

Research Article

**Perbaikan Metode Ekstraksi dsRNA Virus secara Sederhana
untuk RT-PCR Tiga Virus Tumbuhan**

***Improvement of Simple dsRNA Virus Extraction Method
for RT-PCR of Three Plant Viruses***

Wiwik Endarsih^{1)*}, Sedyo Hartono²⁾, & Sri Sulandari²⁾

¹⁾Balai Besar Karantina Pertanian Surabaya

Jln. Raya Ir. H. Juanda, Sidoarjo, Jawa Timur 61253

²⁾Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

Jln. Flora 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta 55281

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: weendarsih@gmail.com

Diterima 19 Juni 2017; diterima untuk diterbitkan 19 September 2017

ABSTRACT

*Replicative form (RF) of RNA viruses are dsRNA structured nucleic acid, always found in plants infected by RNA virus. The principle of dsRNA extraction is based on the different affinity of nucleic acids for the cellulose powder and the specific adsorption in 16.6% ethanol buffer. The study aims to develop the simple dsRNA extraction method for the preparation of RT-PCR detection for *Rehmannia mosaic virus (ReMV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Tomato chlorosis virus (ToCV)*, and compared with commercial kit. The analysis was performed by quantification of nucleic acid with spectrophotometer, efficiency of method (level of complexity, time, cost per reaction) and sequencing. The RNA concentration with simple method of dsRNA extraction was lower than kit extraction method but the both methods have same pure RNA result. The PCR and sequencing result showed that viral pathogen of pepper, tobacco, and tomato leaf was *CMV*, *ReMV*, and *ToCV*, respectively with amplicon size at 500, 568, and 360 bp. This method is quite cheap and the RNA quantity is proportional to the commercial kit. The simple method of dsRNA extraction can be proposed for the preparation of RT-PCR detection for *CMV*, *ReMV*, *ToCV*.*

Keywords: cellulose powder, dsRNA extraction, Rehmannia mosaic virus, RNA quantity, RT-PCR

INTISARI

*Replicative form (RF) virus RNA merupakan asam nukleat berstruktur dsRNA, selalu ditemukan pada tumbuhan terinfeksi oleh virus RNA. Prinsip kerja ekstraksi dsRNA berdasarkan afinitas serbuk selulosa terhadap asam nukleat dan adsorpsi spesifik dsRNA pada konsentrasi etanol 16,6 %. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode ekstraksi dsRNA secara sederhana untuk preparasi deteksi RT-PCR terhadap *Rehmannia mosaic virus (ReMV)*, *Cucumber mosaic virus (CMV)*, *Tomato chlorosis virus (ToCV)* dan dibandingkan dengan kit komersil. Data yang dibandingkan adalah kuantitas asam nukleat, analisa efisiensi metode (tingkat kerumitan, waktu, biaya per reaksi) serta sekuensing. Konsentrasi RNA hasil ekstraksi metode dsRNA secara sederhana lebih rendah dibanding dengan metode kit, namun kedua metode menghasilkan RNA yang murni. Berdasarkan hasil PCR dan sekuensing disimpulkan bahwa virus penyebab mosaik daun lada dan tembakau serta klorosis daun tomat berturut-turut adalah *CMV*, *ReMV*, dan *ToCV* dengan ukuran amplicon berturut-turut 500, 568 dan 360 pb. Metode ini cukup murah dan kuantitas RNA yang dihasilkan sebanding dengan kit komersil. Ekstraksi RNA menggunakan metode dsRNA secara sederhana dapat dikembangkan untuk preparasi deteksi RT-PCR terhadap *CMV*, *ReMV*, *ToCV*.*

Kata kunci: ekstraksi dsRNA, kuantitas RNA, *Rehmannia mosaic virus*, RT-PCR, serbuk selulosa

PENGANTAR

Ekstraksi *double stranded RNA (dsRNA)* virus merupakan salah satu pendekatan dalam mendeteksi virus RNA (*ssRNA* dan *dsRNA*) dari jaringan tanaman. Metode ini telah diaplikasikan untuk deteksi virus yang tidak dapat ditularkan secara mekanik (Dodds *et al.*, 1984), virus pada tanaman berkayu yang mengandung

senyawa fenol dan polisakarida tinggi (Watkins *et al.*, 1990; Jones, 1992), satelit virus, subgenom RNA virus dan *mycovirus* (Morris & Dods, 1979; Okada, 2015). Molekul dsRNA dengan berat molekul tinggi (> 0,1 × 10⁶ Da) ini disintesis ketika replikasi virus RNA di mana pada fase *replicative intermediat (RI)*, sintesis *ssRNA* membentuk komplementer berupa replika

dari ssRNA (Balijja *et al.*, 2008). Produk dari fase RI ini adalah asam nukleat yang berstruktur dsRNA yang lazim disebut *replicative form* (RF) yang selalu ada pada tumbuhan terinfeksi virus ssRNA (Dodds *et al.*, 1984; Valverde, 1990). Hal inilah yang mendasari deteksi dan deskripsi dsRNA untuk diagnosis penyakit, dimana stabilitas pada perubahan suhu (Karan *et al.*, 1991) dan resistensi terhadap degradasi RNase (Edy *et al.*, 1976) menyebabkan dsRNA dijadikan sebagai matrik untuk karakterisasi virus RNA (Tzanetakis & Martin, 2008) yang mendominasi sebagai virus patogen tanaman.

