. Ir. Didik Pudji Restanto, M.S., selaku Dosen Pembimbing yang dengan ikhlas dan penuh kesabaran telah memberikan bimbingan, pengarahan, bantuan, dan nasihat kepada penulis sampai skripsi ini terselesaikan;
4. Drs. Rudju Winarsa, M.Kes dan Dr. rer. Nat. Kartika Senjarini, M.Si. selaku Dosen Penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang bersifat konstruktif demi kesempurnaan skripsi ini
5. Ayahanda Abd. Rohman Soleh dan Ibunda Heri Winarni serta seluruh anggota keluarga atas segala dukungan baik moral maupun materiil
6. Adik-adikku Raditya Hermawan dan Naylatin Nafisa yang senantiasa memberikan keceriaan serta Adik besar Habibatur Roviqoh yang senantiasa jadi adik paling konyol
7. Sahabat sekaligus keluarga kedua “Keluarga Sarap” Bunda Susyatin Ummul Amanah, Arasho Lutfita Romi Endriani, Mbak Wulan Nursiyam N., adik kecil Anggi Erlyta, dan Bapak Nasikhul Ibad yang selalu jadi tempat berbagi paling indah, serta sahabatku Dewi Masruroh, Gayut Widya Prakosa dan Galen Rahardian yang selalu peduli dan membully

8. Partner di Laboratorium CDAST Suvia Widyaningrum, Kiky Mey Putranty, Novita Niswatun A., Retnosari Apriasti, Intan Ria Neliana, Ryan Prajonggo, Kakak Aping, Pika, Mbunce, Wardha, Nana serta Adik-adik Reza, Arie, Cici, Caca, Tisa, Amir, Savira, Suwinda, Wheny nay, Wilujeng, Ridwan Mas Aryo dan Mbak Melati atas dukungan dan motivasi yang diberikan.
9. Teman-teman Ampibi 2011 atas kebersamaan dan seluruh keceriaan selama menimba ilmu bersama di Biologi FMIPA UNEJ.

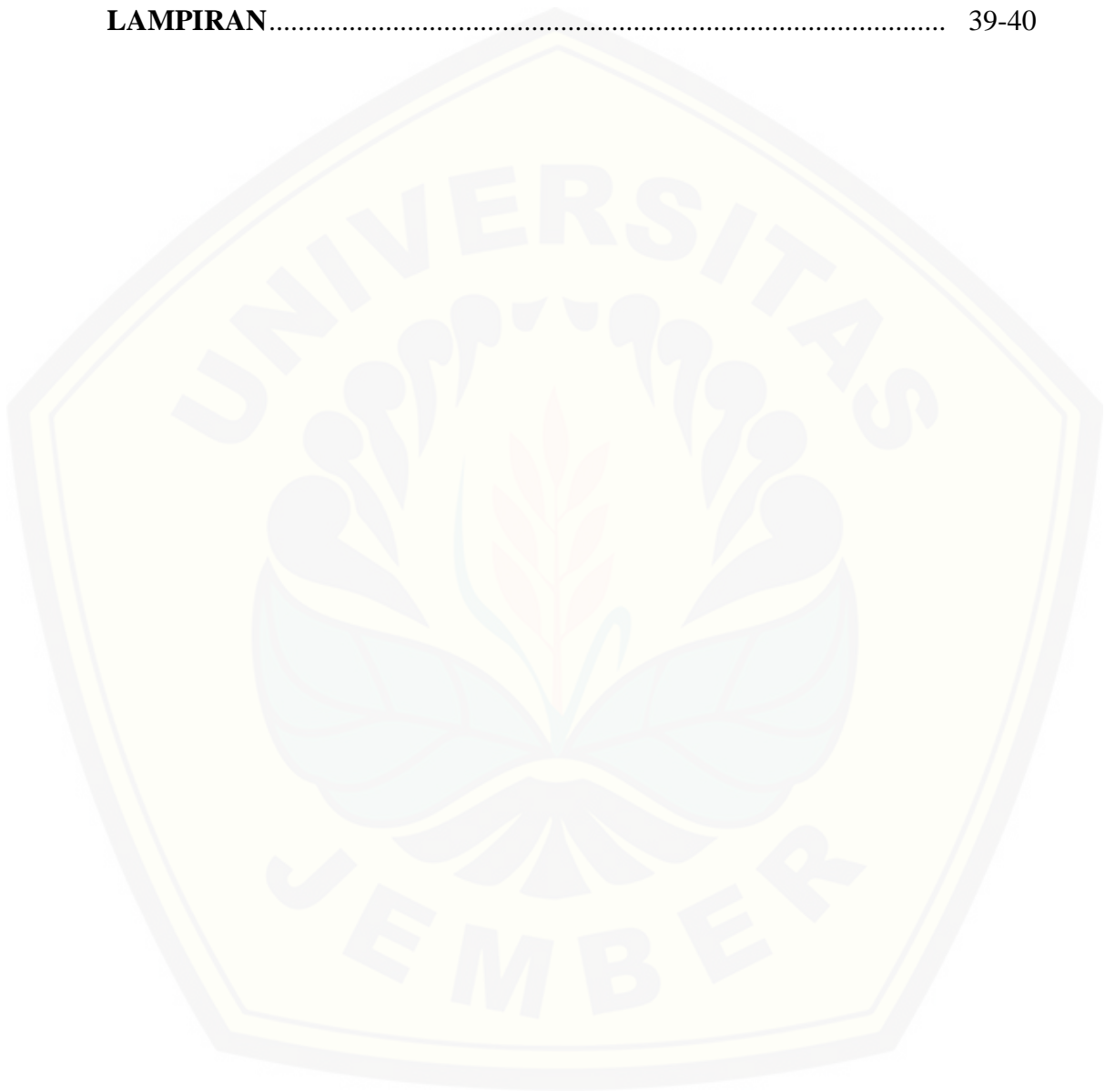
Penulis berusaha sebaik mungkin dalam penyusunan naskah skripsi ini, tetapi tidak dapat terlepas dari berbagai kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharap kritik dan saran yang bersifat konstruktif demi perbaikan naskah ini. Akhirnya semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	viii-ix
DAFTAR ISI	x-xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1-2
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV)	4
2.1.1 Karakteristik <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV).....	4-5
2.1.2 Struktur dan Fungsi Protein Kapsid.....	5-6
2.1.3 Deteksi <i>Sugarcane Mosaic Virus</i> (SCMV).....	6-7
2.1.3 Cara Penanggulangan	7
2.2 Kloning Gen dan Konstruksi	7
2.2.1 Vektor Kloning	7-8
2.2.2 Sel Kompeten Agen Pembawa Klon cDNA Target.....	9
2.3 Konstruksi dalam Vektor Ekspresi pET 28 a (+)	9-10

BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Alat dan Bahan	11
3.3 Prosedur Penelitian Kloning	11
3.3.1 Persiapan Sampel	11-12
3.3.2 Isolasi RNA.....	12-13
3.3.3 Sintesis <i>cDNA</i> (<i>complementary DNA</i>).....	13-14
3.3.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR).....	14-16
3.3.5 Pembuatan Sel Kompeten	16-17
3.3.6 Ligasi dan Transformasi pada XL10-gold	17-18
3.3.7 Isolasi Plasmid (<i>Mini Preparation</i>).....	18-19
3.3.8 <i>Sequencing</i> Hasil Ligasi dalam Vektor Kloning pJET1.2	19-20
3.4 Prosedur Penelitian Konstruksi	20
3.4.1 Desain Primer untuk Konstruksi ke dalam Vektor Ekspresi...	20
3.4.2 Analisis Enzim Restriksi	20-21
3.4.3 Produksi Analisis pola protein rekombinan menggunakan	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Kloning <i>cDNA</i> Penyandi Protein Kapsid	22
4.1.1 Isolasi RNA Menggunakan Metode GTC Gradien CsCl	22
4.1.2 Desain Primer F1 dan R1 untuk Persiapan Kloning.....	22-23
4.1.3 <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) <i>cDNA</i>	23-24
4.1.4 Transformasi Hasil Ligasi <i>cDNA</i> dalam Plasmid pJET1.2....	24
4.1.5 Konfirmasi Koloni Transforman dengan PCR Koloni	25
4.1.6 <i>Sequencing</i> Hasil Kloning	25-26
4.2 Konstruksi <i>cDNA</i> ke Dalam Vektor Ekspresi	26
4.2.1 Desain primer konstruksi <i>cDNA</i> Protein Kapsid.....	26-27
4.2.2 Amplifikasi dan Pemotongan dengan Enzim Restriksi	27-28
4.2.3 Ligasi dan Transformasi pada XL10-gold.....	28-29
4.2.4 Analisis Enzim Restriksi	30
4.2.5 <i>Sequencing</i> Konstruksi F700 Pada pET 28 a(+)	30-32
4.2.6 Ekspresi Protein Kapsid Hasil Konstruksi.....	32-33

BAB 5. Kesimpulan dan Saran	34
5.1 Kesimpulan.....	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35-38
LAMPIRAN.....	39-40



