

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

Peneliti : ^{1,3)} Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto, M.Sc
^{2,3)} Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D
^{2,3)} Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP

Mahasiswa terlibat : Retnosari Apriasti (S2), Wardatus Sholehah (S2), Dwi Ratna Pujiasih (S2), Narita Ayu Maharani (S1), Ahmil Sholih (S1), Kiky May Putrianti (S1), Suvia Widaningrum (S1), Novita Niswaton A (S1), Retna Hermawanti (S1), Febrian Eka Sandi I (S1), Cahya Anugrah (S1), Weny Nailul (S1), Rio Cafri N (S1)

Sumber Dana : RISTEK

Kontak email : bbsghrt@yahoo.com & sugiharto.fmipa@unej.ac.id

Diseminasi:

1. Jurnal : Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum*) by

Somatic Embryogenesis. *Agriculture and Agricultural Science Procedia* 9 (2016) 456 – 461.

2. Jurnal : Elimination of SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*) and Rapid Propagation of Virus-free Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Using Somatic Embryogenesis. *Procedia Chemistry* 18 (2016) 96 – 102

¹⁾ Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember

²⁾ Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember

³⁾ Cdast (Center for Development Advance), Universitas Jember

ABSTRAK

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 penanggulangan 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.

Penelitian ini dilakukan selama 3 tahun, berikut ini adalah ringkasan hasil penelitian yang telah dilakukan sampai dengan tahun ke 3. 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 khemoterapi 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 (Invitro gen) dan digunakan untuk produksi coat protein rekombinan. Sudah dilakukan produksi protein rekombinan dan pembuatan antibodi poliklonal yang dilakukan dengan menyuntikan 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. Kedua konstruk ekspresi tersebut telah tersedia dan siap digunakan untuk transformasi genetik menggunakan eksplant kultur jaringan tebu.

Pada tahun ke 3 (tiga) mengembangkan metoda deteksi infeksi ScMV menggunakan antibodi poliklonal dan transformasi genetik untuk merakit tebu tahan ScMV. Transformasi pada eksplan tebu sudah dilakukan, dan sudah diperoleh tanaman tebu putative transforman. Persiapan eksplan dilakukan dengan cara menanam eksplan basal tebu in vitro, sampai menghasilkan planlet lebih kurang 100 planlet. *A. tumefaciens* yang telah terkonfirmasi keberadaan gen targetnya diperbanyak untuk digunakan menginfeksi tunas basal pada proses transformasi. Tahapan transformasi

adalah infeksi, kokultifasi, eliminasi selama 5 siklus dengan interval 3 minggu, hasil akhirnya adalah tanaman putative transforman. Hasil transformasi telah diperoleh efisiensi sebesar 10% dan sudah dikonfirmasi keberadaan gen coat protein dengan menggunakan PCR. Tanaman yang sudah terkonfirmasi dan dinyatakan sebagai tanaman transforman sebanyak 9 tanaman.

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

Executive Summary

Latar Belakang dan Tujuan Penelitian

Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) merupakan salah satu virus tumbuhan penting yang menyerang tanaman tebu. Perbanyak benih tebu menggunakan bagal 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). Oleh karena itu untuk meminimalkan penyebaran dan tingginya kerusakan tanaman tebu akibat serangan SCMV maka perlu dilakukan upaya penanganan dan pencegahan yang tepat yaitu 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 *Hot Water Treatment* (HWT) suhu 53°C selama 10 menit atau 55°C selama 10-20 menit (Damayanti *et al*, 2010). Selain itu juga dapat dilakukan melalui terapi

kimia (kemoterapi) seperti kemoterapi dengan Ribavirin (Kentsis *et al.*, 2004). Penggunaan benih bebas virus dengan kemoterapi dan *Hot water treatment* masih tidak mampu mengatasi kejadian infeksi SCMV pada tebu dilapangan (Goldbach *et al.*, 2003). Oleh karena itu diperlukan teknologi pengembangan tanaman transgenik yang dapat menghasilkan tanaman tahan terhadap virus, menurut Sanford and Johnston (1985) dapat melalui pendekatan *Pathogen Derived Resistance* (PDR) salah satunya *Coat protein-mediated resistance* (CP-MR), yang merupakan teknologi mekanisme ketahanan tanaman melalui mekanisme transformasi genetik dari bagian tertentu virus yaitu coat protein ke dalam tanaman inang (Wilson, 1993; Prins *et al.*, 2008).