Metode ekstraksi dsRNA secara sederhana lebih menguntungkan karena diperoleh RNA partikel virus saja secara cepat dan mudah sehingga meminimalkan campuran dengan RNA lain (Okada *et al.*, 2015). Hal ini karena prinsip kerja ekstraksi dsRNA berdasarkan afinitas serbuk selulosa terhadap asam nukleat dan adsorpsi spesifik dsRNA pada konsentrasi etanol 16,6% (Dodds *et al.*, 1984). Pemilihan metode ekstraksi RNA terutama yang mampu meminimalkan sejumlah inhibitor *reverse transcriptase* dan/atau polimerase dalam ekstrak tanaman sehingga akan menghalangi deteksi virus meskipun virus ada dalam ekstrak (Azizi *et al.*, 2017). Polivinil pirolidone dengan polifenol kompleks (John, 1992) dan/atau merkaptoetanol dapat berperan sebagai sebuah antioksidan, digunakan secara bersama dalam sebuah prosedur ekstraksi oleh beberapa peneliti dalam usaha untuk mengurangi level inhibitor (Nassuth *et al.*, 2000) seperti halnya polisakarida atau polifenol dalam jaringan tanaman (Newbury & Possingham, 1977; Sahu *et al.*, 2012; John, 1992). Menurut Li *et al.* (2008) *RNeasy Plant Mini Kits* (Qiagen) tidak sesuai untuk tanaman yang kandungan polifenol dan polisakarida tinggi serta menghasilkan konsentrasi RNA *Turnip mosaic virus* rendah dengan kemurnian tinggi untuk mengekstraksi benih *Brassica rappa* (Adiputra *et al.*, 2012).

Penelitian sebelumnya telah menggunakan teknik ini untuk deteksi mikovirus dan beberapa virus tanaman, namun analisa terhadap dsRNA terbatas dilakukan pada analisis fragmen dsRNA pada gel elektroforesis. Penelitian di Indonesia yang menggunakan metode ini untuk deteksi virus tanaman maupun mikovirus sangat sedikit, kebanyakan saat ini menggunakan kit komersial. Pada penelitian ini akan mengembangkan aplikasi ekstraksi dsRNA sederhana untuk preparasi deteksi RT-PCR terhadap virus tanaman yaitu *Tomato chlorosis virus* (ToCV), Tobamovirus, dan *Cucumber mosaic virus* (CMV).

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Bahan Tanaman

Sampel virus ada 5 berupa Tobamovirus pada daun tembakau (*Nicotiana tabacum* L.), CMV pada daun lada (*Piper nigrum* L.), daun tomat (*Solanum lycopersicum* L.), *Chenopodium amaranticolor* H.J. Coste & A. Reyn. yang diinokulasi mekanik menggunakan sap Tobamovirus dan CMV (berturut-turut dengan kode sampel Te,L,To, Ca-Tobamovirus, Ca-CMV) dalam 0,1 M buffer sitrat yang mengandung 0,1% Na₂SO₃ (pH 7) dengan perbandingan 1:10 (w/v) dengan bantuan karborundum (600 mesh). Masing-masing sampel dipotong kecil-kecil dan dilumatkan kemudian tiap sampel dibagi menjadi 4 untuk diuji menggunakan dua metode ekstraksi yaitu dsRNA secara sederhana dan kit komersial.

Ekstraksi RNA Virus Tanaman

Ekstraksi dsRNA virus mengacu pada metode yang diperkenalkan Okada *et al.* (2015) dengan sedikit melakukan modifikasi. *Micro-spin column* digunakan untuk mengikat dsRNA, tersusun atas tabung berukuran 0,6 ml yang telah dilubangi ujungnya menggunakan jarum yang ditempatkan ke dalam tabung berukuran 2 ml. Tabung berukuran 0,6 mL diisi dengan 500 µl 50% selulosa D dalam buffer pencuci 1x STE (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0) mengandung 16,6 % (v/v) etanol. Buffer pencuci dalam *column* dihilangkan dengan disentrifugasi pada 10.000×g selama 5 detik sebelum digunakan.

