

KOMUNIKASI SINGKAT

Preparasi RNA Virus Mosaik Bergaris dari Tanaman Tebu Menggunakan Metode Tabung PCR

RNA Preparation of Streak Mosaic Virus from Sugarcane Plant Using PCR Tube Method

Tri Asmira Damayanti^{1*}, Lilik Koesmihartono Putra²

¹Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

²Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Pasuruan 67126

ABSTRAK

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) adalah virus baru yang menginfeksi tebu di Indonesia. SCSMV ditemukan hampir di seluruh perkebunan tebu di Jawa dan virus ini ditularkan melalui bagal. Upaya untuk mendapatkan bagal bebas virus menemui kesulitan, karena ketidakterediaan metode deteksi yang mudah dan akurat. Sampai saat ini belum tersedia antiserum SCSMV komersial untuk deteksi rutin. Deteksi asam nukleat dengan RT-PCR juga menemui kesulitan didalam melepaskan RNA virus dari jaringan tebu. Disini kami laporkan metode sederhana untuk mendapatkan templat RNA total dari daun, batang dan pelepah tebu menggunakan tabung PCR untuk deteksi SCSMV dengan RT-PCR.

Kata kunci: ekstraksi RNA, RT-PCR, SCSMV, tabung PCR

ABSTRACT

Sugarcane streak mosaic virus (SCSMV) is a new emerging virus infecting sugarcane in Indonesia. The virus can be found almost in every sugarcane plantations in Java and it was known as sett-borne virus. Attempt to get virus-free seedling meet difficulties due to lacking an easy, and accurate detection method. SCSMV antiserum is not available yet commercially. Nucleic acid detection by RT-PCR also hampered difficulties in releasing RNA virus from sugarcane tissues. Here we reported the simple direct tube method with minor modification as the convenient way to provide total RNA template from infected sugarcane leaf, stalk and sheath for RT-PCR detection of SCSMV.

Key words: RNA extraction, RT-PCR, SCSMV, tube PCR

Penyakit mosaik bergaris pertama kali ditemukan pada tanaman tebu di Jawa pada survei tahun 2005 dan 2007. Setelah dilakukan upaya karakterisasi dan identifikasi diketahui bahwa penyakit tersebut disebabkan oleh *Sugarcane streak mosaic virus* (SC-

SMV) (Damayanti dan Putra 2011). SCSMV merupakan virus yang baru di Indonesia dan menginfeksi klon PS864 secara dominan. Klon ini ialah andalan pada berbagai perkebunan gula di Jawa. Penyebaran SCSMV sangat cepat karena penularannya difasilitasi

*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Jalan Kamper, Bogor 16680
Tel/Faks: 0251-8629362, Surel: triadys@yahoo.com

melalui pisau potong yang digunakan saat penyiapan bagal sebelum tanam atau saat panen dan bersifat tular bagal. Beberapa upaya pengendalian SCSMV telah dilakukan secara fisik dengan perlakuan panas dan penggunaan bakteri rizosfer, dekomposer, dan endofit (Damayanti *et al.* 2010; Damayanti *et al.* 2011b), namun upaya ini masih belum mampu mengeliminasi SCSMV secara total. Upaya pengendalian bagi virus tular bahan perbanyak seperti SCSMV ini ialah dengan menggunakan bagal bebas virus. Oleh karena itu, tersedianya sistem deteksi yang mudah dengan akurasi tinggi diperlukan untuk deteksi rutin dalam penyediaan bagal sehat.

Deteksi virus secara serologi dan biologi molekuler dengan cara mendeteksi asam nukleat virus menggunakan *reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR) sudah banyak diaplikasikan untuk deteksi dan identifikasi berbagai virus tumbuhan. Virus yang ditemukan pada biji atau batang beberapa tanaman sulit dibuat antisernya karena konsentrasinya rendah. Selain itu, pada bahan propagasi tanaman seperti biji atau batang biasanya konsentrasi virus rendah sehingga sulit terdeteksi secara serologi (James 1999). Oleh karena itu, untuk mendeteksi virus ini diperlukan metode yang lebih sensitif seperti RT-PCR.