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Struktur Morfologi Potyvirus.....	4
2.2 Organisasi Gen Potyvirus	5
2.3 pJET1.2 <i>Vector Map</i>	8
2.4 pET 28 a (+) <i>Vector Map</i>	10
4.1 Hasil Visualisasi <i>cDNA</i> Protein Kapsid dengan Primer F1 dan R1 ..	23
4.2 Hasil Visualisasi Purifikasi <i>cDNA</i> Protein Kapsid.....	24
4.3 Koloni Hasil Transformasi Plasmid pJET1.2 ke dalam XL10-gold..	24
4.4 Visualisasi PCR Koloni Hasil Transformasi Plasmid pJET1.2	25
4.5 <i>Screenshot</i> hasil BLASTn dengan sekuens lain pada <i>GeneBank</i>	26
4.6 Visualisasi Hasil PCR dengan Primer Konstruksi F2 dan R2	27
4.7 Visualisasi Hasil Pemotongan pET dengan <i>XhoI</i> dan <i>BamHI</i>	28
4.8 Transformasi Hasil Konstruksi ke dalam XL10-gold.....	29
4.9 Hasil PCR Koloni dengan T7 Promoter dan Terminator.....	29
4.10 Hasil Analisis Enzim Konstruksi <i>cDNA</i> dalam Vektor Ekspresi.....	30
4.11 Sekuens F700 dalam pET 28 a(+) Hasil <i>Sequencing</i>	31
4.12 Homologi Asam Amino CP-F700 dengan Isolat Lain.....	32
4.13 Peta konstruk plasmid pET 28 a(+) dengan <i>insert</i> berupa <i>cDNA</i> protein kapsid berukuran ± 700 bp.	32
4.14 Hasil Visualisasi SDS-PAGE Konstruksi F700 dalam pET 28 a(+) ...	33

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Hasil <i>Multialignment</i> sekuens Penyandi Protein Kapsid	39-40



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Kandungan sukrosa yang tinggi pada tebu menjadikan salah satu alasan tanaman tebu biasa dimanfaatkan sebagai bahan baku utama dalam industri gula (Indrawanto dkk., 2010). Loganandhan *et al.* (2012) menyatakan bahwa pada prinsipnya, peningkatan produksi gula tebu dapat dilakukan melalui perluasan areal tanam, peningkatan bobot tebu per hektar, dan peningkatan rendemen. Tetapi, peningkatan produksi gula tebu melalui rendemen lebih diutamakan karena dapat meningkatkan hasil gula tanpa meningkatkan kapasitas pabrik gula.

Rendemen gula tebu yang dihasilkan masih berada dibawah potensi yang dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain kurangnya unsur hara dalam tanah serta gangguan yang disebabkan oleh hama dan penyakit. Gangguan hama dan penyakit pada tanaman tebu merupakan kendala terbesar yang dihadapi karena pengendalian secara konvensional belum dapat mengatasi permasalahan tersebut (Mirzawan dan Samoedi, 1995). Salah satu penyakit yang menyerang tanaman tebu adalah penyakit mosaik yang disebabkan oleh *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) (Koesmihartono, 2009). Kehadiran virus ini dapat menghambat fotosintesis, merusak tanaman dan menekan tingkat produktifitas tanaman tebu hingga 0.2%-50% tergantung dari seberapa berat infeksi virus dan ketahanan varietas terhadap *Sugarcane Mosaic Virus* (Duriat, 1979).

Penyebaran *Sugarcane Mosaic Virus* meluas hingga ke beberapa negara meliputi Argentina, Pakistan, China, Meksiko serta Indonesia. Penyebaran yang meluas ini dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah daya virulensi virus serta faktor transmisi virus ke tanaman inang. Salah satu protein yang berperan dalam proses penularan atau infeksi ke sel inang dan umumnya digunakan sebagai ciri pembeda antar *strain* adalah protein kapsid (Ivanov *et al.*, 2014). Salah satu upaya dalam mengidentifikasi penyebaran virus tersebut terutama di lapang adalah dengan cara deteksi dini melalui uji serologi. Uji serologi lebih efektif digunakan dalam deteksi *Sugarcane Mosaic Virus* dibandingkan dengan deteksi secara morfologi karena beberapa *strain* yang juga

tergolong dalam anggota potyvirus memiliki gejala yang hampir sama (Akin, 2006). Analisis molekuler dari gen penyandi protein kapsid perlu dilakukan dalam upaya penanggulangan penyakit mosaik pada tanaman tebu karena memegang peranan yang penting dalam mekanisme infeksi maupun identifikasi (Gell, 2011).

Kendala utama dalam uji serologi *Sugarcane Mosaic Virus* adalah kesulitan dalam pengadaan antigen protein virus murni dalam pembuatan antibodi. Melalui kloning gen *cDNA* protein kapsid dapat dilakukan perbanyakan dan produksi protein rekombinan dalam *E.coli* sehingga lebih memudahkan dalam isolasi materi genetik. Protein rekombinan diproduksi dalam *E.coli* dengan melakukan konstruksi *cDNA* terlebih dahulu ke dalam vektor ekspresi. Manfaat lain dari produksi protein rekombinan adalah membantu dalam studi biofisik serta analisis struktur dan fungsi protein yang berkaitan erat dengan daya virulensi dari SCMV (Lyrawati, 2004).

Beberapa penelitian yang serupa telah berhasil mengklonkan gen penyandi protein kapsid dari *strain* yang berbeda tetapi memiliki kesamaan dengan *Sugarcane Mosaic Virus* yaitu penelitian oleh Gell (2011) yang berhasil melakukan kloning gen protein kapsid pada *Maize Dwarf Mosaic Virus* (MDMV) serta penelitian dari Putri (2014) yang berhasil melakukan kloning protein kapsid pada *Pepper Vein Yellow Virus* (PVYV). Klon protein kapsid yang berhasil dilakukan umumnya hanya bersifat parsial, untuk itu dalam penelitian ini akan dilakukan kloning *cDNA* dengan ukuran yang lebih panjang yaitu berkisar 1000 bp dan dikonfirmasi dengan menggunakan metode *sequencing* serta dilakukan konstruksi *cDNA* ke dalam vektor ekspresi yang dapat digunakan untuk memperoleh protein rekombinan, sehingga memudahkan pengadaan antigen protein untuk pembuatan antibodi. Metode kloning yang dilakukan yaitu dengan cara mengisolasi gen target dari tanaman yang terinfeksi virus dan meligasikannya ke dalam vektor kloning. Vektor kloning yang sudah terligasi kemudian di transformasikan ke dalam sel kompeten agar dapat diperbanyak di dalam sel kompeten tersebut.

1.2. Rumusan Masalah

Protein kapsid rekombinan SCMV merupakan salah satu produk rekayasa genetika yang dimanfaatkan untuk beberapa kepentingan antara lain pembuatan antigen SCMV yang nantinya dapat digunakan untuk beberapa keperluan salah satunya dalam metode deteksi SCMV. Pembuatan antigen tersebut dapat dilakukan dengan cara terlebih dahulu dikloningkan ke dalam vektor kloning untuk tujuan perbanyakan selanjutnya dikonstruksikan ke dalam vektor ekspresi agar dapat diekspresikan menjadi protein rekombinan. Untuk itu dapat dirumuskan masalah yaitu bagaimana cara memperoleh klon *cDNA* yang menyandikan protein kapsid dan melakukan konstruksi ke dalam vektor ekspresi?

1.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melakukan kloning *cDNA* penyandi protein kapsid SCMV yang dapat digunakan dalam pembuatan protein rekombinan kapsid SCMV melalui konstruksi *cDNA* ke dalam vektor ekspresi.

1.4. Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dalam penelitian ini adalah klon *cDNA* yang diperoleh dan hasil dari konstruksi ke dalam vektor ekspresi dapat digunakan untuk memproduksi protein kapsid rekombinan SCMV. Protein kapsid rekombinan yang telah diperoleh dapat digunakan sebagai antigen SCMV dalam pembuatan antibodi *Sugarcane Mosaic Virus* maupun untuk penelitian serupa (SCMV).

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

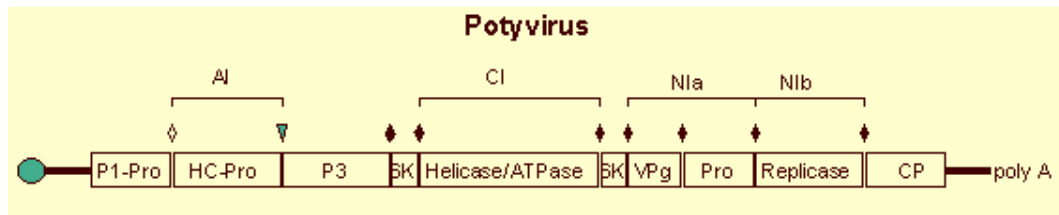
2.1.1. Karakteristik *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) termasuk dalam kelompok Potyvirus (famili Potyviridae) dengan genom berupa RNA utas tunggal berorientasi positif (+ssRNA) berukuran 9711 nukleotida (Fauquet *et al.*, 2005). Virus ini memiliki partikel berbentuk serabut *flexuous* (dengan panjang 700-760 nm dan berdiameter 13-14 nm) seperti yang tampak pada Gambar 2.1. Dalam tubuh virus mengandung 5,5% - 6,0% asam nukleat dan satu molekul RNA beruntai tunggal. Total panjang genomnya mencapai 9-10 kb, termasuk ekor poli (A), dan diduga mengkodekan poliprotein. Pada virus penyebab penyakit mosaik ini memiliki kode genetik yang dengan beberapa gen penyandi protein maupun gen yang tidak dapat menyandikan protein (Zhang *et al.*, 2008).



Gambar 2.1 Struktur morfologi potyvirus (Zhang *et al.*, 2008)

Genom potyvirus memiliki satu *Open Reading Frame* (ORF) yang mengkode beberapa protein. Translasi RNA potyvirus dimulai dari kodon *start* AUG pada posisi nukleotida 145-147 bp dari ujung 5' dan kodon *stop* terletak pada nukleotida ke 9525-9589 bp dari ujung 3' yang diikuti oleh sekuens polyadenilasi (poly A) (Pramarta, 2014). Struktur genom potyvirus dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Organisasi gen potyvirus (Pramarta, 2014)

2.1.2. Struktur dan Fungsi Protein Kapsid

Protein kapsid merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam proses infeksi virus ke dalam tanaman inang tetapi ada beberapa protein lain yang terintegrasi dalam membantu proses infeksi virus. Berat molekul protein kapsid SCMV berkisar antara 34 kDa hingga 39,5 kDa. Basa nukleotida penyandi protein kapsid memiliki ukuran berkisar antara 700- 1000 bp (Zhang *et al.*, 2008).