Proses ekstraksi diawali dengan menimbang sampel daun sebanyak 0,1–0,2 g kemudian digerus menggunakan nitrogen cair, dengan ditambahkan 500 µl buffer ekstraksi kemudian larutan ekstrak di transfer ke tabung 1,5 ml. Bergantung pada sampel tanaman, ditambahkan sekitar 10 mg *polyvinylpoly pyrrolidone* (PVPP) untuk menghilangkan senyawa fenol seperti lignin, tannin dan melanin yang mengotori kemurnian asam nukleat. Phenol-Chloroform-IsoamilAlkohol/PCIAA (25:24:1) sebanyak 500 µl ditambahkan ke dalam larutan ekstrak dan divortex selama 1 menit, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 20.000×g selama 5 menit. Langkah ini diulangi jika supernatan masih keruh. Sebanyak 400 µl supernatan sampel di-transfer ke tabung 1,5 ml baru, kemudian 80 µl etanol (konsentrasi akhir 16,6%) ditambahkan. Larutan yang diperoleh disentrifugasi dengan kecepatan 20.000×g selama 3 menit, supernatan ditransfer ke *micro-spin column*. Kemudian *column* disentrifugasi dengan

kecepatan 10.000×g selama 5 menit, sehingga akan terikat banyak dsRNA, beberapa ssRNA dan DNA pada selulosa, cairan yang terkumpul di bawah *column* dibuang. 400 µl buffer pencuci ditambahkan ke dalam *column*, kemudian *column* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000×g selama 5 menit untuk mengeliminasi ssRNA dan DNA yang terikat pada selulosa, cairan yang terkumpul di bawah *column* dibuang, langkah ini diulang 2 kali. Setelah pencucian yang terakhir, *column* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000×g selama 5 menit untuk menghilangkan etanol dari selulosa D. Tabung 0,6 ml ditempatkan pada tabung 2 ml baru dan ditambahkan 400 µl buffer elusi ke *column*, kemudian *column* disentrifugasi dengan kecepatan 10.000×g selama 5 detik. Proses elusi akan didapatkan dsRNA murni, tabung 0,6 ml dibuang. Kemudian ditambahkan 40 µl sodium asetat 3 M (pH 5,2) dan 1 mL etanol 99,5%, disimpan di suhu -20°C selama 30 menit hingga semalam. Setelah itu tabung disentrifugasi dengan kecepatan 20.000×g selama 5 menit untuk presipitasi dsRNA. Cuci tabung dengan 100 µl alkohol 70% kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000×g selama 2 menit, alkohol dibuang secara hati-hati menggunakan pipet, langkah ini diulangi sekali lagi kemudian dikeringanginkan. dsRNA dilarutkan dalam 30 µl *nuclease free water*. Sebagai pembanding digunakan metode ekstraksi RNA total sesuai prosedur *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Jerman).

Pengukuran Hasil Ekstraksi RNA

Total RNA hasil ekstraksi diukur kemurnian dan konsentrasinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm (Nano Vue-Biochrom, USA). Pengukuran konsentrasi RNA dilakukan pada panjang gelombang 260 nm dengan perhitungan 1 nilai absorbansi sama dengan 40 µg/ml. Kemurnian RNA total dari protein ditentukan berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (A260/A280) (Rapley & Heptinstall, 1998).

Sintesis dan Amplifikasi complementary-DNA (cDNA)

Sintesis cDNA menggunakan *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific, USA) dalam total volume 20 µl dengan komposisi bahan 4 µl *Reaction buffer 5x*, 2 µl *dNTP Mix* 10 mM, 1 µl *Oligo dT Primer* 100 µM (digantikan dengan 1 µl *Random primer* untuk sintesis cDNA ToCV), 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µl), 1 µl *ReverAid M-MuLV* (200 U/µl), 3 µl *template RNA*, 8 µl *nuclease free water*. Reaksi sintesis cDNA diinkubasi dalam *Thermal Cycler* (Mini cycler-Biorad, USA), dimana untuk ReMV dan CMV dengan program 65°C selama 5 menit, 42°C selama 60 menit, 70°C selama 5 detik, 4°C selama 5 menit. Sedangkan untuk ToCV inkubasi dilakukan dengan program 65°C selama 5 menit, 25°C selama 5 menit, 42°C selama 60 menit, 70°C selama 5 detik, 4°C selama 5 menit.

Reaksi amplifikasi cDNA tiap virus dilakukan secara terpisah menggunakan *Ready to go PCR Bead* menggunakan primer spesifik masing-masing (Tabel 1.) dan dengan siklus PCR yang berbeda-beda sesuai dengan suhu optimasi masing-masing (Tabel 2). Adapun total volume *Ready To Go PCR Bead* 25 µl dengan komposisi primer spesifik virus *forward* dan *reverse* masing-masing 1 µl, cDNA *template* 3 µl dan *nuclease free water* 19 µl. Reaksi amplifikasi cDNA diinkubasi dalam *Thermal Cycler* dengan suhu seperti pada Tabel 2. Visualisasi produk amplifikasi dilakukan menggunakan 1% gel agarosa dalam TBE 1× (Tris-borate EDTA) dengan elektroforesis selama 30 menit pada 100 Volt.

Analisis Data

Produk PCR dari masing-masing sampel dikirim ke PT Genetika Science untuk dilakukan sekuensing nukleotida. Hasil sekuen nukleotida kemudian digunakan untuk analisis kesejajaran dengan sekuen nukleotida ToCV, Tobamovirus atau CMV yang telah dipublikasikan di *GenBank* dengan program *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST). Hasil sekuensing berupa kromatogram dibaca dan disejajarkan urutan basa nukleotida menggunakan program *Mega 5.1*.