Metode deteksi RT-PCR masih relatif mahal, namun memiliki sensitivitas tinggi dan metode ini sudah banyak diadaptasi untuk diagnosis rutin. Keberhasilan RT-PCR terletak pada kualitas total RNA templat yang digunakan. Pada tanaman tertentu ekstraksi RNA sulit dan melalui tahap pengerjaan yang merepotkan (Marinho *et al.* 1998), karena kandungan fisik dan kimia serta distribusi virus dalam jaringan tanaman yang tidak merata. Hal ini merupakan faktor yang sangat berpengaruh dalam pelepasan RNA virus dari jaringan tanaman (Thomson dan Dietzgen 1995; Hema *et al.* 2003).

Keberhasilan ekstraksi RNA virus dengan metode yang sederhana telah dilaporkan sebelumnya seperti *Apple stem grooving virus* (ASGV) pada apel (James 1999), *Turnip mosaic virus* (TuMV) pada tanaman *crucifer*,

Cucumber mosaic virus (CMV) dan *Cucumber green mild mottle virus* (CGMMV) pada *Nicotiana rustica* dan *Lagenaria siceraria* (Suehiro *et al.* 2005). Putra *et al.* (2005, 2009) juga berhasil mendeteksi *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) dengan metode ekstraksi RNA yang diadaptasi dari *Fijivirus*, namun tahapan metode ekstraksi RNA yang digunakan tidak mudah dilakukan dalam deteksi rutin. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan mendapatkan metode ekstraksi RNA total dengan prosedur sederhana, dan mudah dilakukan dalam waktu singkat dari jaringan tebu untuk mendeteksi SCSMV dengan RT-PCR. Tanaman sakit yang digunakan adalah daun, pelepah dan batang tebu (bagal) yang terinfeksi SCSMV klon PS 864 dari Pusat Penelitian Perkebunan Gula Indonesia, Pasuruan. Preparasi asam nukleat dilakukan dengan tiga metode yaitu *tube capture* (TC), *simple direct tube* (SDT), dan ekstraksi standar.

Metode TC

Sebanyak 0.1 g sampel tanaman digerus dalam *phosphate buffer saline* (PBS) (1 L terdiri atas 8.0 g NaCl, 0.2 g KH_2PO_4 , 1.42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl, pH 7.4) yang mengandung 2% *polyvinyl pyrrolidone* (PVP), disentrifugasi pada 10 000 g selama 10 menit. Supernatan dipindahkan ke dalam tabung eppendorf, diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37 °C, dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS yang ditambah 0.05% *tween-20* (PBST). RNA total diresuspensi dengan 50 μL air *diethyl-pyrocabonate* (DEPC) steril (James 1999).

Metode SDT

Sebanyak 0.1 g daun/batang/pelepah tebu digerus sampai halus dalam nitrogen cair menggunakan mortar dan pistil, kemudian diberi bufer PBST sebanyak 600 μL (1L bufer PBS, 500 μL *Tween-20*) yang digunakan untuk ELISA dengan modifikasi pada perbandingan jaringan tanaman dan PBST dari 1:1 (w/v) menjadi 1:6 (w/v) dan tabung PCR yang digunakan dari 0.5 mL menjadi 0.2 mL. Sap kasar diambil 50 μL , dan dimasukkan ke dalam tabung PCR (Axygen),

diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Sap dibuang dengan tip yang ujungnya dipotong, dan tabung PCR dicuci dengan PBST 100 μL sebanyak 2 - 4 kali sampai tidak ada jaringan yang tersisa. Segera ke dalam tabung PCR dimasukkan 30 μL air DEPC steril yang mengandung 15 U RNase *Inhibitor* (NEB; 40 U μL^{-1}), kemudian diinkubasi pada suhu 95 °C selama 1 menit pada mesin PCR, dan segera didinginkan pada es selama 1 menit dan siap digunakan sebagai templat RT (Suehiro *et al.* 2005). Pemanasan pada suhu 95 °C selama 1 menit bertujuan melepaskan RNA dari imobilisasi partikel virus pada dinding tabung PCR.