Data sekuens penyandi protein kapsid telah digunakan untuk membedakan antar kelompok virus dan antar *strain* virus yang tergolong dalam potyvirus. Secara umum, protein kapsid pada anggota potyvirus memiliki persentase keidentikan mencapai 38% - 71%, tetapi memiliki panjang dan urutan asam amino terminal yang berbeda, sedangkan antar *strain* dalam anggota yang sama memiliki persentase keidentikan sebesar 90% dan memiliki urutan asam amino terminal yang identik (Shukla and Ward, 1988).

Salah satu komponen penting virus yang tergolong dalam potyvirus adalah urutan asam amino DAG. Asam amino DAG merupakan kode asam amino yang menyandikan Asp-Ala-Gly (D-A-G) yang memiliki daerah konservatif didekat ujung N-terminal yang ditemukan dalam isolat virus dengan *aphid transmissible* (AT). Ketiga urutan asam-asam amino tersebut memiliki peranan dalam membantu transmisi komponen genetik virus yang dibawa oleh aphid menuju ke tanaman inang (Praba *et al.*, 1995).

Protein kapsid (CP) dan protein inklusi (CI) berguna untuk pergerakan dari satu sel inang ke sel inang lainnya melalui plasmodesmata. Protein kapsid juga berfungsi sebagai protein yang berperan dalam membantu pergerakan virion dalam jaringan vaskuler melalui interaksi dengan HC-Protein pada domain C dan

N-terminalnya. HC-protein sendiri berperan dalam menekan mekanisme pertahanan tanaman (Pramarta, 2014).

2.1.3. Deteksi *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV)

Deteksi molekuler SCMV dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode seperti *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), *Dot Immuno Binding Assay* (DIBA), *Immuno Electron Microscopy* (IEM), dan melalui metode RT-PCR. Tes RT-PCR dikembangkan untuk identifikasi banyak *strain* dan isolat dari SCMV seluruh dunia. *Probe* untuk diagnosis SCMV juga telah dikembangkan berdasarkan konservasi *central region* dari protein kapsid virus (Webster *et. al.*, 2004)

Analisis hasil ELISA dapat dilakukan secara kuantitatif dengan spektrofotometer (ELISA *reader*), sementara hasil DIBA hanya dapat dianalisis secara kualitatif. Keuntungan metode ELISA ialah sensitivitas yang sangat tinggi sehingga dapat mendeteksi virus pada konsentrasi rendah (1–10 ng/mL), dapat menguji sampel dalam jumlah banyak secara cepat, menggunakan antiserum sedikit, memperoleh data secara kualitatif dan kuantitatif, dan tahapan pengujian yang mudah. Batas sensitifitas sap DIBA lebih tinggi dibandingkan dengan metode ELISA dan hanya memerlukan antiserum yang lebih sedikit dibandingkan dengan ELISA untuk pengujian dengan sampel yang sama (Anggraeni dan Sri, 2014). Dengan metode DIBA, virus dapat terdeteksi sampai pengenceran 500 kali ekstrak daun segar, sedangkan dengan *Immuno Electron Microscopy* (IEM) virus terdeteksi hingga 2.000 kali (Manzila dkk., 2005).

Deteksi *Sugarcane Mosaic virus* (SCMV) secara serologi dan biologi molekuler yang lain adalah dengan cara mendeteksi asam nukleat virus menggunakan *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR). Metode RT-PCR sudah banyak diaplikasikan dalam metode deteksi dan identifikasi berbagai macam virus yang menyerang tumbuhan. Pada umumnya, virus yang ditemukan pada biji atau batang sulit dibuat antiserum karena rendahnya konsentrasi materi genetik dalam organ tersebut. Selain itu, bahan propagasi tanaman seperti biji atau batang memiliki konsentrasi virus yang rendah

sehingga sulit terdeteksi secara serologi menggunakan antibodi (James, 1999). Oleh karena itu, selain menggunakan deteksi ELISA diperlukan metode lain yang memiliki akurasi dan sensitifitas yang tinggi seperti RT-PCR.

Metode deteksi menggunakan RT-PCR memiliki kelemahan yaitu komponen yang digunakan relatif mahal, tetapi memiliki sensitivitas tinggi dan metode ini sudah banyak diadaptasi untuk diagnosis rutin. Keberhasilan RT-PCR terletak pada kualitas RNA total dari *template* yang digunakan. Pada tanaman tertentu, sulitnya proses ekstraksi RNA dan tahapan pengerjaan yang rumit menjadi kendala dalam memperoleh kualitas RNA total yang digunakan (Marinho *et al.*, 1998). Kendala yang dialami disebabkan oleh kandungan fisik maupun kimia serta distribusi virus dalam jaringan tanaman yang tidak merata. Beberapa faktor tersebut berpengaruh terhadap pelepasan RNA virus dari jaringan tanaman terinfeksi (Thomson and Dietzgen, 1995; Hema *et al.*, 2003).

2.1.4. Cara Penanggulangan

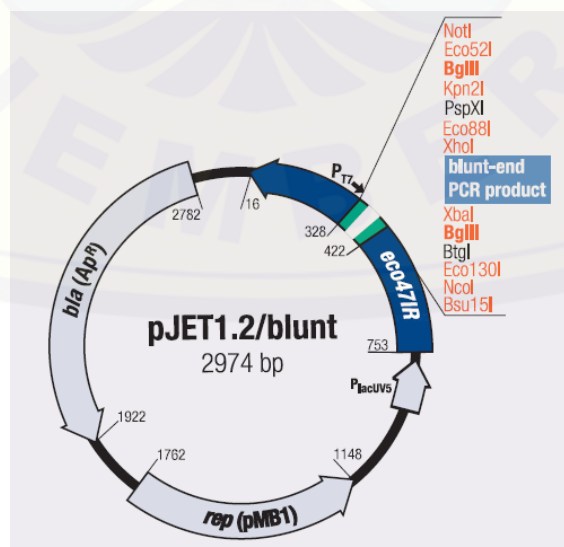
Langkah-langkah yang tidak terpisahkan seperti penggunaan benih bebas virus-tebu, praktek-praktek budaya yang tepat, pengolahan air panas, kultur meristem apikal dan klon resisten (dikembangkan melalui pemuliaan konvensional atau transformasi genetik) dapat memberikan kontrol ideal bagi penyebaran dan penanggulangan penyakit mosaik yang disebabkan oleh SCMV (Zhang *et al.*, 2008).

2.2. Kloning Gen dan Konstruksi

2.2.1. Vektor kloning

Plasmid memiliki karakteristik yang sesuai untuk digunakan sebagai vektor kloning sehingga seringkali digunakan dalam aplikasi rekayasa genetika. Plasmid memiliki daerah spesifik yang digunakan untuk menyisipkan DNA asing yang disebut dengan *multiple cloning site* (MCS). Kelebihan lain dari plasmid adalah terdapat gen penanda selektif dari antibiotik tertentu, penanda penapis dan jumlahnya banyak dalam suatu sel inang (*high copy number*) (Paoella, 1998).

Pada penelitian kloning dan konstruksi *cDNA* penyandi protein kapsid ini akan digunakan vektor pJET 1.2. Vektor ini akan membentuk ikatan kovalen jika ditambahkan dengan produk PCR yang memiliki ujung *blunt-end*. Pada plasmid pJET1.2 terdapat komponen genetik yaitu *rep* (pMB1), *replication start*, *bla*(Ap^R), gen *Eco47IR*, P_{lacUV5}, T7 promoter dan MCS seperti yang terlihat pada Gambar 2.3 (Weibel *et al.*, 2013). *rep*(pMB1) merupakan replikon dari plasmid pMB1 yang juga bertanggung jawab untuk proses replikasi pada plasmid pJET1.2. *Replication start* merupakan area inisiasi dimulainya replikasi pada plasmid pJET1.2. *bla*(Ap^R) merupakan gen β -lactamase sebagai *selectable marker* ketahanan terhadap antibiotik ampicilin yang berfungsi untuk seleksi koloni transforman yang tumbuh pada media seleksi. Gen *Eco47IR* adalah *lethal gene* yang berfungsi untuk menandai seleksi positif dengan cara apabila gen protein kapsid berhasil terinsersikan maka *lethal gene* tersebut tidak dapat diekspresikan sehingga koloni yang tumbuh pada media seleksi diasumsikan sebagai koloni transforman. Keberadaan *lethal gene* tersebut memudahkan untuk proses seleksi sehingga koloni yang tumbuh diharapkan merupakan koloni positif transforman. P_{lacUV5} merupakan modifikasi dari P_{lac} promoter untuk mengekspresikan gen *Eco47IR* pada level yang sesuai untuk menandai koloni positif. T7 promoter merupakan T7 RNA polymerase promoter yang berfungsi untuk transkripsi *in vitro* dari klon yang disisipkan.



Gambar 2.3 pJET 1.2 vector map

2.2.2. Sel Kompeten Agen Pembawa Klon cDNA Target

Strain E. coli yang akan digunakan dalam penelitian kali ini adalah *strain* XL10-gold dengan genotip *endA1 gyrA96 lacΔ(mcrA) 183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 recA1 thi-1 relA1 supE44 Hte F'[lac I^q lac ZΔM15 proAB⁺ Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]* dan *strain E.coli* BL21 dengan genotip *gal hsdS_B ompT*. Keunggulan *strain* XL10-gold dibandingkan *strain* lain yang biasa digunakan misalnya DH5α adalah pada XL10-gold memiliki genotip dengan mutasi pada gen *Hte* yang berfungsi untuk meningkatkan pengambilan materi genetik asing seperti plasmid dalam jumlah yang besar sehingga lebih efektif dalam transformasi. Sedangkan pada *strain* BL21 yang digunakan memiliki keunggulan defisiensi *protease* yang dapat mencegah rusaknya protein yang diekspresikan karena keberadaan dari enzim *protease* yang terdapat di dalam sel.