Tabel 1. Sekuen Primer untuk amplifikasi CMV, ToCV, dan Tobamovirus

| Target | Kode Primer | Urutan Basa Primer (5'-3') | Ukuran Produk | Referensi |
|-------------|-------------|-----------------------------|---------------|------------------------------|
| CMV | CMV-P1 | GCCGTAAGCTGGATGGACAA | 500 pb | Wylie <i>et al.</i> (1993) |
| | CMV-P2 | TATGATAAGAAGCTTGTTCGCG | | |
| ToCV | ToCV-CF | GTGTCAGGCCATTGTAAACCAG | 360 pb | Hartono <i>et al.</i> (2003) |
| | ToCV-CR | CACAAAGCGTTTCTTTTCATAAGCAGG | | |
| Tobamovirus | TobRT-up1 | GARTAYSCIGCIYTICARAC | 568 pb | Dovas <i>et al.</i> (2004) |
| | TobRT-do2 | BGCYTCAAARTTCCA | | |

Tabel 2. Siklus PCR untuk amplifikasi CMV, ToCV, dan Tobamovirus

| No. | Inkubasi PCR | Target Virus | | |
|-----|-------------------|--------------|---------------|---------------|
| | | Tobamovirus | CMV | ToCV |
| 1 | Pre denaturasi | 94°C 5 menit | 94°C 2 menit | 94°C 2 menit |
| 2 | Denaturasi | 95°C 1 menit | 95°C 30 detik | 95°C 30 detik |
| 3 | Penempelan | 46°C 1 menit | 51°C 30 detik | 62°C 30 detik |
| 4 | Pemanjangan | 72°C 1 menit | 72°C 1 menit | 72°C 1 menit |
| 5 | Pemanjangan Akhir | 72°C 5 menit | 72°C 3 menit | 72°C 5 menit |
| | Jumlah Siklus | 35 × | 35 × | 30 × |

HASIL DAN PEMBAHASAN

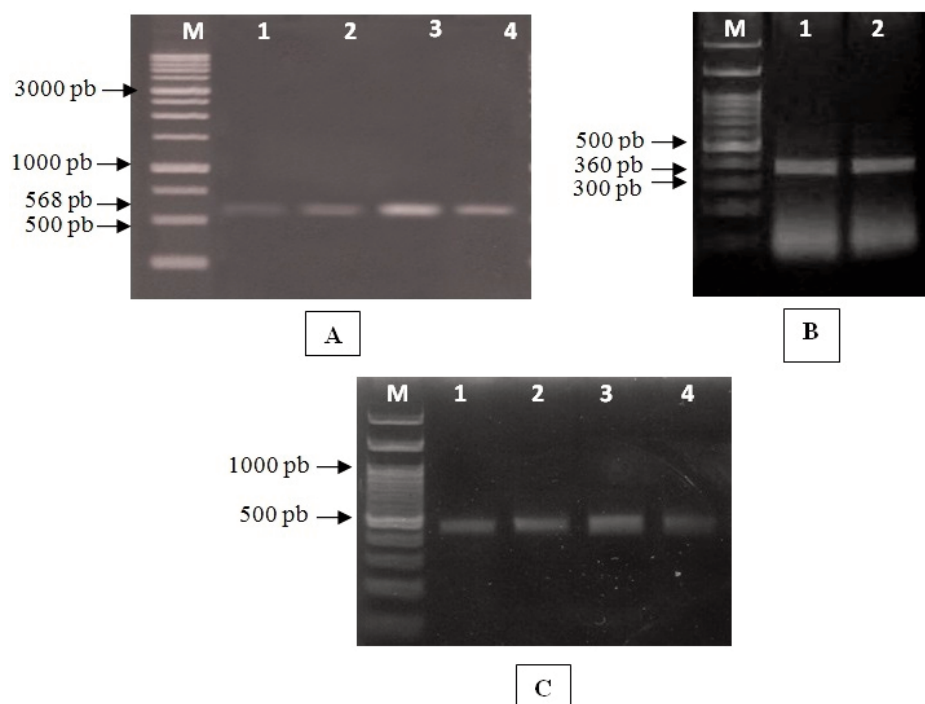
Secara kuantitas, konsentrasi dsRNA yang dihasilkan menggunakan metode ekstraksi dsRNA secara sederhana lebih kecil dibandingkan menggunakan metode ekstraksi kit, sedangkan kemurnian RNA yang dihasilkan hampir memiliki kemurnian yang tinggi di antara kedua metode yang diperoleh, berkisar 1,8–2,1 untuk metode ekstraksi secara sederhana dan 1,9–2,1 untuk metode ekstraksi kit. RNA hasil ekstraksi ini kemudian diamplifikasi menggunakan RT-PCR menghasilkan amplicon berukuran 500, 568, dan 360 pb berturut turut untuk CMV, Tobamovirus, dan ToCV (Gambar 1). Konsistensi pita DNA yang dihasilkan menggunakan kedua metode berbeda tergantung dari konsentrasi cDNA sebagai *template* PCR. Sebagai konfirmasi dan verifikasi terhadap hasil amplifikasi DNA yang dihasilkan, dilakukan sekuensing dan didapatkan bahwa peruntukan basa nukleotida yang dihasilkan adalah CMV, ToCV, dan spesies dari Tobamovirus yaitu *Rehmannia mosaic virus* (ReMV). Hasil analisis ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi dsRNA secara sederhana dapat dikembangkan sebagai metode preparasi RNA untuk deteksi RT-PCR yang cukup sederhana, mudah serta murah.

