



Stabilitas Genetik Klon Tanaman Tebu Transgenik Berbasis RNAi dan Ketahanannya terhadap Infeksi SCMV

Genetic Stability of RNAi-Based Transgenic Sugarcane Clones and their Resistance against SCMV Infection

Author(s): Naomi Berthi Yonindi⁽¹⁾; Retno Apriasti⁽¹⁾; Netty Ermawati⁽²⁾; Bambang Sugiharto^{(1)*}

⁽¹⁾ Universitas Jember

⁽²⁾ Politeknik Negeri Jember

* Corresponding author: sugiharto.fmipa@unej.ac.id

Submitted: 17 Dec 2021

Accepted: 21 Mar 2022

Published: 31 Mar 2022

ABSTRAK

SCMV merupakan virus pathogen pada tanaman tebu yang dapat menyebabkan perlambatan pertumbuhan, kerusakan kloroplas, penurunan fotosintesis dan hilangnya produktivitas gula sekitar 20-50%. Penelitian sebelumnya telah mengembangkan tanaman tebu tahan virus SCMV dengan memasukkan HpSCMVCp melalui pendekatan bioteknologi RNAi (RNA interference). RNAi dapat memproduksi dsRNA homolog yang akan diproses menjadi 21-24 siRNA oleh enzim Dicer. Spesifik siRNA akan mendegradasi target mRNA virus dan mencegah ekspresi protein virus. Dua klon tebu transgenik HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi yang telah dikembangkan perlu dilakukan uji stabilitas genetik dan ketahanannya pada generasi T1. Indukan tebu HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi ditumbuhkan 5 mata tunas dan dilakukan konfirmasi PCR menunjukkan adanya materi genetik HpSCMVCp yang stabil pada setiap mata tunas. Selanjutnya pada umur 2 bulan dilakukan uji tular SCMV yang menunjukkan tingkat ketahanan terhadap serangan SCMV mencapai 70-100% dibandingkan dengan wild type 0%. Hal ini juga ditunjukkan dari hasil analisa RT-PCR deteksi SCMV dengan pasangan primer untuk amplifikasi DNA Nib-Cp. Tanaman tebu WT yang bergejala mosaik dan tidak tahan infeksi SCMV menunjukkan amplifikasi DNA Nib-Cp dan tidak ada pada tanaman tebu transgenik yang tahan. Secara keseluruhan penelitian ini menunjukkan bahwa tanaman tebu transgenik stabil menurunkan materi genetik dan ketahanan terhadap infeksi SCMV pada generasi berikutnya.

Kata Kunci:

HpSCMVCp;
ketahanan
berbasis RNAi;
SCMV;
stabilitas
genetik;
tanaman tebu

ABSTRACT

Keywords:

genetic
stability;
HpSCMVCp;
RNAi-based
resistance;
SCMV;
transgenic
sugarcane

SCMV is a pathogenic virus in sugarcane that causes growth retardation, chloroplast damage, decreased photosynthesis, and loss of sugar productivity around 20-50%. The transgenic sugarcane resistant to SCMV has been developed by the introduction of HpSCMVCp-DNA construct through the RNAi-based method. The RNAi produces homologous dsRNA which will be processed into 21-24 siRNA by the Dicer enzyme. Specific siRNA degrades viral target mRNA, prevents viral protein expression, and induces viral resistance. This experiment was directed to examine genetic stability and the resistance of the transgenic sugarcane against SCMV infection. Two clones of T1 transgenic sugarcane named HpSCMVCp-CaMV and HpSCMVCp-Ubi that have been confirmed to carry the corresponding genes were used for the experiment. Five lateral buds from three lines of HpSCMVCp-CaMV and HpSCMVCp were isolated and grown in a green house. PCR analysis showed the presence of stable HpSCMVCp genetic material in the leaf genome of each shoot. Furthermore, at the age of 2 months, the SCMV infection was carried out and showed the level of resistance to SCMV infection reached 70-100% in transgenic lines compared to 0% or highly susceptible in wild type. Collectively, the results indicated that transgenic sugarcane stable inherited targeted genetic materials and resistance to SCMV infection into the next generation.