Metode Ekstraksi Standar

Metode ekstraksi ini menggunakan bufer glycine (0.5 M glisina, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA pH 9.5; SDS 20%; 5% bentonite) dengan perbandingan 100:10:1. Ekstraksi ini menggunakan dua kali penggunaan *phenol chloroform isoamyl alcohol* (PCI) dan presipitasi RNA total dengan 3 M natrium asetat dan etanol absolut (Kroner dan Ahlquist 1992). Metode ekstraksi RNA total dengan *RNAeasy kit* (Qiagen) digunakan sebagai pembanding. Setiap metode ekstraksi diulang sebanyak 3 kali untuk mendapatkan hasil deteksi yang terbaik. Sintesis *complementary DNA* (cDNA) dilakukan dengan metode yang direkomendasikan oleh *New England Biolabs* menggunakan 3.5 μL RNA total hasil ekstraksi sebagai templat dan penambahan 1.0 μL 50 mM *dithiothreitol* (DTT) di dalam reaksi transkripsi balik. Sebanyak 1.0 μL cDNA dicampurkan ke dalam PCR *master mix* dengan komposisi reagen sesuai dengan rekomendasi pembuat enzim Taq polymerase (NEB). Khusus untuk deteksi cDNA dengan total RNA yang diekstraksi dengan metode TC, pada PCR *master mix* ditambahkan 1.7% Triton X sebanyak 1.2 μL . Amplifikasi parsial gen CP SCSMV menggunakan primer *forward* SCSMV-cpF (Damayanti dan Putra 2011) dan primer *reverse* SCSMV-AP3 (Hema *et al.* 2003) dengan ampikon berukuran 500 pasang basa (pb). RT-PCR dilakukan dengan program 35 siklus pada suhu 94 °C selama 30

detik, 47 °C selama 1 menit, dan 72 °C selama 2 menit dan ekstensi final pada 72 °C selama 10 menit. DNA hasil amplifikasi PCR dianalisis dengan mengelektroforesis DNA pada 1.2% gel agarose Tris-Borate EDTA (TBE) yang mengandung etidium bromida (0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) selama 30 menit pada 70 Volt. Sebagai penanda ukuran DNA digunakan 100 pb DNA *ladder* (NEB). Visualisasi DNA dilakukan di bawah sinar UV dan didokumentasi dengan kamera digital. Hasil PCR dengan beberapa cara preparasi RNA dibandingkan satu sama lain.

Teknik ekstraksi RNA total dari tanaman tebu yang terinfeksi SCSMV menggunakan metode ekstraksi TC, SDT, dan kit komersial berhasil dideteksi oleh RT-PCR dengan intensitas DNA yang bervariasi; sedangkan metode ekstraksi standar tidak berhasil menyediakan RNA total yang dapat dideteksi oleh RT-PCR (Gambar 1). Ekstraksi RNA total dengan metode TC yang sebelumnya dikembangkan untuk mendeteksi ASGV pada batang apel sebenarnya mampu menghasilkan RNA total, namun kualitasnya kurang memadai jika dibandingkan dengan metode SDT. Hal ini diduga karena masa inkubasi sap tanaman pada suhu 37 °C cukup panjang (3 jam) sehingga kemungkinan terjadi degradasi RNA selama proses inkubasi tersebut. Begitu juga hasil yang ditunjukkan oleh kit komersial. Intensitas DNA hasil RT-PCR hampir sama dengan yang ditunjukkan oleh metode TC. Metode ekstraksi RNA total standar sebelumnya banyak digunakan untuk mengekstraksi RNA total asal tanaman barlei (*Poaceae*) tidak berhasil untuk mendapatkan RNA total dari jaringan tebu (Gambar 1, panel standar). Proses ekstraksi yang panjang dan penggunaan bahan kimia berbahaya seperti PCI kemungkinan besar menjadi penyebab terdegradasinya RNA total atau tidak berhasil melepaskan virus dengan baik dari jaringan tanaman tebu. Dengan demikian ekstraksi dengan metode ini tidak sesuai untuk mengekstraksi SCSMV dari tanaman tebu.