Perbandingan Kuantitas RNA Hasil Ekstraksi

Berbagai buffer digunakan untuk mengoptimalkan pelepasan RNA dari jaringan tanaman. Ekstraksi dsRNA menggunakan fenol atau kloroform, merkaptoetanol dan PVPP-40 secara bersamaan dalam ekstraksi digunakan untuk mengeliminasi protein, polisakarida dan senyawa fenol yang dapat memengaruhi kemurnian asam nukleat. Sedangkan pada metode ekstraksi menggunakan kit komersial digunakan *guanidine thiocyanate* atau *guanidine hydrochloride* sebagai buffer lisis dan mencegah aktivitas RNase. Pada ekstraksi sampel daun lada, proses oksidasi sampel sangat cepat karena kandungan fenol yang tinggi. Polifenol akan mengikat secara kovalen dan ireversibel terhadap protein dan asam nukleat (Maréchal-Drouard

& Guillemaut, 1995), sehingga menghasilkan warna coklat yang akan menurunkan hasil dan kualitas RNA yang diekstraksi (Porebskim *et al.*, 1997) serta mencegah kelarutan RNA secara sempurna. Konsentrasi RNA yang rendah pada daun lada (Tabel 3) bisa disebabkan oleh kandungan virus dalam jaringan sedikit, proses ekstraksi yang kurang sempurna sehingga proses pelepasan RNA dari sel kurang optimum serta rusak karena teroksidasi pada proses ekstraksi. Optimasi penggunaan buffer dilakukan dengan pengulangan penambahan PCIAA. Proses pengikatan molekul dsRNA dilakukan pada serbuk selulosa sedangkan RNA total menggunakan membran silika. Asam nukleat akan terabsorpsi pada buffer dengan kandungan alkohol di atas 35% sementara pada konsentrasi 16,6% hanya dsRNA saja yang terikat. Pada prinsipnya RNA dapat terikat karena afinitas tinggi ikatan antara muatan positif pada membran silika maupun serbuk selulosa terhadap muatan negatif RNA. Sodium berperan sebagai kation yang dapat menarik ikatan negatif dari oksigen pada rantai fosfat asam nukleat. Kation sodium akan memecah ikatan hidrogen antara hidrogen dalam air dan ion negatif oksigen pada silika dibawah kondisi garam tinggi ($\text{pH} \leq 7$) (Tan & Yiap, 2009). Pada suasana basa akan menyebabkan hidrolisis rantai fosfat sehingga RNA akan terlepas dari ikatan pada serbuk selulosa ataupun membran silika. Penambahan etanol absolut dan sodium asetat pada proses presipitasi menghilangkan polisakarida pada asam nukleat selama proses presipitasi RNA, sedangkan pada *RNEasy Mini kit* tidak dilakukan presipitasi.

Kemurnian dan konsentrasi RNA diukur dengan spektrofotometer pada 280 dan 260 nm. Prosedur ekstraksi molekul dsRNA dan RNA total menghasilkan kemurnian RNA tinggi namun dengan konsentrasi dsRNA yang lebih rendah dibandingkan konsentrasi RNA total. Adapun konsentrasi dan kemurnian RNA (Tabel 3) bervariasi untuk masing masing virus dimana tertinggi didapatkan konsentrasi virus pada daun tomat dan terendah pada daun lada.



Gambar 1. Visualisasi hasil PCR, pada gel agarosa 1 % dalam 1x TBE; (A) amplifikasi gen ORF2 Tobamovirus dengan metode ekstraksi dsRNA sederhana [(1) Te, (2) Ca-Tobamovirus] dan metode ekstraksi kit komersil [(3) Te, (4) Ca-Tobamovirus]; (B) amplifikasi gen RNA2 ToCV pada sampel To: (1) dengan metode ekstraksi dsRNA (2) metode ekstraksi kit komersil 2; (C) amplifikasi gen RNA3 CMV: dengan metode ekstraksi dsRNA sederhana [(1) L, (2) Ca-CMV] dan metode ekstraksi kit komersil [(3) L, (4) Ca-CMV]; (M) penanda DNA