PENDAHULUAN

Tebu merupakan tanaman penting penghasil gula yang tumbuh di daerah subtropis sampai tropis. Produktivitas tebu dipengaruhi oleh berbagai sumber penyakit, seperti fungi, bakteri, virus dan fitoplasma (Holkar et al., 2017). Penyakit yang dapat menyebabkan masalah serius pada tebu adalah SCMV (*Sugarcane Mosaic Virus*). SCMV termasuk kedalam genus potyvirus family potyviridae dan merupakan positive single-standed RNA (+ssRNA) dengan satu ORF (*Open Reading Frame*) yang memiliki panjang ± 10 kb dengan mengkode 10 protein fungsional yaitu P1, HC-pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, Nib, dan CP (Zhu et al., 2014; Yao et al., 2017).

SCMV merupakan virus penyebab penyakit mosaik pada beberapa kultivar tebu di Indonesia, khususnya Jawa Timur dengan insiden penyakit 78% dan keparahan 65% (Addy et al., 2017). Selain itu juga menyebabkan hilangnya produktivitas gula sekitar 20-50% (Putra et al., 2014; Akbar et al., 2017). Strategi pengendalian SCMV pada tanaman tebu melalui metode RNAi (RNA interference) telah dikembangkan pada penelitian sebelumnya dan menyatakan RNAi efektif untuk menginduksi resistensi terhadap SCMV (Widyaningrum et al., 2021). RNAi merupakan suatu teknik rekayasa genetika yang dapat digunakan untuk meningkatkan ketahanan/resistensi tanaman melawan infeksi virus (Dietzgen & Mitter, 2006). RNAi merupakan suatu sistem regulasi gen yang dapat menghambat ekspresi gen melalui interaksi spesifik antara RNA dengan siRNA (small interfering RNA) (Burguán, 2006).

Penelitian sebelumnya didapatkan Gen SCMVCp yang mengkode protein mantel (CP) (Apriasti et al., 2018) dan telah dimasukkan ke dalam plasmid pGreen-0179 dengan orientasi DNA sense dan antisense, dinamakan konstruk HpSCMVCp. Promotor CaMV dari

Cauliflower mosaic virus (CaMV) dan ZmUbi dari *Zea mays* ubiquitin (Ubi) dipilih untuk mengendalikan transkripsi konstruk HpSCMVCp, masing-masing disebut HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi. HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi masing-masing di transformasikan ke tanaman tebu yang menghasilkan 2 klon tanaman transforman yang disebut klon HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi (Widyaningrum et al., 2021). Dalam penelitian ini dilakukan pengujian stabilitas genetik, dan kinerja stabilitas ketahanan kedua klon tanaman tebu transgenik terhadap infeksi SCMV pada generasi T2. Untuk mengetahui melihat efektivitas tingkat ketahanan transgenik, dilakukan pengamatan gejala mosaik dan keberadaan SCMV sesudah perlakuan uji tular.

METODOLOGI

Bahan tanam

Tanaman tebu (*Saccharum officinarum* L.) transgenik dari klon HpSCMVCp-CaMV sebanyak 3 *lines* (C4, C5, dan C6) dan klon HpSCMVCp-Ubi sebanyak 3 *lines* (U1, U2, dan U3), dari masing-masing *lines* tanaman batang tebu diambil 5 tunas dari pucuk batang untuk dikecambahkan dan ditumbuhkan. Selain itu, juga ditumbuhkan tanaman tebu kontrol bukan transgenik yang disebut WT (*wild type*). Tebu di tanam di dalam pot yang berisi media tanah dan ditumbuhkan di rumah kaca sampai umur tiga bulan.

Analisa PCR

Untuk konfirmasi keberadaan *transgene* tanaman tebu dilakukan analisa PCR menggunakan DNA genom daun tebu. DNA genom diekstraksi dari 0.3 g daun tebu yang ditanam di rumah kaca sesuai dengan metode yang dijelaskan sebelumnya (Apriasti et al., 2018). Daun tebu dihaluskan dengan *mortal* dan *stumpler* dalam nitrogen cair, kemudian bubuk daun dimasukkan ke dalam tabung