Penelitian ini bertujuan untuk: (1) Mengetahui dan mendapatkan informasi tentang Coat Protein Sugarcane Mosaic Virus yang menyerang tebu serta melakukan isolasi terhadap gen penyandi Coat Protein dari RNA Virus (CP-SCMV) serta pemuliaan benih tebu bebas SCMV melalui kemoterapi ribavirin, (2) Mengkonstruksi plasmid untuk keperluan transformasi gen CP-SCMV berbasis *Agrobacterium-mediated plant transformation*, (3) Transformasi benih tebu bebas SCMV melalui pendekatan teknologi *Pathogen-Derived Resistance* (PDR) untuk menghasilkan tebu bebas dan tahan SCMV.

Metodologi Penelitian yang digunakan

Penelitian dilakukan dengan tujuan untuk menghasilkan teknologi rekayasa genetik melalui pendekatan *Pathogen-Derived Resistance* (PDR) untuk menghasilkan tebu unggul bebas dan tahan virus. Penelitian ini ditargetkan selesai dalam waktu 3 (tiga) tahun, tahapan 1 dan 2 sudah dilaksanakan. Adapun tahapan penelitian dan ukuran keberhasilan pada tahun ketiga adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Tahapan penelitian dan ukuran keberhasilan

Bulan ke	Kegiatan Penelitian	Ukuran keberhasilan
1-2	Kultur <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Diperoleh koloni <i>Agrobacterium tumefaciens</i> yang sudah tersisipi gen CP-SCMV
4	Persiapan eksplan	Diperoleh planlet tebu yang sehat
6	Insersi Gen CP-SCMV ke Eksplan Tebu	Diperoleh planlet putative transforman gen CP-SCMV
8	Analisis PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	Diperoleh single band dari DNA target (gen CP-SCMV)
10	Aklimatisasi planlet	Diperoleh bibit hasil kultur jaringan tahan virus

Rincian metode penelitian selengkapnya adalah sebagai berikut:

Kultur *Agrobacterium tumefaciens*

Kultur *Agrobacterium tumefaciens* yang sebelumnya telah di sisipi gen CP-SCMV yang berukuran 950 bp dalam plasmid biner pRI 101 ON DNA di biakkan dalam media YEP cair (Yeast, Pepton, NaCl) yang mengandung antibiotik (kanamycin 50 mgL⁻¹, rifamycin 100 mgL⁻¹, gentamisin 12,5 mgL⁻¹) cair 2 ml dan diinkubasi shaker 150 rpm, suhu 28°C selama 24 jam. Selanjutnya biakan bakteri diinokulasi sebanyak satu ose dengan cara streak kuadran pada media YEP selektif padat dan

diinkubasi pada suhu 28°C selama 48 jam dan sebagiannya digunakan untuk PCR koloni.

Persiapan Eksplan

Eksplan tebu yang digunakan adalah planlet in vitro dari tanaman tebu varietas BL. Planlet tersebut di subkultur setiap 4 minggu sekali untuk memperbanyak tanaman dengan media MS1 (MS+100 mg/l-1 Glutamin). Eksplan yang akan digunakan untuk transformasi di potong bagian pangkalnya (basal). Dalam satu tahapan transformasi dibutuhkan ± 100 eksplan.

Inseri Gen CP-SCMV ke Eksplan Tebu

Proses inseri Gen CP-SCMV diawali dengan penyiapan A. Tumefaciens, kokultivasi, eliminasi, dan seleksi planlet putative transforman.

a. Penyiapan A. Tumefaciens

Kultur A. *Tumefaciens* yang tumbuh pada media YEP padat diambil koloni tunggalnya dan diinokulasikan pada media YEP cair 50 ml yang mengandung antibiotik kanamisin 50 mg/l-1, diinkubasi shaker 150 rpm, 28°C hingga mencapai kerapatan sel ($OD_{600}=0,6$). Eksplan ditusuk pada bagian ventral menggunakan jarum steril. Eksplan direndam dalam media 50 ml YEP cair yang telah diinokulasi *Agrobacterium tumefaciens* dengan penambahan 100 mg/l-1 acetosyringone, diinkubasi shaker 150 rpm, pada suhu 28°C selama 15 menit.