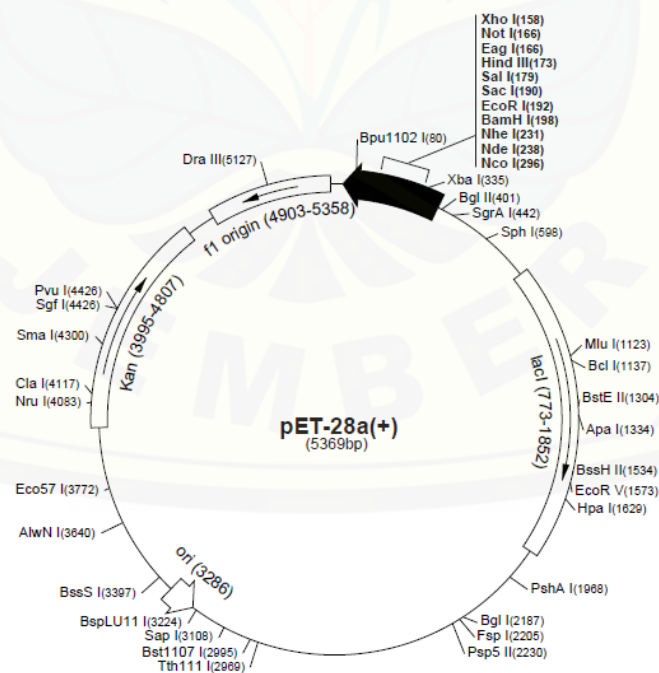
2.3. Konstruksi dalam Vektor Ekspresi pET-28 a (+)

Sejumlah plasmid dapat pula digunakan sebagai vektor ekspresi. Vektor ekspresi merupakan vektor yang dirancang untuk memaksimalkan ekspresi gen asing yang dibawa (Weaver, 1977). Vektor ekspresi hanya memiliki beberapa karakteristik vektor kloning yang diperlukan untuk propagasi DNA, yaitu MCS dan penanda selektif antibiotik. Vektor ekspresi memiliki fitur tambahan yang penting untuk transkripsi gen dan translasi menjadi protein antara lain promoter, *ribosome binding site*, *ATG start codon*, dan sistem *tag* yang berfungsi untuk purifikasi protein rekombinan (Carson and Robertson, 2006).

Konstruksi dalam vektor ekspresi merupakan salah satu teknik yang digunakan dalam pembuatan antigen untuk pembuatan antibodi. Pada teknik ini, potongan DNA penyandi protein yang diinginkan ditransplantasikan ke dalam plasmid. Vektor ekspresi memiliki beberapa komponen yaitu ORI (*Origin of Replication*), operator, promoter, *selectable marker* dan *Multiple Cloning Site* (MCS) seperti yang terlihat pada Gambar 2.4 dibawah ini. ORI merupakan situs untuk memulai replikasinya sendiri, sehingga dalam sel mampu

bereplikasi/menggandakan diri. Operator (O) berfungsi mengatur gen struktur menjadi aktif atau dalam keadaan terbuka dan menjadi tidak aktif atau dalam keadaan tertutup. Agar molekul DNA dapat digunakan sebagai cetakan dalam sintesis RNA, kedua untainya harus dipisahkan satu sama lain di tempat-tempat terjadinya penambahan basa pada RNA. Selanjutnya, begitu penambahan basa selesai dilakukan, kedua untai DNA segera menyatu kembali. Pemisahan kedua untai DNA pertama kali terjadi di suatu tempat tertentu, yang merupakan tempat pengikatan enzim RNA polimerase di sisi 5' (*upstream*) dari urutan basa penyandi (gen) yang akan ditranskripsi. Daerah ini disebut dengan daerah promoter (Santoso dkk., 2011).

Bagian lain yang juga terdapat dalam vektor ekspresi adalah *selectable marker* yang berguna untuk proses seleksi, yaitu tahap untuk menyeleksi plasmid yang membawa DNA sisipan (rekombinan) dari plasmid yang tidak disisipi DNA asing. Marker seleksi yang umum adalah gen resistensi terhadap antibiotika, misalnya ampisilin atau kanamicin. Sedangkan MCS berfungsi sebagai daerah penyisipan gen yang diinginkan (Santoso dkk., 2011).



Gambar 2.4 pET 28 a(+) vector map

BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus 2015 hingga bulan April 2016 dan dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biologi Molekuler dan Bioteknologi Tanaman CDAST (*Center for Development of Advance Science and Technology*) serta di Laboratorium Botani Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Jember.

3.2. Alat dan Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi sampel daun tebu var PS. 864 yang terindikasi terjangkit virus SCMV dan sampel tebu lapang PS. 881 dengan gejala mosaik yang digunakan sebagai bahan isolasi RNA, *E.coli strain* XL10-gold untuk kloning cDNA, *E.coli strain* BL21 untuk ekspresi protein rekombinan, pJET1.2 (Thermo) yang digunakan sebagai vektor kloning cDNA penyandi protein kapsid SCMV, dan plasmid pET 28a(+) (Invitrogen) yang digunakan sebagai vektor ekspresi dalam konstruksi cDNA dalam pembuatan protein rekombinan. Alat yang digunakan dalam penelitian ini sudah disebutkan dalam prosedur penelitian.

3.3. Prosedur Penelitian Kloning

3.3.1. Persiapan Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sampel daun dari tanaman tebu yang sudah terinfeksi SCMV secara artifisial yaitu berasal dari tanaman tebu lapang dan tanaman tebu varietas PS. 864 yang sudah dideteksi oleh penelitian sebelumnya (Sholeh, 2015). Pengambilan sampel berupa daun, dipilih berdasarkan gejala yang terdapat pada daun yaitu menunjukkan adanya bercak mosaik (bercak tidak beraturan) disekitar tulang daun mirip dengan gejala klorosis pada daun (Tjahjadi, 1989). Daun yang diambil merupakan daun dengan gejala mosaik paling dominan.

Sampel daun yang telah diambil dari tanaman terinfeksi kemudian ditimbang sebanyak 5 gram dan dilakukan proses isolasi RNA total dengan menggunakan metode *guanidine thiocyanate* pada gradien *cesium chloride* menggunakan *microultracentrifuge*.

3.3.2. Isolasi RNA

Isolasi RNA dengan metode *Guanidine Thiocyanate* pada gradien *Cesium Chloride* menggunakan *microultracentrifuge* umumnya digunakan untuk isolasi RNA total dari sampel berupa tumbuhan. Isolasi RNA total yang dihasilkan menggunakan prinsip dasar pelisisan sel dan pemisahan berdasarkan berat molekul (Sambrook and Russel, 2001).

Sampel daun tebu sebanyak 5 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 *guanidine thiocyanate* 4M dengan perbandingan 1:2 dari berat sampel. Pada *homogenate* ditambahkan *Na-Lauryl sarcocinate* 4% dari total volume *buffer* serta *Sodium acetate* 25 mM. Sampel dan campuran kemudian divortex hingga homogen. Sampel yang sudah homogen disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 20°C selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dari proses sentrifugasi ditransfer pada *centrifuge tube* yang lain dan dilakukan sentrifuge kembali tanpa adanya penambahan apapun pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dalam suhu 4°C. Supernatan yang diperoleh dari sentrifugasi kedua ditransfer ke *centrifuge tube* dalam kondisi *on ice* (Sambrook and Russell, 2001).

Alat yang digunakan dalam isolasi RNA total ini adalah *microultracentrifuge* dengan menggunakan rotor S50ST yang sudah dihidupkan 30 menit sebelum digunakan. *Cesium chloride* 5,7 M sebanyak 2 mL dimasukkan dalam tabung *microultracentrifuge* dan ditambahkan supernatan secara hati-hati agar kedua lapisan tidak tercampur. Tabung *microultracentrifuge* tersebut diletakkan dalam rotor S50ST dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 30.000 rpm pada suhu 20 °C selama 16 jam (*overnight*). Supernatan yang

dihasilkan dari proses sentrifugasi kemudian dibuang hingga menyisakan pelet. Pelet yang diperoleh dilakukan resuspensi menggunakan 300 μL aquabidest steril. Dari hasil resuspensi, ditambahkan *phenol* 300 μL untuk mendenaturasi protein yang terdapat dalam sampel larutan. Sebelum dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4 °C selama 10 menit terlebih dahulu dilakukan vortex (Sambrook and Russell, 2001).

Menurut Sambrook and Russell (2001) tiga lapisan yang terbentuk dari proses sentrifugasi diambil lapisan paling atas (lapisan bening) sebanyak 200 μL dan ditambahkan *chloroform* dengan perbandingan $0.1 \times \text{volume solution}$. *Inverting* perlu dilakukan setelah penambahan bahan yang bertujuan untuk *smooth homogenization* dan ditambahkan *ethanol PA 100%* sebanyak $2.5 \times \text{volume solution}$ untuk kemudian dilakukan sentrifugasi. Sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit menghasilkan dua lapisan, lapisan paling atas diambil sebanyak 200 μL dan ditambahkan *ammonium acetate* 4 M kemudian dilakukan inkubasi pada suhu -20°C selama 1 jam. Penambahan *ammonium acetate* bertujuan untuk presipitasi molekul RNA. Setelah dilakukan proses presipitasi, dilakukan penghisapan cairan dengan menggunakan aspirator. *Ethanol 70% (fresh)* kemudian ditambahkan pada pelet yang dihasilkan. Penambahan *ethanol 70%* bertujuan untuk purifikasi molekul RNA yang telah terpresipitasi. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan antara molekul RNA yang telah terpresipitasi dengan *ethanol 70%*. Molekul RNA yang diperoleh dilarutkan dengan menggunakan aquabidest steril dan diukur konsentrasinya dengan menggunakan *nano drop*.