ependorf 1,5 ml dan diberi 600 µl buffer ekstraksi yang mengandung 100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1% SDS dan 5 mM 2-mercaptoethanol. Setelah itu diinkubasi pada 65°C selama 10 menit, 300 µl kalium asetat 5 M ditambahkan, dan sampel diinkubasi dalam es selama 10 menit. Pelet dipisahkan dengan sentrifugasi pada $12.000 \times g$ pada 4°C selama 10 menit. DNA diendapkan dengan menambahkan 0,8 kali lipat isopropanol ke supernatan, dan sampel kemudian diinkubasi pada suhu -20°C selama satu jam. Selanjutnya di sentrifugasi pada $12.000 \times g$ pada 4°C selama 10 menit untuk mendapatkan pelet DNA. Pelet DNA dilarutkan dalam 500 µl buffer TE 10 mM. RNA dihilangkan dengan penambahan RNase, dan DNA diendapkan dengan presipitasi etanol. DNA di sentrifugasi pada $12.000 \times g$ pada 4°C selama 10 menit, dan pellet dikeringkan dengan *vacuum dry* dan ditambahkan 20 µl buffer TE 10 mM dan disimpan pada suhu -20 °C sampai analisis. Konsentrasi DNA diukur menggunakan spektrofotometer NanoVue (GE Healthcare, USA) pada panjang gelombang 260 nm.

Untuk deteksi keberadaan gen HpSCMVCp dalam DNA genom, analisis PCR dilakukan menggunakan master mix kit (Roche, Jerman) dan pasangan primer F1-R1. Reaksi PCR dilakukan dalam alat T100 thermal cycler (Bio-Rad, USA) menggunakan pre-denaturasi pada 95°C selama 3 menit, diikuti oleh 30 siklus denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 58°C selama 30 detik, dan ekstensi pada 72°C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. DNA produk PCR dipisahkan pada 1% gel agarosa, diwarnai dengan etidium bromida dan didokumentasikan di GelDoc.

Inokulasi SCMV

Resistensi virus dari tebu transgenik dievaluasi dengan inokulasi mekanis

(buatan) sesuai dengan metode sebelumnya dijelaskan (Addy et al., 2017). Sebanyak 2 g daun tebu kultivar PS881 dengan gejala khas mosaik SCMV dipanen dan dihaluskan dalam 10 mL buffer fosfat 0,1 M (pH 8,0) mengandung 2% PVP (polyvinylpyrrolidone) menggunakan *mortal* dan *stumpler*. Hasil supernatan (cairan SAP) disaring dan digunakan untuk inokulasi mekanis dengan menggosoknya, bersama dengan *carborundum* sebagai bahan untuk melukai permukaan daun tebu yang berumur 2 bulan di rumah kaca. Kemudian daun dibilas dengan air steril untuk menghilangkan bahan yang tidak perlu. Untuk memaksimalkan infeksi virus, tanaman tebu yang diinokulasi, sebelumnya dilakukan inkubasi selama 24 jam di ruangan gelap. Perkembangan daun bergejala yang baru muncul diamati setiap hari selama 40 hari pasca inokulasi. Tebu diklasifikasikan sebagai resisten atau rentan, sesuai dengan tingkat perkembangan daun yang bergejala (Addy et al., 2017).

Analisis Semi-quantitative RT-PCR

Eksresi gen CP-SCMV ditentukan dalam daun tebu transgenik menggunakan analisa RT-PCR. Sebanyak daun tebu 0,5 g dihaluskan dengan nitrogen cair, dan RNA total diisolasi menggunakan Kit isolasi RNA sesuai dengan instruksi pabrik (Tiangen, China). RNA total dilarutkan dalam 30 µl H₂O, dan konsentrasinya diukur menggunakan spektrofotometer NanoVue (GE Healthcare, AS) pada 260 nm. Kemudian, 1 µg RNA total dikonversi menjadi cDNA menggunakan reverse transcriptase (RT) dan primer oligo-dT (Bio-Rad, Amerika Serikat). cDNA yang dihasilkan digunakan untuk amplifikasi PCR dengan pasangan primer F3 dan R3 sebanyak 25 kali siklus. Pasangan primer ini hanya mengamplifikasi RNA virus dan tidak RNA yang dihasilkan dari ekspresi transgen. Produk PCR dipisahkan pada gel agarosa 1% dan divisualisasikan dengan

GelDoc. Untuk memastikan bahwa jumlah RNA total yang sama digunakan, maka digunakan pasangan primer F2 dan R2

(Tabel 1) untuk amplifikasi gen Actin, yang digunakan sebagai gen referensi.