b. Kokultivasi

Kokultivasi dilakukan dengan menumbuhkan eksplan pada media (MS + 100 mg/l-1 acetosyringone) dengan tujuan untuk memberikan kesempatan *Agrobacterium tumefaciens* tumbuh bersama dengan eksplan, sehingga integrasi T-DNA ke dalam genom tanaman dapat berlangsung. Kemudian eksplan diinkubasi pada kondisi gelap selama 3 hari pada suhu 24°C.

c. Eliminasi

Eliminasi *Agrobacterium tumefaciens* dilakukan dengan tujuan menghilangkan bakteri *Agrobacterium tumefaciens* untuk mencegah ledakan pertumbuhan (*overgrowth*) bakteri pada eksplan. Eksplan dari media kokultivasi dicuci dengan larutan 500 mg/l-1 cefotaxime sebanyak 3 kali dan dibilas dengan akuades steril setiap setelah pencucian dengan larutan cefotaxime. Eksplan dipindah pada media eliminasi (MS + 500 mg/l-1 cefotaxime) dan inkubasi pada suhu 24°C selama 7 hari dalam kondisi terang.

d. Seleksi Planlet Putative Transforman

Tahapan seleksi planlet putative transforman dilakukan sebanyak 5 kali dan masing-masing tahapan seleksi membutuhkan waktu inkubasi selama 21 hari dalam kondisi terang. Seleksi 1-5 ditumbuhkan pada media (MS + cefotaksim 500 mg/l-1 + kanamisin 75 mg/l-1).

Analisis PCR (Polymerase Chain Reaction)

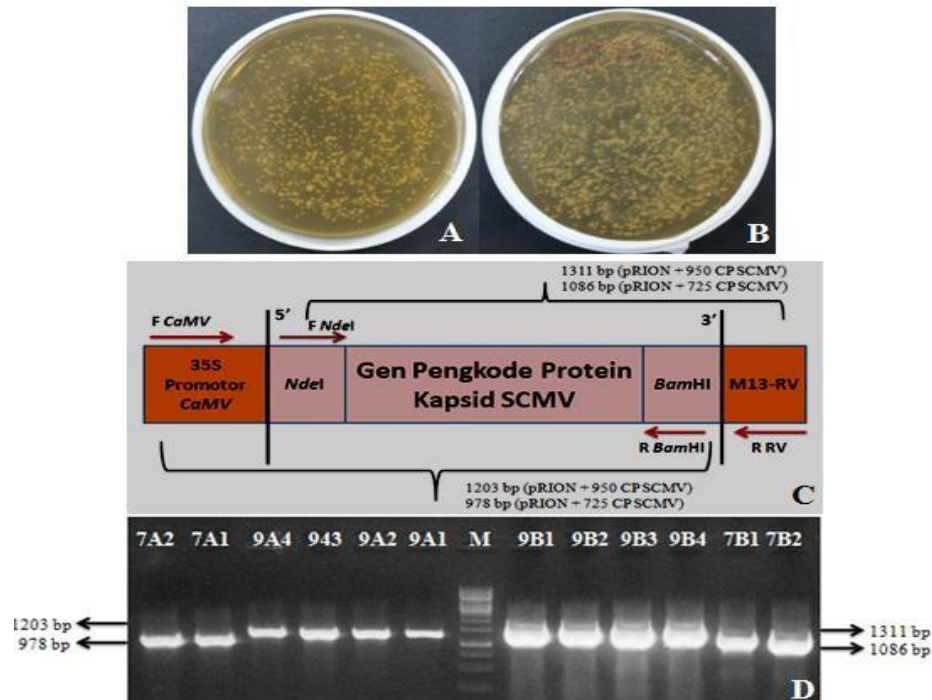
Analisis ini diawali dengan isolasi DNA genom dengan cara menghaluskan 0,1 gram daun tanaman tebu putative transforman dengan Nitrogen cair menggunakan bor sampai halus pada ependorf. DNA genom hasil isolasi diukur konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 dan 280 nm. DNA genom