Berdasarkan hasil deteksi RT-PCR (Gambar 1), metode SDT merupakan metode ekstraksi yang menghasilkan RNA total

terbaik dibandingkan dengan metode lainnya. Hal ini ditunjukkan dengan hasil deteksi RT-PCRnya berhasil mengamplifikasi DNA dengan intensitas yang terbaik dibandingkan dengan templat RNA yang didapatkan dari metode ekstraksi lainnya, termasuk kit komersial. Selanjutnya, RNA total asal pelepah dan batang tebu yang terinfeksi SCSMV juga berhasil diekstraksi dengan menggunakan metode SDT ini dan hasil deteksi RT-PCR membuktikan teramplifikasinya DNA SCSMV berukuran 500 pb, walaupun dengan intensitas DNA yang lebih rendah dibandingkan dengan intensitas DNA dari daun yang diekstraksi dengan metode yang sama (Gambar 2).

SDT-RT PCR merupakan salah satu cara yang bermanfaat untuk mendeteksi virus yang telah tersedia primer spesifiknya, namun belum tersedia antiserum dari virus tersebut untuk deteksi rutin (Suehiro *et al.* 2005), seperti SCSMV dalam penelitian ini. Selain itu, metode ini kemungkinan sesuai untuk mengekstraksi RNA total dari tanaman yang berkayu, sebab immobilisasi total protein dalam tabung PCR membantu mengurangi pengaruh sifat fisik kimia tanaman yang dapat mengganggu kualitas RNA templat untuk RT-PCR.

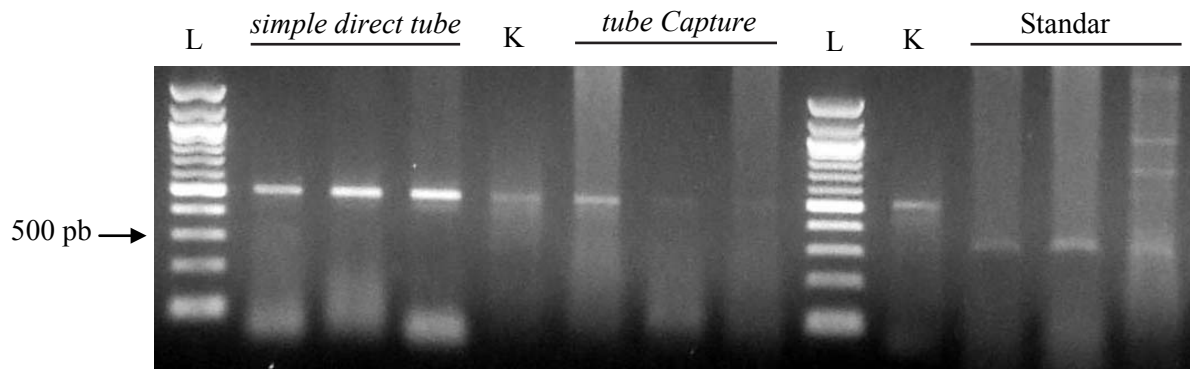
Hasil penelitian ini memperkaya informasi yang telah dilaporkan sebelumnya bahwa dengan metode SDT-RT PCR berhasil dideteksi CMV, TuMV, dan CGMMV. Ketiga virus tersebut menginfeksi tanaman dengan jaringan daun yang relatif lunak dan memiliki konsentrasi virus yang tinggi dalam jaringan tanaman jika dibandingkan dengan daun tebu, pelepah atau batang tebu. Metode SDT-RT PCR ini juga berhasil mendeteksi CMV galur *soybean* dari daun kedelai, *Chilli veinal mottle virus* (ChiVMV) dari daun cabai dan *Bean common mosaic virus* (BCMV) dari daun bengkuang dan kacang panjang (data tidak diperlihatkan).