Tabel 1. *Sequence* nukleotida primer yang digunakan pada penelitian ini

Table 1. *The sequences of oligonucleotide primers used in this study*

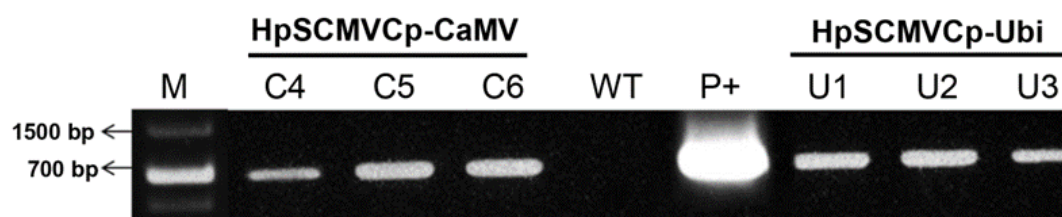
Primer	Sekuens 5'-3'	Gen target	Produk (bp)
F1	CCCATATGACAGTCGATGCAGGTGCTC	HpSCMVCP	725
R1	ATGGATCCTAGTGGTGCTGCTGCACTCCC	HpSCMVCP	725
F2	GCAACTGGGATGACATGGAG	Actin	568
R2	ATGGCTGGAAGAGGACCTCAG	Actin	568
F3	GCCATACTCGAGTGGGATCG	Nib-Cp	483
R3	CCTTGTCTCTTTGGCCTCCTG	Nib-Cp	483

HASIL DAN PEMBAHASAN

Stabilitas genetik tanaman tebu transgenik

Konfirmasi tanaman tebu transgenik dengan analisa PCR bertujuan untuk membuktikan keberadaan gen HpSCMVCP pada tanaman tebu yang akan digunakan sebagai bahan tanam dalam

penelitian. Hasil analisis PCR menggunakan pasangan primer F1 dan R1 menunjukkan adanya pita DNA yang berukuran 725 bp dan tidak pada tanaman WT (wild type) (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa gen HpSCMVCP terdapat di dalam dan terintegrasi pada genom tanaman tebu transgenik.



Gambar 1. Amplifikasi dengan PCR DNA- HpSCMVCP pada genom DNA daun tanaman tebu transgenik T1. PCR dilakukan menggunakan pasangan primer F1-R1 dan DNA hasil PCR dipisahkan dengan elektroforesis gel agarose. C4, C5, C6 adalah lines tebu transgenik klon HpSCMVCP-CaMV, dan U1, U2, U3 merupakan lines tebu transgenik klon HpSCMVCP-Ubi. M, marker DNA dan P+, plasmid DNA sebagai control positif.

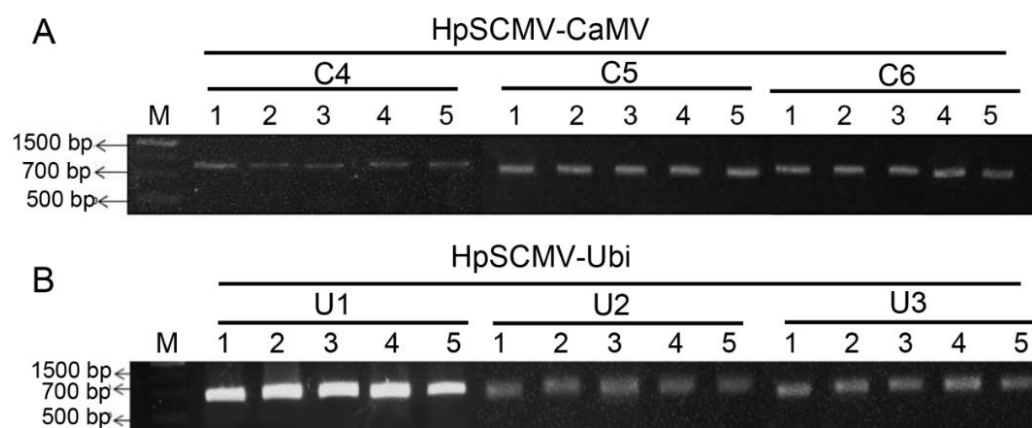
Figure 1. PCR amplification of HpSCMVCP in leaves genomic of T1 transgenic sugarcane. The PCR was conducted using primers pair of F1-R1 and the PCR product was separated by agarose gel electrophoresis. C4, C5, C6 are transgenic sugarcane lines from HpSCMVCP-CaMV clones, and U1, U2, U3 are transgenic lines from HpSCMVCP-Ubi. M, DNA marker and P+, DNA plasmid as the positive control.