divisualisasi dengan elektroforesis pada 1% agarose gel untuk mengetahui kualitas DNA. Kemudian dilakukan analisis menggunakan PCR (Polymerase Chain Reaction). Program yang digunakan dalam PCR meliputi pre-denaturation 94°C selama 2 menit, denaturation 94°C selama 20 detik, annealing 55°C selama 10 detik, elongation 72°C selama 50 detik dan final elongation 72°C selama 5 menit dan dilakukan sebanyak 40 siklus. DNA yang telah teramplifikasi oleh PCR dipisahkan dengan 1% agarose gel elektroforesis yang mengandung 3 µl ethidium bromide dengan tegangan 100 V selama 25 menit. Pita DNA yang diperoleh dari hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan gel doc.

Hasil dan Pembahasan

Transformasi pRION+CP pada *A.tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens merupakan bakteri gram negatif yang memiliki TI-plasmid dan secara alami mampu menginfeksi tanaman inang sehingga dapat menyebabkan penyakit *crown gall* pada tanaman inang melalui transfer dan integrasi T-DNA pada genom tanaman inang. Sistem transfer DNA yang dimiliki oleh *A. Tumefaciens* ini dapat digunakan untuk pemuliaan tanaman melalui teknik rekayasa genetika (Murai, 2013). *Agrobacterium* yang digunakan pada penelitian ini yaitu *A. tumefaciens* strain GV3101. *A. tumefaciens* strain GV3101 mengalami mutasi pada kromosom C58 sehingga memiliki resistensi terhadap antibiotik rifamisin dan gentamisin (Lee, 2008).



Gambar 4.6. (A) Koloni tunggal hasil transformasi pRION+950CPSCMV. (B) Koloni tunggal hasil transformasi pRION+725CPSCMV (C) Bagan posisi perlekatan dan prediksi ukuran hasil amplifikasi primer. (D) Lajur 9A1 – 7A2 PCR plasmid pRION+CP menggunakan primer F *CaMV* – R *BamHI* dan Lajur 9B1 – 7B2 plasmid pRION+CP menggunakan primer F *NdeI* – R *RV*.

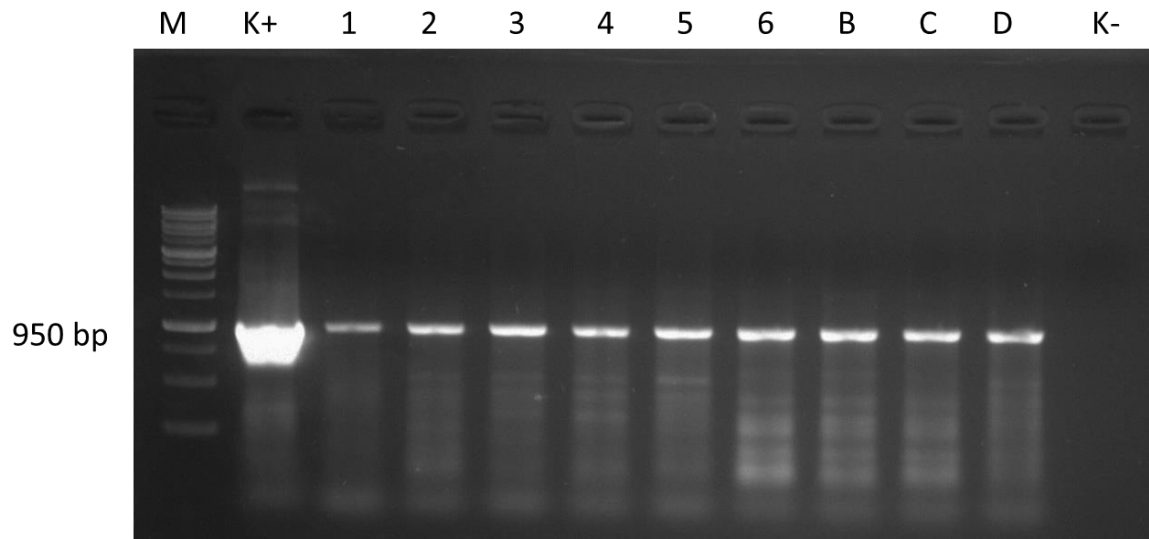
A. tumefaciens yang diduga transforman dapat tumbuh pada media YEP padat dengan penambahan antibiotik kanamisin 75 ppm, rifamisin 100 ppm dan gentamisin 12,5 ppm (Gambar 4.6 (A) dan (B)). *A. tumefaciens* tersebut perlu dilakukan analisis PCR plasmid untuk memastikan bahwa pRION+CP telah berhasil ditransformasikan pada *A. tumefaciens*. Hasil isolasi plasmid dari *A. tumefaciens* dianalisis PCR menggunakan pasangan primer F *NdeI* – R RV dan F *CaMV* – R *BamHI*. Hasil PCR plasmid tersebut menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran 1203 bp dan 1311 bp untuk pRION+950CPSCMV serta pita DNA berukuran 978 bp dan 1086 bp untuk pRION+725CPSCMV (Gambar 4.6 (D)). Hasil PCR ini menyatakan bahwa *A. tumefaciens* telah positif transforman dan siap digunakan untuk keperluan transformasi gen CP SCMV pada tanaman tebu.