Tabel 3. Rerata konsentrasi ($\mu\text{g ml}^{-1}$) dan kemurnian RNA sampel daun lada, tembakau dan tomat menggunakan metode ekstraksi dsRNA secara sederhana dan kit komersial

| Sampel | Nilai absorbansi | | | Rerata Kemurnian ^{b)} | | Konsentrasi ^{a)} ($\mu\text{g ml}^{-1}$) |
|---|------------------|-------|-------|--------------------------------|-----------|--|
| | A230 | A260 | A280 | A260/A280 | A260/A230 | |
| Metode Ekstraksi dsRNA sederhana | | | | | | |
| L | 0,1 | 0,18 | 0,1 | 1,8 | 1,8 | 4,7 |
| Te | 0,2 | 0,42 | 0,2 | 2,1 | 2,1 | 16,8 |
| To | 1,27 | 2,4 | 1,2 | 2 | 1,89 | 68 |
| Ca-Tobamovirus | 0,5 | 1,05 | 0,5 | 2,1 | 2,1 | 12,8 |
| Ca-CMV | 0,4 | 0,76 | 0,4 | 1,9 | 1,9 | 8,7 |
| Metode Ekstraksi Kit Komersial | | | | | | |
| L | 10,2 | 7,03 | 3,7 | 1,9 | 0,68 | 85,8 |
| Te | 8,24 | 12,6 | 6,02 | 2,1 | 1,5 | 581,4 |
| To | 12,48 | 23,62 | 11,25 | 2,1 | 1,89 | 730 |
| Ca-Tobamovirus | 4,97 | 9,6 | 4,6 | 2,1 | 1,9 | 438,8 |
| Ca-CMV | 2,8 | 2,1 | 1 | 2,1 | 0,75 | 78 |

Keterangan: a) Konsentrasi diukur pada gelombang 260 nm x $40 \mu\text{g ml}^{-1}$.

b) Kemurnian diukur dengan menghitung rasio absorbansi pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Amplifikasi RNA Tiga Virus Tumbuhan Menggunakan RT-PCR

Kualitas RNA hasil ekstraksi juga dianalisis menggunakan RT-PCR *two step*. Pada proses RT ini digunakan primer Oligo d(T) untuk mengenali ujung *polytail* A dari RNA Tobamovirus dan CMV untuk kemudian

ditranskrip. Lain halnya bagi RNA ToCV yang tidak memiliki *poly tail* A sehingga digunakan random Primer yang akan mengamplifikasi pada beberapa bagian dari mRNA.

Berdasarkan nilai absorbansi pada A260 dan A280, dengan kemurnian RNA yang sama-sama tinggi,

meskipun konsentrasi dsRNA lebih rendah dibandingkan dengan RNA total namun keduanya dapat teramplifikasi dengan PCR. Kualitas RNA yang murni terlihat pada hasil visualisasi (Gambar 1) menunjukkan adanya pita DNA tunggal berukuran 500, 568, dan 368 pb berturut-turut untuk target CMV, Tobamovirus, dan ToCV. Pada deteksi ToCV diperoleh konsistensi yang sama pita DNA dari kedua metode, hal ini menunjukkan bahwa keduanya dapat menghasilkan kualitas DNA yang sama. Sedangkan pada pita DNA Tobamovirus nampak konsistensi yang berbeda, dengan metode kit komersil diperoleh pita yang lebih tebal dibanding dengan metode ekstraksi dsRNA secara sederhana, kemungkinan disebabkan oleh faktor homogenisasi sampel.

Perunutan Basa Nukleotida Hasil Amplifikasi RT-PCR

Berdasarkan hasil sekuensing isolat Tobamovirus dari inang tembakau yang berasal dari Temanggung menunjukkan homologi 97% terhadap sekuen gen RNA3 terhadap *Rehmannia mosaic virus* (ReMV) pada

inang *Capsicum annum* isolat Japanese (AB628188.1). Sehingga disimpulkan bahwa Tobamovirus yang menginfeksi tembakau adalah ReMV.

Gejala ReMV pada tembakau sangat mirip dengan yang ditimbulkan oleh TMV, namun berdasarkan susunan basa nukleotida terdapat perbedaan antara kedua metode hal ini ditunjukkan dengan tingkat homologi sebesar 83% terhadap isolat TMV (Tabel 4). Isolat CMV pada inang lada dari daerah Putat, Yogyakarta memiliki homologi 95,5% dengan CMV pada lada dari India (KU255792.1.) (Tabel 5). Gejala penyakit virus pada daun lada sering merupakan gejala campuran CMV dan PYMoV, namun PYMoV ini merupakan virus dengan genom DNA dengan gejala *mottle*. Isolat ToCV pada tomat dari Magelang menunjukkan homologi 97,5% terhadap isolat ToCV dari USA (Tabel 6). ToCV dan TICV sering berasosiasi menimbulkan gejala yang hampir sama sulit untuk dibedakan. Dari hal inilah pentingnya deteksi molekuler dilanjutkan dengan perunutan basa nukleotida untuk mengidentifikasi virus patogen tanaman.

Tabel 4. Persentase kesamaan basa nukleotida dari gen RNA3 isolat ReMV pada tembakau (*Nicotiana tabacum* L.) asal Yogyakarta dengan beberapa isolat Tobamovirus dari beberapa negara dengan program Genetyx

| No. | Isolat | Homologi (%) | | | | | |
|-----|-------------|--------------|----|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | ReMV.Jateng | ID | 97 | 93,8 | 93,6 | 83,7 | 78,7 |
| 2 | ReMV.Jepang | | ID | 92,6 | 92,4 | 82,8 | 78,3 |
| 3 | ReMV.Korea | | | ID | 98,8 | 83 | 77,8 |
| 4 | ReMV.China | | | | ID | 83,3 | 78,3 |
| 5 | TMV.USA | | | | | ID | 79,2 |
| 6 | ToMV.USA | | | | | | ID |

Keterangan: ReMV-Yogya = merupakan hasil analisis sekuen dalam penelitian ini; *Capsicum annum*-Jepang (AB628188.1), *Rehmannia glutinosa*-Korea (KU133476.1), *R. glutinosa*-China (EF375551.1), Tembakau-USA (NC001367.1) Tembakau-USA (KR537870.1).