3.3.3. 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 by Roche*. 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 *two step* atau reaksinya dilakukan pada 2 *tube* yang berbeda. Volume RNA yang digunakan adalah 2,5 μL dengan menambahkan 1 μL primer oligo dT dan 9,5 μL *sterile water* untuk total volume reaksi 13 μL . Total volume reaksi 13 μL ini disarankan untuk penggunaan *template* RNA dengan kisaran konsentrasi yang diperoleh mencapai 10 ng hingga 5 μg RNA total dan 1 ng hingga 100 ng mRNA. Semua komponen reagen yang telah dimasukkan dalam tabung *eppendorf* kemudian diinkubasi selama 10 menit pada *dry block* suhu 65°C. Inkubasi ini bertujuan untuk proses denaturasi RNA sekunder karena struktur dari RNA sekunder ini akan mengganggu proses transkripsi terbalik yaitu pada saat penempelan primer pada *template* RNA. Inkubasi *on ice* dilakukan selama 3-5 menit sebelum penambahan *transcriptor buffer* sebanyak 4 μL , *RNAase inhibitor* 0,5 μL , dNTP mix 2 μL dan *reverse transcriptase* sebanyak 0,5 μL ke dalam tabung *eppendorf* yang berisi *template* dalam reaksi yang pertama. Total reaksi setelah penambahan komponen tersebut adalah 20 μL . Inkubasi selama 30 menit pada suhu 55 °C merupakan tahapan proses transkripsi terbalik oleh enzim *reverse transcriptase* untuk mensintesis *cDNA* dari *template* RNA. Setelah inkubasi pada suhu 55 °C dilakukan inaktivasi pada suhu 85 °C selama 5 menit dan *cDNA* yang telah disintesis dapat disimpan untuk penggunaan berikutnya maupun dapat langsung digunakan.

3.3.4. *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 μL yang terdiri dari *master mix Roche* 25 μL , *Primer F1 forward* 2 μL , *Primer R1 reverse* 2 μL , *ddH₂O* 19 μL dan *cDNA template* sebanyak 2 μL . Primer yang

digunakan dalam proses PCR ini sebelumnya telah didesain dengan menghomologikan daerah konservatif dari gen penyandi protein kapsid dan 600 basa nukleotida sebelum daerah konservatif tersebut dengan nomer aksesori NC_00398.1 pada *Gene Bank* dengan keenam sekuens lain yang berasal dari isolat SCMV yang berbeda yaitu ARG 1662 (*GeneBank*: JX237862.1), ARG 915 (*GeneBank*: JX237863.1), MEX JAL-1 (*GeneBank*: GU474635.1), MEX VER-1 (*GeneBank*: EU091075.1), PEKING (*GeneBank*: AY569692.1) dan CHINA BD-8 (*GeneBank*: JN021933.1). Homologi sekuens dilakukan dengan menggunakan program Genetyx ver 8.0 sehingga diperoleh desain *primer F1 forward*: 5'- CTC CCT GGG TAT TTA GAG G -3' dan *primer R1 reverse*: 5'- TTC CAG GAG ACT AGT GGT G -3'. Total siklus dalam satu kali reaksi adalah 40 siklus dengan program PCR meliputi: predenaturasi 94 °C selama 2 menit; denaturasi 94 °C selama 30 detik; *annealing* 56 °C selama 30 detik; *extention* 72 °C selama 1 menit dan *final extention* pada 72 °C selama 5 menit.

Konfirmasi hasil PCR dilakukan dengan cara elektroforesis *cDNA* pada gel agarose 1% menggunakan *buffer* TAE (Tris-Acetate-EDTA) 50X 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 Kbp dari Intron. Pita DNA yang diperoleh dari hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan *gel doc*.

Hasil elektroforesis yang diperoleh kemudian dilakukan purifikasi dengan cara mengekstraksi pita DNA yang terdapat pada gel agarose 1% dengan menggunakan *PCR Clean Up Gel Extraction by Roche*. Pita DNA yang terletak di gel agarose dipotong dan dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* yang sebelumnya telah ditimbang beratnya. Setiap 100 mg berat gel ditambahkan 200 µL binding *buffer* NTI. Berat gel diperoleh dengan cara mengurangi berat tabung *ependorf* yang telah berisi gel dengan berat awalnya. Gel yang berbentuk padat dilarutkan dengan cara inkubasi pada suhu 50°C dalam *dry block* selama 5-

10 menit hingga gel benar-benar meleleh kemudian ditransfer ke dalam *collecting tube*. Sampel yang sudah diletakkan pada *collecting tube* disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik pada sentrifugator suhu ruang. Cairan atau *flow through* yang dihasilkan dari hasil sentrifugasi dibuang dan ditambahkan dengan menggunakan *buffer* NT3 (*washing buffer*) yang telah ditambahkan dengan ethanol PA dengan perbandingan 1:4. Total volume *buffer* NT3 yang ditambahkan adalah 700 μ L dan dilakukan sentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. *Flow through* yang dihasilkan dibuang dan dilakukan sentrifugasi tanpa penambahan apapun selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. *Collecting tube* ditransfer pada tabung *ependorf* yang baru, kemudian ditambahkan *buffer* NE (*elution buffer*) sebanyak 30 μ L dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang. Setelah proses inkubasi, dilakukan sentrifugasi selama 1 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Pengukuran konsentrasi DNA hasil purifikasi dilakukan dengan cara elektroforesis dan membandingkannya dengan marker DNA 1 Kbp.

3.3.5. Pembuatan Sel Kompeten

Sel kompeten yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari bakteri *E.coli strain* XL10-gold yang memiliki efektifitas yang tinggi dan sering digunakan untuk proses transformasi dan juga strain BL21 yang digunakan dalam ekspresi protein kapsid rekombinan. Bakteri *E.coli strain* XL-10 gold dan BL21 ditumbuhkan dalam media LB *plate* untuk memperoleh koloni tunggal. Koloni tunggal yang ada pada media agar diinokulasikan dalam media LB cair sebanyak 6 mL dan dilakukan inkubasi *shaker* selama 16 jam (*overnight*) pada kecepatan 150 rpm. Inokulum hasil inkubasi diambil sebanyak 1 mL untuk diinokulasikan kembali dalam 100 mL LB cair selama \pm 3 jam atau hingga OD mencapai \pm 0,5. Inokulum yang diperoleh ditransfer kedalam 2 tabung sentrifuge dan dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi dibuang, peletnya diresuspensi menggunakan CaCl_2 0.1 mM (*cold*) sebanyak 25 mL dan dilakukan inkubasi *on ice* selama 10 menit (Sambrook and Russell, 2001).

Inkubasi *on ice* yang dilakukan selama 10 menit dilanjutkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang, peletnya diresuspensi dengan menggunakan CaCl_2 0.1 mM sebanyak 15 mL. Setelah penambahan CaCl_2 dilakukan inkubasi *on ice* selama 10 menit, sentrifugasi kembali pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang dihasilkan dibuang dan pelet diresuspensi dengan menggunakan 4 mL CaCl_2 0.1 mM yang ditambahkan dengan gliserol 15% kemudian dilakukan *inverting*. Sel kompeten tersebut dimasukkan ke dalam tabung *ependorf* dan dimasukkan dalam termos yang berisi N_2 cair hingga beku kemudian disimpan pada suhu -80°C atau siap untuk digunakan (Sambrook and Russell, 2001).

3.3.6. Ligasi pada vektor Kloning dan Transformasi pada XL10-gold

Ligasi merupakan proses penempelan sekuens DNA target ke dalam vektor kloning yang berupa plasmid rekombinan. Ligasi yang dilakukan dengan menggunakan vektor berupa plasmid pJET1.2 dan menggunakan enzim *ligase* dari TAKARA. Total volume yang digunakan dalam satu kali reaksi adalah 1 μL yang terdiri dari: *solution I* by TAKARA sebanyak 5 μL ; *sterile water* sebanyak 1 μL ; pJET1.2 *vector* sebanyak 1 μL ; dan PCR *product* sebanyak 3 μL . setelah semua komponen dicampur secara perlahan, dilakukan inkubasi pada suhu 16°C .

Hasil ligasi ditransformasikan ke dalam sel kompeten *E.coli strain XL10-gold* yang telah dibuat sebelumnya. Tabung *ependorf* yang terdapat hasil ligasi ditambahkan 100 μL sel kompeten kemudian diinkubasi *on ice* selama 30 menit. Setelah dilakukan inkubasi, dilanjutkan dengan *heat shock* pada *dry block* dengan suhu 42°C selama 60 detik dan segera diinkubasi *on ice* setelah proses *heat shock* berakhir. Media SOB sebanyak 250 μL ditambahkan pada tabung *ependorf* kemudian dilakukan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C . Dari hasil transformasi yang diperoleh, diambil volume sebanyak 150 μL kemudian di tumbuhkan dalam media LB *plate* yang telah ditambahkan dengan antibiotik ampicilin 50 ppm. Waktu inkubasi yang dibutuhkan dalam menumbuhkan hasil transformasi adalah 16 jam (*overnight*).