Transformasi gen CP-SCMV di tanaman tebu varietas BL

Transformasi tebu dengan gen CP-SCMV dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu : infeksi, kokultivasi, eliminasi, dan seleksi. Tahap infeksi dilakukan dengan menggunakan 100 eksplan. Kepadatan kultur bakteri yang digunakan untuk infeksi pada OD 0,6 dengan ABS₆₀₀ yang diukur dengan menggunakan UV Spectrometer. Eksplan yang telah diinfeksi menggunakan *A.tumefaciens* ditanam pada media kokultivasi. Hasil pengamatan pada akhir tahap kokultivasi (3 hari setelah tanam), eksplan mulai menunjukkan adanya pertumbuhan tunas. Eliminasi dilakukan setelah tahap kokultivasi. Hasil pengamatan pada akhir tahap eliminasi (7 hari setelah tanam) dengan tujuan untuk membunuh bakteri *A.tumefaciens* dengan 500 ppm cefotaksim setelah itu eksplan dapat masuk pada media seleksi 1-5 yang mengandung antibiotik 75 ppm kanamisin. Tujuan dilakukannya seleksi yaitu untuk menyeleksi eksplan gen target CP-SCMV. Hasil transformasi dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Presentase hasil transformasi gen CP-SCMV 950bp

Gen Coat Protein	Transformasi ke-	K	E	S1	S2	S3	S4	S5
950 bp	T1	100%	100%	96%	72%	50%	20%	10%
	T2	100%	100%	90%	86%	30%	10%	5%



Gambar. Hasil konfirmasi tanaman putatif transforman

Keterangan:

M = Marker

K+ = kontrol positif dari plasmid

K- = tanaman *wild type*

No. 1-9 = sampel daun tanaman putatif transforman

Berdasarkan data hasil konfirmasi menggunakan PCR diperoleh pita DNA sebesar 950 bp dengan menggunakan primer *Forward* NdeI dan primer *reverse* BamHI yang menargetkan bagian dari coat protein saja. Pada semua sampel menunjukkan adanya gen coat protein, sehingga tanaman ini diduga mengandung sisipan dari gen *CP-SCMV*.

Simpulan akhir dari hasil penelitian

Pada akhir tahun ke tiga telah diperoleh tanaman putative transforman dengan efisiensi sebesar 10%. Tanaman sudah dikonfirmasi menggunakan PCR dan sudah diperoleh tanaman transforman tahan virus sebanyak 9 tanaman.

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*.

Kata kunci: tebu (*Saccharum officinarum* L.), tanaman tahan virus SCMV.

Referensi

- Reddy, Ch.V Subba and P. Sreenivasulu. 2011. Generation of sugarcane streak mosaik virus-free sugarcane (*Saccharum spp* hybrid) from infrected plants by in vitro meristem tip culture. *European Journal of Plant Pathology* 130:597-604.
- 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.
- Goldbach, R., E. Bucher, and M. Prins.2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res.*92: 207–212.
- Wilson, T.M.A. 1993. Strategies to protect crop plant agaist viruses: plant pathogen resistance blossoms. *Proc. Nat. Acad. Scie. USA* 90: 3134-3141.
- 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.