Untuk melihat stabilitas genetik tanaman tebu transgenik, 3 tanaman tebu dari masing-masing lines HpSCMVCP-CaMV dan HpSCMVCP-Ubi yang terkonfirmasi positif mengandung gen HpSCMVCP, digunakan sebagai tanaman

induk untuk ditumbuhkan pada generasi berikutnya. Sebanyak 5 nodus (tunas lateral) dari batang tanaman transgenik ditumbuhkan sebagai generasi selanjutnya dan dikonfirmasi keberadaan gen HpSCMVCP dengan analisis PCR. Nodus

merupakan tempat munculnya tunas-tunas yang dapat tumbuh menjadi baru. Nodus pada batang bersifat meristematis dan memiliki potensi sebagai tempat untuk tumbuh tunas dan akar (Pamungkas et al., 2009). Hasil konfirmasi PCR menggunakan pasangan primer F1 dan R1 pada 5 nodus menunjukkan pita DNA dengan ukuran 725 bp pada setiap nodus

batang dimulai dari nodus batang pertama (N1) sampai nodus kelima (N5) di masing-masing klon tebu transgenik (Gambar 2A, 2B). Hal ini menunjukkan bahwa gen HpSCMVCp yang terintegrasi di dalam genom tanaman tebu transgenik diturunkan pada generasi berikutnya baik pada klon tebu transgenik HpSCMVCp-CaMV atau HpSCMVCp-Ubi.



Gambar 2. Amplifikasi dengan PCR DNA- HpSCMVCp pada genom DNA daun tanaman tebu transgenik T2. (A) tanaman tebu transgenik HpSCMVCp-CaMV dan (B) tanaman tebu transgenik HpSCMVCp-Ubi. 1, 2, 3, 4, 5 adalah tanaman tebu transgenik yang tumbuh dari tunas lateral. Keterangan gambar sama dengan Gambar 1

Figure 2. PCR amplification of HpSCMVCp in leaves genomic of T2 transgenic sugarcane. (A) HpSCMVCp-CaMV transgenic sugarcane lines, and (B) HpSCMVCp-Ubi transgenic sugarcane lines. 1, 2, 3, 4, 5 are the transgenic sugarcane lines that are grown from lateral buds. The figure legend is the same as described in Figure 1.

Berdasarkan hasil penelitian Dai et al. (2001), integrasi gen insert pada tanaman transgenik hasil transformasi menggunakan *Agrobacterium* lebih stabil dari pada menggunakan metode lain. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa tanaman tebu hasil transformasi masih bersifat heterogen, gen yang diinsersikan masih belum tentu dapat ditemukan pada semua sel tanaman. Suatu tanaman transgenik dapat dikatakan stabil jika gen yang diinsersikan pada tanaman induk juga dapat ditemukan kembali pada tanaman generasi selanjutnya (Dewi et al., 2002).

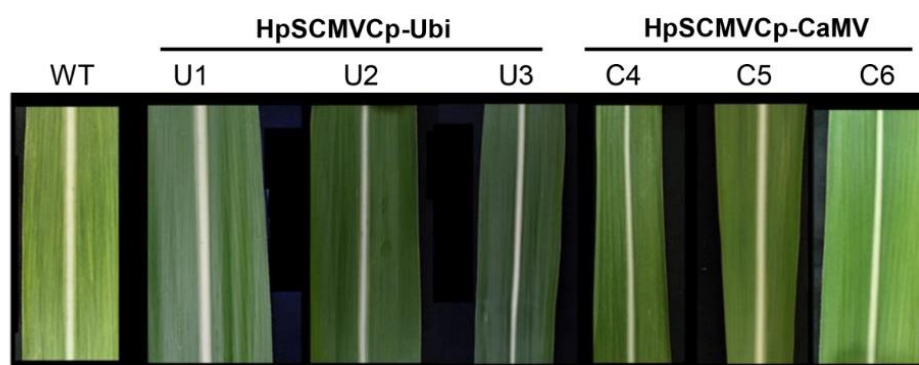
Resistensi tebu transgenik terhadap infeksi SCMV