Koloni yang tumbuh pada media LB *plate* dengan penambahan 50 ppm ampicilin tersebut dikonfirmasi menggunakan PCR *colony by Kappa* dengan menggunakan primer yang sama pada saat amplifikasi *cDNA*. Volume yang digunakan dalam satu kali reaksi adalah 10 μL dengan komposisi *master mix Kappa* sebanyak 5 μL , *primer forward* 1 μL , *primer reverse* 1 μL dan ddH_2O sebanyak 3 μL . *Template* yang digunakan dalam PCR *colony* adalah koloni tunggal yang tumbuh pada media LB *plate* dengan penambahan 50 ppm ampicilin. Total siklus dalam satu kali reaksi adalah 40 siklus dengan program PCR meliputi: predenaturasi 94 °C selama 2 menit; denaturasi 94 °C selama 30 detik; *annealing* 56 °C selama 30 detik; *extention* 72 °C selama 1 menit dan *final extention* pada 72 °C selama 5 menit. Hasil PCR *colony* kemudian dielektroforesis pada gel agarose 1% menggunakan TAE *buffer* dan divisualisasikan dengan menggunakan *gel doc*. Sebelum dimasukkan dalam *mixture* komponen PCR *colony*, koloni tunggal yang akan dikonfirmasi terlebih dahulu ditumbuhkan pada media LB *plate* dengan penambahan ampicilin 50 ppm yang lain dengan tujuan untuk memperoleh *copy colony* jika ternyata koloni tersebut diduga sebagai koloni positif (mengandung *insert* gen target pada plasmidnya) setelah proses visualisasi dilakukan.

3.3.7. Isolasi Plasmid (*Mini Preparation*)

Koloni yang sudah terkonfirmasi diduga positif kemudian diisolasi plasmidnya menggunakan metode *mini preparation*. Koloni tunggal tersebut diinokulasikan dalam media LB cair 2 mL dengan penambahan antibiotik ampicilin 50 ppm dan digojog selama 16 jam (*overnight*) dengan kecepatan 150 rpm. Setelah inkubasi, inokulum yang diperoleh ditransfer dalam tabung *eppendorf* dan dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang dihasilkan dibuang sedangkan peletnya dikeringanginkan. Pelet pada tabung *eppendorf* ditambahkan dengan *solution* I sebanyak 100 μL kemudian dilakukan *pipetting* untuk meresuspensi pelet yang ada di dasar tabung. *Solution* II sebanyak 200 μL ditambahkan pada suspensi pelet dan dilakukan *inverting* 4-6 kali kemudian diinkubasi selama 10 menit. Setelah inkubasi 10

menit, ditambahkan *solution* III sebanyak 150 μ L dan inkubasi *on ice* kembali selama 10 menit (Sambrook and Russell, 2001).

Ketiga *solution* yang digunakan dalam metode *mini preparation* merupakan buffer lisis sel. Pemisahan debris sel dengan komponen sel yang sudah lisis dilakukan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Pelet yang dihasilkan dari proses sentrifugasi merupakan debris sel, sedangkan komponen selnya berada pada fase supernatan. Supernatan ditransfer pada tabung *ependorf* baru dan ditambahkan dengan PCI (*Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol*) *equal volume*. Setelah penambahan PCI dilakukan vortex untuk homogenisasi dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 5 menit. Sentrifugasi yang dilakukan akan membentuk 3 lapisan, lapisan paling atas diambil sebanyak 350 μ L dan dilakukan presipitasi dengan menggunakan ethanol PA (*cold*) sebanyak $2,5 \times$ volume supernatan. Presipitasi dilakukan 1 jam pada suhu -20°C . Setelah dilakukan presipitasi kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 5 menit dan dilakukan pembilasan dengan menggunakan ethanol 70% sebanyak 1 mL. Untuk memisahkan ethanol dengan plasmid yang diperoleh, dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Sisa ethanol yang ada pada sampel dihilangkan dengan cara penguapan menggunakan evaporator dalam program HPLC pada suhu 45°C selama 10 menit. Plasmid yang diperoleh dilarutkan menggunakan buffer TE 30 μ L. Kontaminan berupa RNA dihilangkan dengan cara penambahan RNase 10 μ L dan diinkubasikan selama 1 jam pada suhu 37°C dan kembali dilakukan presipitasi menggunakan *ethanol absolute* dan juga *ammonium asetat* 4M.

3.3.8. Sequencing Hasil Ligasi ke dalam Vektor Kloning pJET1.2

Hasil isolasi plasmid pJET1.2 yang sudah terinsersi gen target kemudian dikirimkan untuk proses *sequencing*. Penentuan sekuensi kode genetik fragmen *cDNA* protein kapsid SCMV hasil isolasi dilakukan di PT. Genetika Science Indonesia yang bertempat di Jakarta yang dikirim secara reguler kepada 1st BASE Malaysia. Data Sekuensi yang diperoleh kemudian diperiksa menggunakan aplikasi *BioEdit* dan dibandingkan dengan data yang ada di *database* NCBI

(National Center for Biotechnology Information) dengan menggunakan program *BLASTn* (Basic Local Alignment Search Tools nucleotide). Hasil sekuensi dari NCBI tersebut dihomologikan dengan beberapa sekuens lain menggunakan program Genetyx versi 8.0.

3.4. Prosedur Penelitian Konstruksi

3.4.1. Desain Primer untuk Konstruksi ke dalam Vektor Ekspresi

Desain primer yang akan digunakan dalam proses konstruksi dilakukan dengan cara sekuens yang telah diperoleh dari proses *sequencing* diblastkan dan disejajarkan dengan beberapa sekuens lain dalam *gene bank* yaitu sekuens dari ARG-130, ARG-345 dan Brisbane. Setelah diblastkan, sekuens tersebut disesuaikan antara sisi pemotongan enzim restriksi dalam vektor pET-28 a(+) dan daerah konservatif dari gen penyandi protein kapsid sehingga tidak merubah urutan basa nukleotida penyandi protein-protein tertentu dan tetap mempertahankan urutan nukleotida vektor ekspresinya. Pasangan primer forward dan reverse yang digunakan dalam Konstruksi adalah primer F2 *forward* 5' - TGG TGG ATC CGG TGC ACA AAC AGG AGC T -3' sedangkan sekuens untuk primer R2 *reverse* 5' - CTG CTC GAG TCC CAA CAG AGA GTG CAT -3'.

Primer yang didesain untuk konstruksi ini kemudian digunakan untuk proses amplifikasi *cDNA* yang sudah diklonkan pada vektor kloning. Proses amplifikasi dan komponen serta kondisi PCR dilakukan sama halnya dengan yang telah disebutkan pada prosedur PCR dalam kegiatan kloning. Hasil PCR yang diperoleh dilakukan elektroforesis dan visualisasi dengan prosedur yang sama.

3.4.2. Analisis Enzim Restriksi

Enzim restriksi yang digunakan dalam pemotongan gen target yang terdapat dalam plasmid adalah *XhoI* dan *BamHI*. Enzim *XhoI* dan *BamHI* memiliki sisi pemotongan yang spesifik dengan hasil pemotongan ujungnya berupa *sticky end* (Watson *et al.*, 1988). Penggunaan enzim *XhoI* dan *BamHI* ini dikarenakan enzim tersebut memiliki daerah pemotongan yang terletak sebelum

dan sesudah daerah konservatif penyandi gen protein kapsid dan juga merupakan sisi pemotongan yang terdapat pada plasmid pET 28 a(+). Volume total yang digunakan dalam reaksi pemotongan adalah 10 μ L yang terdiri dari *buffer XhoI* dan *BamHI* 1 μ L, enzim *XhoI* dan *BamHI* 0,5 μ L, *RNAase* 1 μ L, ddH₂O 2,5 μ L dan *template* berupa plasmid sebanyak 5 μ L. setelah semua komponen dicampur secara perlahan, dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama *overnight*.

Fragmen gen protein kapsid diperoleh dari pemotongan klon pJET 1.2-CP dengan enzim restriksi *BamHI* dan *XhoI* yang disisipkan ke vektor ekspresi pET-28 a (+) yang dipotong dengan enzim yang sama. Hasil ligasi ditransformasikan ke bakteri *E. coli strain XL10-gold* dan diseleksi dengan antibiotik kanamisin (50 ppm). Koloni yang terbentuk ditumbuhkan kembali pada media LB cair dan diisolasi DNA plasmidnya serta diverifikasi dengan enzim restriksi yang sesuai. Proses pemotongan dan ligasi dilakukan sesuai dengan prosedur sebelumnya.

3.4.3. Ekspresi Protein Kapsid Hasil Konstruksi

Konstruksi *insert* ke dalam vektor ekspresi kemudian ditransformasi ke dalam sel kompeten BL21 untuk dilakukan produksi protein rekombinan. Produksi ini dilakukan dalam skala kecil yaitu dalam volume inokulum 50 mL dengan menggunakan IPTG dengan konsentrasi 0,1 mM. Ekstraksi protein dilakukan secara kimiawi dan protein yang dihasilkan terlebih dahulu diukur konsentrasinya dengan menggunakan reagen Bradford dan diukur absorbansinya untuk menentukan perbandingan *buffer load* dan *sample* sesuai dengan nilai absorbansinya. Pola protein rekombinan SCMV dilihat dengan menggunakan SDS-PAGE. Komponen SDS-PAGE yang digunakan adalah *upper gel* 4% dan *lower gel* 12,5% dan dielektroforesis menggunakan tegangan 50 V.

BAB 5. PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan yaitu didapatkan klon *cDNA* penyandi protein kapsid berukuran ± 1000 bp yang diinsertkan ke dalam vektor kloning pJET1.2 dengan hasil *alignment* menunjukkan adanya homologi (kesamaan) yang tinggi dengan protein kapsid sekuens ARG-345 dan ARG-130 sebesar 92%. *cDNA* protein kapsid SCMV berukuran ± 700 pb telah berhasil dikonstruksikan ke dalam vektor ekspresi pET 28 a(+) yang memiliki sisi pemotongan enzim restriksi *XhoI* dan *BamHI*. Hasil konstruksi tersebut telah diekspresikan pada *E.coli strain* BL21 dan dilihat pola protein yang terbentuk menggunakan SDS-PAGE, dari hasil SDS-PAGE dapat terlihat pembentukan protein rekombinan kapsid SCMV dalam bentuk *insoluble protein* yang nantinya siap digunakan untuk produksi antigen dalam pembuatan antibodi protein kapsid SCMV.