Deteksi RT-PCR RNA total dengan SDT menunjukkan hasil lebih baik dibandingkan dengan ekstraksi RNA total dengan kit komersial. Menurut Li *et al.* (2008) *RNeasy kit* tidak cocok untuk mengekstraksi RNA virus dari jaringan tanaman yang kaya polifenol

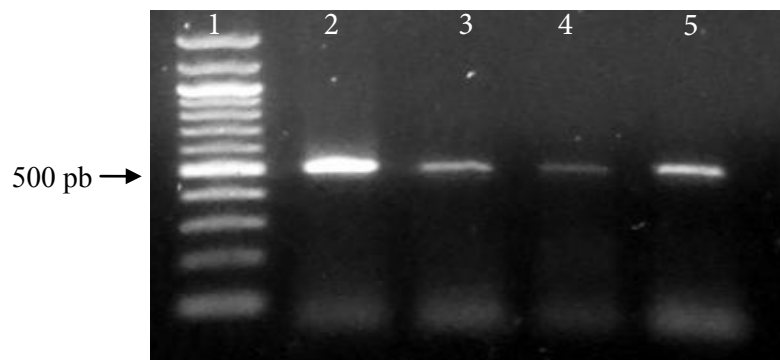
dan senyawa polisakarida. Kit ini dilaporkan juga tidak berhasil mengekstraksi RNA total TuMV dari benih caisin (Adiputra 2010). Hal ini menunjukkan bahwa *RNeasy kit* tidak dapat digunakan untuk mengekstraksi RNA dari semua jenis tanaman. Kemudahan pelaksanaan dan waktu prosedur kerja SDT yang singkat serta semua prosedur hanya dilakukan dalam 1 tabung PCR memungkinkan tereduksinya kontaminasi atau degradasi RNA dari RNase selama proses ekstraksi sehingga kualitas RNA total yang dihasilkan baik sebagai templat untuk RT-PCR. Selain itu penggunaan bufer PBST lebih murah dan mudah dibuat jika dibandingkan dengan bufer-bufer yang digunakan dalam metode lainnya pada penelitian ini (Tabel 1 dan bagian metode).

Berhasilnya ekstraksi dan deteksi SCSMV dari pelepah dan batang tebu dengan metode SDT, akan menjadikan metode ini menjadi metode yang dapat digunakan sebagai metode deteksi rutin karena kemudahan pelaksanaan dan penyediaan RNA total yang baik untuk templat RT-PCR. Intensitas DNA hasil amplifikasi RT-PCR dari pelepah dan batang tebu tidak sebaik hasil amplifikasi dari daun (Gambar 2). Hal ini karena kemungkinan perbedaan jaringan, kandungan fisik kimia tanaman dan perbedaan distribusi virus dalam jaringan tanaman. Namun, intensitas DNA hasil amplifikasi dari batang dan pelepah tebu masih memberikan hasil yang sesuai dengan hasil amplifikasi dari daun. Kombinasi ekstraksi RNA total dengan SDT dan *One-step* RT-PCR (proses transkripsi balik dan PCR dalam 1 tabung PCR) menjadikan deteksi SCSMV dari jaringan tebu atau virus lainnya semakin mudah dilakukan dan memberikan hasil deteksi cukup baik (data tidak diperlihatkan). Hal ini karena tereduksinya tahapan penanganan (*handling steps*) dan risiko kontaminasi (Marinho *et al.* 1998).