Tabel 5. Persentase kesamaan basa nukleotida dari gen RNA3 isolat CMV pada lada (*Piper nigrum* L) asal Yogyakarta dengan beberapa isolat CMV dari beberapa negara dengan program Genetyx

| No. | Isolat | Homologi (%) | | | | | |
|-----|-------------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | CMV.Yogya | ID | 95,5 | 91,6 | 93,3 | 94 | 94 |
| 2 | CMV.China | | ID | 91,3 | 93,8 | 94 | 93,3 |
| 3 | CMV.China | | | ID | 93,3 | 92,3 | 92 |
| 4 | CMV.Korea Selatan | | | | ID | 95 | 94,8 |
| 5 | CMV.Iran | | | | | ID | 95,5 |
| 6 | CMV.Italia | | | | | | ID |

Keterangan: CMV-Yogya = merupakan hasil analisis sekuen dalam penelitian ini; Tomat_China (EF216867), *Piper nigrum*-China (KU255792.1.), *Capsicum annum*-Korea Selatan (KC527768.1.), *Brassica napus*-Iran (LC066467.1.), *Capsicum* sp.-Italia (HE962480.1.).

Tabel 6. Persentase kesamaan basa nukleotida dari gen RNA2 isolat ToCV pada tomat (*Lycopersicon esculentum*) asal Magelang, Jawa tengah dengan beberapa isolat genus Crinivirus yang berbeda dengan menggunakan program Genetyx

| No. | Isolat | Homologi (%) | | | | | |
|-----|---------------|--------------|------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | ToCV.Magelang | ID | 97,5 | 96,1 | 97,2 | 96,8 | 94,6 |
| 2 | ToCV.USA | | ID | 97,9 | 99,6 | 98,8 | 99,3 |
| 3 | ToCV.Spanyol | | | ID | 98,2 | 97,9 | 97,5 |
| 4 | ToCV.Korsel | | | | ID | 99,6 | 99,3 |
| 5 | ToCV.Brasil | | | | | ID | 98,9 |
| 6 | ToCV.Yunani | | | | | | ID |

Keterangan: ToCV-Yogya = merupakan hasil analisis sekuen dalam penelitian ini; Tomat-USA (AY903448.1.), Tomat-Spanyol (KJ200309.1.), Tomat-Korea Selatan (KP137099.1.), Tomat-Brasil (JQ952601.1.), Tomat-Yunani (EU284744.1).

Metode ekstraksi dsRNA secara sederhana memiliki prospek untuk dikembangkan dalam deteksi virus. Seperti diketahui bahwa virus patogen tanaman didominasi oleh virus RNA (dsRNA dan ssRNA). Metode ini merupakan pengembangan dari metode ekstraksi dsRNA yang sebelumnya dikembangkan oleh Valverde *et al.* (1990) menggunakan prinsip kerja titrasi dalam volume yang lebih besar, sementara metode ekstraksi dsRNA sederhana ini dikembangkan Okada *et al.* (2015) ini menggunakan prinsip kerja sentrifugasi untuk memperoleh dsRNA. Berdasarkan hasil analisis biaya bahan kimia yang digunakan dalam metode ekstraksi dsRNA secara sederhana jauh lebih murah dibandingkan metode ekstraksi dengan kit dan tidak memerlukan peralatan khusus.

KESIMPULAN

Metode ekstraksi dsRNA yang diuji dapat digunakan untuk preparasi RNA dalam deteksi RT-PCR terhadap CMV, ReMV, dan ToCV. Metode ini mampu menghasilkan RNA dengan tingkat kemurnian tinggi sebanding dengan metode ekstraksi menggunakan kit komersil, cepat, mudah, dan murah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penyuluhan dan Pengembangan Sumber Daya Manusia Pertanian (BPPSDM) Kementerian Pertanian yang telah membiayai sebagian dari penelitian ini. Naskah ini merupakan bagian dari tesis yang berjudul "Ekstraksi dsRNA secara Sederhana untuk Preparasi Deteksi RT-PCR Tiga Spesies Virus Tanaman".