5.2. Saran

Proses pemotongan menggunakan enzim restriksi sebaiknya dilakukan secara bertahap jika pemotongan yang dilakukan menggunakan dua enzim yang berbeda dan terlebih dahulu dilakukan inaktivasi sebelum pemotongan menggunakan enzim kedua. Optimasi pemotongan perlu dilakukan dikarenakan terdapat beberapa enzim seperti *XhoI* yang memerlukan waktu inkubasi hingga *overnight* untuk pemotongan yang optimal. Waktu dan komponen pemotongan tersebut memiliki pengaruh terhadap proses ligasi sehingga perlu diperhatikan. Kendala yang dialami saat terjadi kemungkinannya adalah proses pemotongan yang tidak sempurna sehingga vektor dan *insert* tidak mudah untuk terligasi. Optimalisasi suhu ligasi juga perlu diperhatikan agar proses ligasi berjalan dengan baik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akin, H. M. 2006. *Virologi Tumbuhan*. Yogyakarta: Kanisius.
- Anggraeni, S. dan Sri Hendrastuti, S. 2014. Sensitivitas Metode Serologi dan Polymerase Chain Reaction untuk Mendeteksi Bean Common Mosaic Potyvirus pada Kacang Panjang. *Jurnal Fitopathologi Indonesia* Vol 10, No.1: 17-22.
- Bedoya, Giovanni Chaves and Luz Yineth Ortiz-Rojas. 2012. Evidence of Different Phylogenetic Origins of Two Mexican Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) Isolates. *Acta Agronomica* 61(1): 77-84.
- Carson, S. and Robertson, D. 2006. *Manipulation and Expression of Recombinant DNA: A Laboratory Manual. 2nd ed.* Elsevier Academic Press, London: xiv+151 hlm.
- Casali, Nicola and Andrew Preston. 2003. *E.coli Pasmid Vector Method and Application*. Methods in Molecular Biology Volume 235. Totowa N.J : Humana Press.
- Duriat A.S. 1979. Pengaruh *Tobacco Mosaic Virus* Pada Beberapa Varietas Tomat Dalam Masalah dan Pengendalian Penyakit Tanaman Pertanian Indonesia. *PFI Bogor* .124-129.
- Fauquet, C.M., M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L.A. Ball. 2005. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Amsterdam: Elsevier Acad Press.
- Gell, G. M. 2011. Molecular Analysis of The Protein kapsid Genes of Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV) Population. *Thesis*. Martonvásár: Szent István University.
- Hema M, Savithri H.S., and Sreenivasulu P. 2003. Comparison of direct binding polymerase chain reaction with recombinant protein kapsid antibody based dot-blot immunobinding assay and immunocapture-reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Sugarcane streak mosaic virus causing mosaic disease of sugarcane in India. *Current Science*. 85(12):1774-1777.
- Indrawanto, C., Purwono, Siswanto, M. Syakir, dan Widi, R. 2010. *Budidaya dan Pasca Panen Tebu*. Jakarta: ESKA MEDIA.

- Ivanov K.I, K. Eskelin, A. Lohmus and K. Makinen. 2014. Molecular And Cellular Mechanisms Underlying Potyvirus Infection. *Journal of General Virology*. . 95: 1415-1429.
- James D. 1999. A simple and reliable protocol for detection of *apple stem grooving virus* by RT-PCR and in a multiplex PCR. *J Virol Methods*. [83\(1-2\):1-9. DOI: http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00078-6](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00078-6).
- Koesmihartono, L. 2009. Penyakit *Streak Mosaic* Pada Tebu di Indonesia: Survei Lapangan, Deteksi Virus, Uji Penularan, Kisaran Inang, dan Ketahanan Varietas. *Jurnal MGP Fakultas Pertanian IPB, Bogor*. 45(1).
- Loganandhan. N, B. Gujja, V. Vinad Goud, dan U. S. Natarajan. 2012. *Sustainable Sugarcane Initiative (SSI): A Methodology of More Mith Less*. Sugar Tech.
- Lyrwati, D. 2004. *DNA Recombination And Genetic Techniques, Transmission Of Human Disease And Computer Resources For The Clinical And Molecular Genetic*. Indonesia: UNIBRAW Publication.
- Manzila, I., Jumanto, H., Rusmilah, S., dan S. Hendrastuti, H. 2005. Produksi Antibodi Poliklonal Peanut Stripe Virus. *Jurnal Bioteknologi Pertanian* Vol. 10, No. 2: 39-44.
- Marinho V. L. A., Kummert G., Rufflard G., Colinet D., and Lepoire P. 1998. Detection of *Apple stem grooving virus* in dormant apple trees with crude extracts as template for one-step RT-PCR. *Plant Dis*. 82(7):785- [790. DOI: http://dx.doi.org/10.1094/PDIS](https://doi.org/10.1094/PDIS). 1998.82.7.785.
- Mirzawan dan D. Samoedi. 1995. Upaya Pencarian Varietas Unggul dan Perlindungan Tanaman. *Laporan Hasil Kongres ISSCT XXII Columbia*. Komisi Biologi. Pros. Pert. Teknis. P3GI Pasuruan.
- Paolella, P. 1998. *Introduction to Molecular Biology*, First Edition. New York: BIOS Scientific Publishers Limited.
- Praba, L. A., J.J. Lopez-Moya, Meihua, C., Chintamani, D. A., and Thomas, P. P. 1995. Mutational Analysis of the Protein kapsid N-Terminal Amino Acids Involved In Potyvirus Transmission by Aphids. *Journal of General Virology*. (76): 265-270.
- Pramarta, I. G. R. 2014. Identifikasi Spesies Potyvirus Penyebab Penyakit Mosaik Pada Tanaman Cabai Rawit (*Capsicum frutescens* L.) Melalui Sekuens Nuklotida Gen Protein kapsid. *Tesis*. Denpasar: Universitas Udayana.

- Putri, Dayang D. 2014. Kloning dan *Sequencing* Gen Protein kapsid *Pepper Vein Yellow Virus* Penyebab Penyakit Daun Merah Pada Tanaman Wortel. *Skripsi*. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Putra, Lilik K. 2007. *Pengujian Ketahanan Klon Beberapa Varietas Tebu*. Pasuruan: Pusat Pengembangan dan Penelitian Perkebunan.
- Sambrook J., and Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition*. New York: Laboratory Pr.
- Santoso, T. J., Muhammad, H., S. H. Hidayat, Hajrial, A. dan Sudarsono. 2011. Konstruksi Kandidat Gen AVI Begomovirus pada PBI121 dan Introduksinya ke dalam Tembakau Menggunakan Vektor *Agrobacterium tumifaciens*. *Jurnal Agrobiogen*. 7(1): 9-18.
- Sheu, Der-Shyan, Yun-Ting Wang and Chia-Yin Lee. 2000. Rapid Detection of Polyhydroxyalkanoate-accumulating Bacteria Isolated from The Environment by Colony PCR. *Journals of Microbiology* (142): 2019-2025.
- Sholeh, A. 2015. Deteksi *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV) pada Tebu (*Saccharum officinarum* L.) Menggunakan Metode *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Shukla, D. D., and Ward, C. W. 1988. Amino Acid Sequence Homology Of Coat Proteins As A Basis For Identification and Classification Of The Potyvirus Group. *Journal of General Virology* 69, 2703-2710.
- Thomson D. and Dietzgen R.G. 1995. Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using rapid virus release protocol without tissue homogenization. *J-Virol Methods*. 54:85-95. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934\(95\)00022-M](http://dx.doi.org/10.1016/0166-0934(95)00022-M).
- Tjahjadi, N. 1989. *Hama dan Penyakit Tanaman*. Yogyakarta: Kanisius.
- Watson, James D., John Tooze, and David, T. Kurtz. 1988. *DNA Rekombinan "Suatau Pelajaran Singkat"*, diterjemahkan oleh Wisnu Gunarso. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Weaver, N. A. and P. W. Hedrick. 1977. *Genetics. 3rd Ed*. Wm C. Brown Publisher. Dubuque: xvi + 638 hlmn.
- Webster, Craig G., Stephen J. Wylie, and Michael, G. K. Jones. 2004. Diagnosis of Plant Viral Pathogens. *Current Science* 86(12).

- Weibel, P., Meriam, E., Jerzy, M., Annelies, S. Zinkernagel, and Reto, A. Schuepbach. 2013. Selection Vector for Direct Cloning of Proof Reading Polymerase Chain Reaction Products Based on the Lethal *ccdB* Gene in *Escherichia coli*. *Journal of Advanced in Microbiology*. 3(1): 14-24.
- Xiang, X., Diwen, Q., Richard D. Hegele, and Wan, C. Tan. 2001. Comparison of Different Methods of Total RNA Extraction for Viral Detection in Sputum. *Journal of Virological Methods* 94: 129-135.
- Yuryev, Anton. 2007. *PCR Primer Design*. Methods in Molecular Biology Volume 402. Totowa N.J.: Humana Press.
- Zhang, M. Q., Rao, G. P., Gaur, R. K., Ruan, M. H., Maneesha Singh., Sharma, S. R., Ashutosh Singh., and Pratibha Singh. 2008. Characterization, Diagnosis and Management of Plant Viruses. *Journal of Virology*. 1(1): 111-144.