Salah satu aplikasi metode SDT dan RT-PCR digunakan untuk deteksi stek-stek tebu atau bibit asal kultur jaringan sebelum didistribusikan, sertifikasi kebun bibit untuk memperoleh stek-stek tebu bebas virus dan program karantina. Metode sederhana ini dapat dimanfaatkan secara lebih luas untuk virus



Gambar 1 Elektroforesis DNA produk RT-PCR. Preparasi RNA total dilakukan dengan metode *simple direct tube*, *tube capture*, dan standar. K, pembanding total RNA diekstraksi dengan kit. L, penanda DNA 100 pb.



Gambar 2 Elektroforesis DNA *Sugarcane streak mosaic virus* produk RT-PCR dari 2, daun, 3, pelepah, 4, batang tebu muda, dan 5, batang tebu tua. 1, penanda DNA 100 pb. Preparasi RNA total dilakukan dengan metode SDT.

Tabel 1 Perbandingan beberapa metode ekstraksi RNA total dari tanaman tebu

Keterangan	Kit komersial	SDT	TC	Standar
Kemudahan pengerjaan	**	*	**	***
Waktu pengerjaan per 10 sampel	1 jam	< 1 jam	3.5 jam	2 jam
Dapat dipercaya	***	***	***	*
Kontaminasi	*	*	*	***
Biaya (bufer ekstraksi, dll)	***	*	**	***

* mudah, kurang, murah; **sedang; ***dapat diandalkan, tinggi, mahal

tumbuhan lainnya, namun perlu modifikasi atau optimasi dalam pelaksanaannya untuk mendapatkan hasil ekstraksi dan deteksi yang optimum.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas dana penelitian KKP3T untuk TAD dan tim dengan nomor kontrak 759/LB.620/I.1/3/2008.

DAFTAR PUSTAKA

Adiputra J. 2010. Evaluasi tiga metode preparasi RNA Total untuk deteksi *Turnip mosaic virus* dari benih *Brassica* sp. dengan *reverse transcription polymerase chain reaction* [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

Damayanti TA, Putra LK. 2011a. First occurrence of *Sugarcane streak mosaic virus*

- infecting sugarcane in Indonesia. *J Gen Plant Pathol.* 77:72-74. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10327-010-0285-7>.
- Damayanti TA, Putra LK. 2011b. Penggunaan kombinasi tiga jenis bakteri biokontrol untuk menekan infeksi *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) pada tebu. *MPG.* 47:40-53.
- Damayanti TA, Putra LK, Giyanto. 2010. Hot water treatment of cutting-cane infected with *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). *J ISSAAS.* 16:17-25.
- Hema M, Savithri HS, Sreenivasulu P. 2003. Comparison of direct binding polymerase chain reaction with recombinant coat protein 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. *Curr Sci.* 85(12):1774-1777.
- 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](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00078-6).
- Kroner P, Ahlquist P. 1992. RNA-based viruses. Di dalam: SJ Gurr, MJ McPherson, DJ Bowles, editor. *Molecular Plant Pathology; A Practical Approach.* Oxford (US): Oxford Univ Pr. hlm 23-34.
- Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, Kinard G. 2008. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR based detection of diverse plant pathogen. *J Virol Methods.* 154(1-2):55-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.09.008>.
- Marinho VLA, Kummert G, Rufflard G, Colinet D, 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.1998.82.7.785>.
- Putra LK, Ogle HJ, James AP, Whittle PJ. 2003. Distribution of *Sugarcane mosaic virus* in sugarcane plants. *Aust Plant Pathol.* 32:305-307. DOI: <http://dx.doi.org/10.1071/AP03011>.
- Putra LK, Helen J. Ogle, Anthony P. James and Peter J. Whittle. 2009. The use of RT-PCR to detect *Sugarcane mosaic virus* and to study the viral movement in sugarcane plant. *MPG.* 45(2):83-96.
- Suehiro N, Matsuda K, Okuda S, Natsuaki T. 2005. A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *J Virol Methods.* 12:67-73. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.002>.
- Thomson D, Dietzgen RG. 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).