DAFTAR PUSTAKA

- Adiputra, J., S.H. Hidayat, & T.A. Damayanti, 2012. Evaluasi Tiga Metode Preparasi RNA Total untuk Deteksi *Turnip mosaic potyvirus* dari Benih *Brassica rappa* dengan Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 8: 44–49.
- Azizi, P., M. Y. Rafii, M. Mahmood, S.N.A. Abdullah, M.M.Hanafi, M.A. Latif & S. Ashkani. 2017. Evaluation of RNA Extraction Methods in Rice and their Application in Expression Analysis of Resistance Genes against *Magnaporthe oryzae*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 31: 75–84.
- Balijja, A., A. Kvarnheden, & T. Turchetti, 2008. A Non-phenol-chloroform Extraction of Double-stranded RNA from Plant and Fungal Tissues. *Journal of Virological Methods* 152: 32–37.
- Diningsih, E. 2016. Carnation mottle virus pada Tanaman Anyelir di Indonesia: Etiologi, Ekspresi Gen Protein Selubung, dan Eliminasi. Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor. 119 p.
- Dodds, J.A., T.J. Morris & R.L. Jordan, 1984. Plant Viral Double-Stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22: 151–168.
- Dovas, C.I., K. Efthimiou, & N.I. Katis, 2004. Generic Detection and Differentiation of Tobamoviruses by a Spot nested RT-PCR-RFLP Using dI-Containing Primers Along with Homologous dG-Containing Primers. *Journal of Virological Methods* 117: 137–144.
- Edy, V. G., M. Szekely, T. Loviny, & C. Dreyer, 1976. Action of Nucleases on Double Stranded RNA. *European Journal of Biochemistry* 61: 563–572.

- Hartono, S., T. Natsuaki, H. Sayama, H. Atarashi, & S. Okuda, 2003. Yellowing Disease of Tomatoes Caused by *Tomato infectious chlorosis virus* Newly Recognized in Japan, *Journal of General Plant Pathology* 69: 61–64.
- John, M. E., 1992. An Efficient Method for Isolation of RNA and DNA from Plants Containing Polyphenolics. *Nucleic Acids Research* 20: 2381.
- Karan, M., S.Hicks, R.M. Harding & D.S.Teakle, 1991. Stability and Extractability of Double-stranded RNA of Pangola Stunt and Sugarcane Fiji Disease Viruses in Dried Plant Tissues. *Journal of Virological Methods* 33: 211–216.
- Karp, A., P.G. Isaac, & D.S. Ingram, 1998. Isolation of Nucleic Acids Using Silica-Gel Based Membranes: Methods Based on the Use of QIAamp Spin Columns. p. 59–63. *In* A. Karp, D.S. Ingram, P.G. Isaac (eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall Springer, Netherlands.
- Li, R., R. Mock, Q. Huang, J. Abad, J. Hartung, & G. Kinard, 2008. A Reliable and Inexpensive Method of Nucleic Acid Extraction for the PCR-based Detection of Diverse Plant Pathogens. *Journal of Virological Methods* 154: 48–55.
- Maréchal-Drouard, L & P. Guillemaut, 1995. A Powerful but Simple Technique to Prepare Polysaccharide-free DNA Quickly and without Phenol Extraction. *Plant Molecular Biology Reporter* 13: 26–30.
- Morris, T.J., & J.A. Dodds. 1979. Isolation and Analysis of Double-stranded RNA from Virus-infected Plant and Fungal Tissue. *Journal of Phytopathology* 69: 854–858.
- Nassuth, A., E. Pollari, K. Helmechy, S. Stewart, & S.A. Kofalvi. 2000. Improved RNA Extraction and One-tube RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Control Plant RNA Plus Several Viruses in Plant Extracts. *Journal of Virological Methods* 90: 37–49.
- Newbury, H. J., & J.V. Possingham. 1977. Factors Affecting the Extraction of Intact Ribonucleic Acid from Plant Tissues Containing Interfering Phenolic Compounds. *Plant Physiology* 60: 543–547.
- Okada, R., E. Kiyota, H. Moriyama, T. Fukuhara, & T. Natsuaki. 2015. A Simple and Rapid Method to Purify Viral dsRNA from Plant and Fungal Tissue. *Journal of General Plant Pathology* 81: 103–107.
- Porebskim, S., L.G. Bailey & B.R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA Extraction Protocol for Plants Containing High Polysaccharide and Polyphenol Components. *Plant Molecular Biology Reporter Journal* 15: 8–15.
- Rapley, R. & J. Heptinstall. 1998. Protocol RNA Isolation and Characterization Protocols Volume 86 of the Series Methods in Molecular Biology. p. 65–68. *In* R. Rapley & D.L. Manning (eds.) *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., New Jersey.
- Sahu, S.K., M. Thangaraj, & K. Kathiresan. 2012. DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *Molecular Biology* 1: 1–6.
- Scholthof, K-B. G. 2008. *Tobacco Mosaic Virus: The Beginning of Plant Pathology*. APSnet Features. <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/TMV.aspx>, modified 13/6/17.
- Tan, S. C. & B.C.Yiap. 2009. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 1–10.
- Tzanetakis, I.E. & R.R. Martin. 2008. A New Method for Extraction of Double-stranded RNA from Plants. *Journal of Virological Methods* 149: 167–170.
- Wiley, S., C. R. Wilson, R. A. C. Jones & M. G. K. Jones. 1993. A Polymerase Chain Reaction Assay for *Cucumber Mosaic Virus* in Lupin Seeds. *Australian Journal Agriculture Research* 44: 41–51.
- Valverde, R.A, 1990. Analysis of Double-stranded RNA for Plant Virus Diagnosis. *Plant Disease* 74: 255–258.