LAMPIRAN A

NC_003398_cp. 1 AGTTTGCCAAAGSACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAT 60
 Sequence_arg1662 1 --TTTGCAAAGSACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAG 58
 Sequence_arg915 1 --TTTGCAAAGSACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAG 58
 Sequence_mex-jall 1 -----AAGACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAT 51
 isolate BD8_Chinaa 1 -GTTTGTCAAAGSACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAT 59
 isolate_Mex-Ver1 1 AGTTTGCCAAAGSACCTCCCTGGSTATTTAGAGGATTATAACGAAGAAGTTTCCATCAAT 60

NC_003398_cp. 61 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGAAAAGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 120
 Sequence_arg1662 59 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGAAAAGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 118
 Sequence_arg915 59 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGAAAAGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 118
 Sequence_mex-jall 52 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGTGGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 111
 isolate BD8_Chinaa 60 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGTGGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 119
 isolate_Mex-Ver1 61 CTGGAACAGTCGATGCAGGCGTCAAGGAGGAGGTGGTGGCGCCGAGCTCAGCCGCCAG 120

NC_003398_cp. 121 CCGCAGS-----TAG-TGGAACAGGAAACAGAAACCCATCTATGGAACTCCAGS-----G 170
 Sequence_arg1662 119 CCGCTGGAGCAGCAGCTCAAGGAGGAGCTCAACCACCAGCAACTGGAGCAGCCG-----G 174
 Sequence_arg915 119 CCGCTGGAGCAGCAGCTCAAGGAGGAGCTCAACCACCAGCAACTGGAGCAGCCG-----G 174
 Sequence_mex-jall 112 GGCAGGATCTGGTAGTGGCACAGGAACCTGGAACTGGGTAACTGGAGGTCAAGCAGGGG 171
 isolate BD8_Chinaa 120 CAGGAAG--TGGAG--GCATCGGATCTGGCACTCAAGGCAATGGGGTCAAG-----G 169
 isolate_Mex-Ver1 121 CAGCGGS-----TAG-TGGAACAGGAACTAGACCACCTCAACTGGATCAGCAAC-----A 170

NC_003398_cp. 171 CAA-CCACCCGACCTCCA--GCATCAGGTGGATATCAGGAAACAATGGAGGTGGCCAAAT 227
 Sequence_arg1662 175 CAACCACCCGCGGCTCAA--GGTTCACAACCGCCACAGGGGAGCTACTGGTGG-TGGT 231
 Sequence_arg915 175 CAACCACCCGCGGCTCAA--GGTTCACAACCGCCACAGGGGAGCTACTGGTGG-TGGT 231
 Sequence_mex-jall 172 CAACCACCCGCGGCTCAACCGGATCTGGAGCAACCGGAAGCCCAATCAGGATCTGGAAGTG 231
 isolate BD8_Chinaa 170 CAACCACAAGGAAGTGGC--GGTCAACAAGGGTCCGGTGGGGCACTGGTCAAGGAGCAG 227
 isolate_Mex-Ver1 171 CAAGGAAACACACCTCCA--GCATCAGGTGGCTATCGGCAAAATAATGGAGGTAACCAAT 228

NC_003398_cp. 228 CAGGTTCAAACCGGCACTGGAGGCCAAGCAGGCTTAAGCGGAGCAGGGGTCAAAGAGACA 287
 Sequence_arg1662 232 GGCAGCACAACAGGA--GCTGGCGGAATGGCTCAGTC--ACAGGGGTCAAAGAGACA 286
 Sequence_arg915 232 GGCAGCACAACAGGA--GCTGGCGGAATGGCTCAGTC--ACAGGAGGTCAAAGAGATA 286
 Sequence_mex-jall 232 GTACTGGGCAAAATGGCACGGGTTCAAGCAGGTACTAGTGCAACAGGAAAGCCAAAGAGATA 291
 isolate BD8_Chinaa 228 CTGGAACAACCGGCGGAGGTCAGACAGGAGCTTAGTGGGACAGCTGGTCAAGAGATA 287
 isolate_Mex-Ver1 229 CAGGTTCAAACCGGCACTGGAAATCAAGCAGGTTCAAAGGAAACAGGGGTCAAAGAGACA 288

NC_003398_cp. 288 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 347
 Sequence_arg1662 287 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 346
 Sequence_arg915 287 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 346
 Sequence_mex-jall 292 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 351
 isolate BD8_Chinaa 288 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 347
 isolate_Mex-Ver1 289 AAGACGTTGACGCTGGCTCAACAGGAAAGATATCAGTGCCAAAGCTTAAGGCAATGTCAA 348

NC_003398_cp. 348 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAAAGAGCGTTTTACACTTAGATTTCCGTGTTAA 407
 Sequence_arg1662 347 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAAAGAGCGTTTTACATTGCGAATTTCCGTGTTAA 406
 Sequence_arg915 347 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAAAGAGCGTTTTGCATCTGGAATTTCCGTGTTAA 406
 Sequence_mex-jall 352 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAA-----TACATTTGGAATTTCCGTGTTAA 402
 isolate BD8_Chinaa 348 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAAAGAGCGCTTTGCATTTGGAATTTTGTGTTAA 407
 isolate_Mex-Ver1 349 AGAAAATGCGCTTGCCAAAGGCCAAAAGGAAAAGATGTTCTACATTTGGAATTTCCGTGTTAA 408

NC_003398_cp. 408 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 467
 Sequence_arg1662 407 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 466
 Sequence_arg915 407 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 466
 Sequence_mex-jall 403 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 462
 isolate BD8_Chinaa 408 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 467
 isolate_Mex-Ver1 409 CATACAAACCACAACAGCAAGACATATCAAACTAGAGCAACTAAGGAAAGAGTTTGATA 468

NC_003398_cp. 468 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTACGAAATTSATGACACACAATGACAGTTGTCA 527
 Sequence_arg1662 467 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTATGAAATAGATGACACACAATGACAGTTGTCA 526
 Sequence_arg915 467 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTATGAAATAGATGACACACAATGACAGTTGTCA 526
 Sequence_mex-jall 463 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTACGAAATTSATGACACACAATGACAGTTGTCA 522
 isolate BD8_Chinaa 468 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTACGAAATTSATGATACACAATGACAGTTGTCA 527
 isolate_Mex-Ver1 469 GATGGTATGATGCCATAAAGAAAGSAGTATGAAATTSATGATACACAATGACAGTTGTCA 528

NC_003398_cp.	528	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	587
Sequence_arg1662	527	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	586
Sequence_arg915	527	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	586
Sequence_mex-jall	523	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	582
isolate BD8_Chinaa	528	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	587
isolate_Mex-Ver1	529	TGAGTGGTCTCATGGTATGGTGCATTGAAAAATGGTTGCTCACCAAACATAAACGGAAATT	588
NC_003398_cp.	588	GGACGATGATGGACGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	647
Sequence_arg1662	587	GGACGATGATGGACGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	646
Sequence_arg915	587	GGACGATGATGGACGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	646
Sequence_mex-jall	583	GGACGATGATGGATGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	642
isolate BD8_Chinaa	588	GGACGATGATGGATGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	647
isolate_Mex-Ver1	589	GGACGATGATGGACGGAGATGAACAAAGGTTTTCATTAAAAACCGTCATTGAAAAACG	648
NC_003398_cp.	649	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	708
Sequence_arg1662	647	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	706
Sequence_arg915	647	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	706
Sequence_mex-jall	643	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	702
isolate BD8_Chinaa	648	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	707
isolate_Mex-Ver1	649	CATCTCCAACTTTCCGACAAATTAATGCATCATTTTCAGTGATGCAGCTGAAGCGTATATAG	708
NC_003398_cp.	709	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	768
Sequence_arg1662	707	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	766
Sequence_arg915	707	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	766
Sequence_mex-jall	703	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	762
isolate BD8_Chinaa	708	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	767
isolate_Mex-Ver1	709	AGTACCGAAACTCTACAGAGCGATACATGCCAAGATACGGACTTCAGCGAAATCTCACCG	768
NC_003398_cp.	769	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	828
Sequence_arg1662	767	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	826
Sequence_arg915	767	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	826
Sequence_mex-jall	763	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	822
isolate BD8_Chinaa	768	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	827
isolate_Mex-Ver1	769	ACTATAGCTTAGCGCGGTATGCTTTTGATTTCTATGAAATGACTTCACGCACACCAGCTA	828
NC_003398_cp.	829	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	888
Sequence_arg1662	827	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	886
Sequence_arg915	827	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	886
Sequence_mex-jall	823	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	882
isolate BD8_Chinaa	828	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	887
isolate_Mex-Ver1	829	GAGCTAAGGAAGCCACATGCAGATGAAAGCCGAGCAGTTCTGGTTCACACACACGAC	888
NC_003398_cp.	889	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	948
Sequence_arg1662	887	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	946
Sequence_arg915	887	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	946
Sequence_mex-jall	883	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	942
isolate BD8_Chinaa	888	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	947
isolate_Mex-Ver1	889	TGTTGGTCTGGACGGAAATGTGGCGAGACTCAGGAGAATACAGAGAGACACACAGCTG	948
NC_003398_cp.	949	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1008
Sequence_arg1662	947	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1006
Sequence_arg915	947	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1006
Sequence_mex-jall	943	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1002
isolate BD8_Chinaa	948	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1007
isolate_Mex-Ver1	949	GCGACGTTAGTCGCAACATGCACCTCTGTGGGAGTGCAGCAGCACCCTAGTCTCCTG	1008
NC_003398_cp.	1009	GAAACCCGTT--	1019
Sequence_arg1662	1007	GAAACCCGTTTCG	1019
Sequence_arg915	1007	GAAACCCGTTTCG	1019
Sequence_mex-jall	1003	GAAACCCGTT----	1010
isolate BD8_Chinaa	1008	GAAACCCGTTT--	1019
isolate_Mex-Ver1	1009	GAAACCCGTT--	1019

Keterangan : Hasil *multialignment sequence* gen penyandi protein kapsid dengan beberapa isolat yang diambil dari *GeneBank*.