Indikator tebu transgenik tergolong resisten atau rentan dapat diamati berdasarkan pada pengamatan morfologi terkait ada tidaknya gejala SCMV pada daun tebu. Pengamatan gejala dilakukan pada masing-masing lines SCMVCp-CaMV dan SCMVCp-Ubi dan WT (wild type) sesudah perlakuan inokulasi SCMV. Menurut Sholeh et al. (2019), gejala umum virus mosaik adalah tampak bercak-bercak perbedaan warna hijau pada helaian daun berupa warna hijau terang atau kekuning-

kuningan yang menunjukkan terjadinya klorosis, karena menurunnya konsentrasi klorofil pada daun. Pengamatan munculnya gejala mosaik dilakukan pada dua daun termuda setiap tanaman tebu. Tanaman tebu wild type memperlihatkan adanya gejala mosaik daun setelah inokulasi virus pada hari ke-21. Adapun identifikasi ketahanan pada tebu transgenik menunjukkan bahwa terdapat 6 tanaman tebu transgenik lines SCMVCp-CaMV dan SCMVCp-Ubi memperlihatkan gejala mosaik daun dengan rentang waktu yang berbeda (Gambar 3).

Gejala mosaik pada tanaman tebu transgenik terbagi menjadi tiga kategori, yaitu ringan, sedang dan berat. Menurut Pandawani et al. (2018), untuk labu (*squash*) terhadap WMV menggunakan modifikasi dengan skor yaitu: (0) tanaman

tidak menunjukkan gejala mosaik; (1) tanaman menunjukkan gejala mosaik sangat ringan; (2) tanaman menunjukkan gejala mosaik sedang tetapi daunnya tidak menunjukkan perubahan bentuk; (3) tanaman menunjukkan gejala mosaik sedang dan pada daunnya menunjukkan perubahan bentuk atau berpilin; (4) tanaman menunjukkan gejala mosaik berat dan pada daunnya banyak terjadi perubahan bentuk daun. Hasil infeksi pada tanaman tebu transgenik lines SCMVCp-CaMV dan SCMVCp-Ubi menunjukkan gejala mosaik ringan, sedangkan pada tanaman wild type menunjukkan gejala mosaik berat berdasarkan indeks keparahan infeksi virus SCMV yaitu dengan menghitung skor luas keparahan infeksi SCMV di daun (Gambar 3)



Gambar 3. Gejala mosaik pada daun tebu transgenik HpSCMVCp-Ubi, HpSCMVCp-CaMV dan WT (wild type) sesudah infeksi SCMV. Gejala mosaik muncul pada daun tebu WT tetapi relatif tidak muncul pada daun tanaman tebu transgenik.

Figure 3. The mosaic symptoms in transgenic sugarcane lines of HpSCMVCp-Ubi, HpSCMVCp-CaMV, and control of WT sugarcane after SCMV artificial infection. The symptoms were appeared in the leaves of WT and almost did not appear in transgenic sugarcane leaves

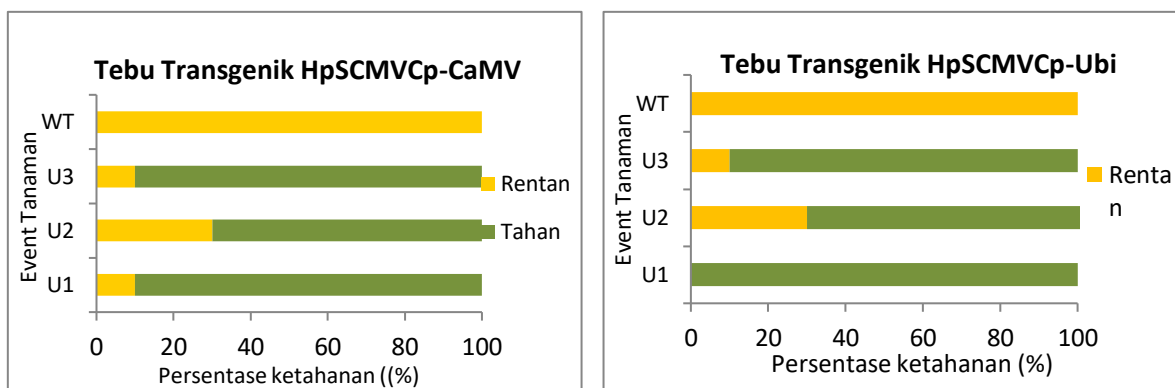
Berdasarkan data pengamatan gejala mosaik daun dapat diketahui bahwa tanaman tebu transgenik SCMVCp-Ubi memiliki presentase jumlah line resisten lebih tinggi (80%-100%) dibandingkan SCMVCp-CaMV (70%-90%). Namun demikian, tanaman tebu wild type 100%

tidak resisten terhadap infeksi virus SCMV seperti yang ditunjukkan pada (Gambar 4). Menurut Widyaningrum et al. (2021), hasil tebu transgenik SCMVCp-Ubi lebih resisten dengan tingkat resistensi yaitu 82,35% dibandingkan tebu transgenik SCMVCp-CaMV yang hanya 57,69%.

Hasil penelitian ini mengkonfirmasi bahwa Ubi-promoter lebih efektif dalam mengendalikan ekspresi gen HpSCMVCP untuk ketahanan terhadap SCMV pada tebu transgenik dibandingkan CaMV-promoter. Hasil yang serupa juga dilaporkan pada tanaman tebu, dimana promotor ZmUbi dari *Zea mays* secara signifikan meningkatkan ekspresi transgen dibandingkan dengan promotor CaMV (Liu et al., 2003). Ubiquitin dari *Zea mays* adalah promotor konstitutif yang kuat untuk ekspresi transgen pada tanaman monokotil.

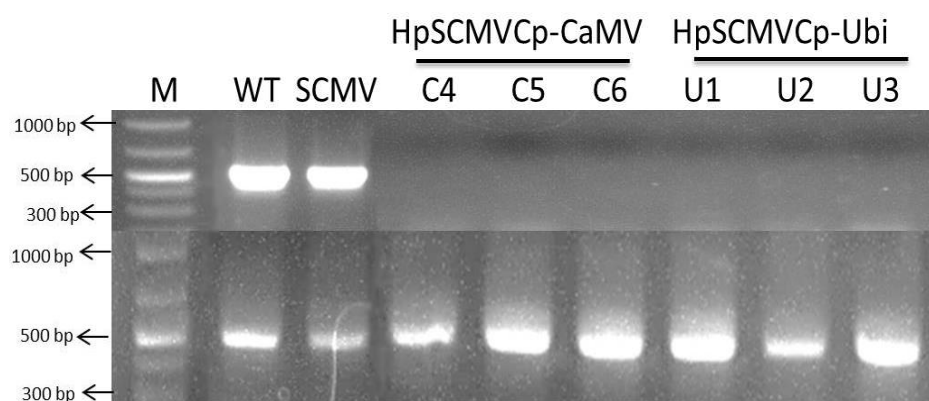
Untuk memastikan tingkat resistensi pada tanaman transgenik lines SCMVCp-CaMV dan SCMVCp-Ubi dilakukan analisa RT-PCR untuk deteksi SCMV

sesudah inokulasi SCMV. Analisa RT-PCR menggunakan pasangan F3/R3 menunjukkan adanya pita DNA Nib-Cp pada tanaman WT dan tebu PS881 terinfeksi SCMV, tetapi tidak ada pita DNA pada tanaman transgenik SCMVCp-Ubi dan SCMVCp-CaMV. DNA Nib-Cp merupakan fragmen DNA yang teramplifikasi dari DNA Nib sampai dengan DNA Cp. Analisa RT-PCR dengan pasangan primer F2-R2 menunjukkan adanya pita DNA Actin pada semua tanaman tebu (Gambar 5). Primer Actin digunakan sebagai kontrol analisa untuk menyamakan konsentrasi total RNA sampel yang digunakan untuk analisa adalah sama.



Gambar 4. Perbandingan persentase tebu transgenik rentan dan resisten yang dihitung berdasarkan analisis pengamatan gejala mosaik. Sebelah kiri adalah tebu transgenik HpSCMVCP-CaMV dan sebelah kanan adalah tebu transgenik HpSCMVCP-Ubi. WT adalah tebu control non-transgenik dan C1, C2, C3, U1, U2, U3 adalah lines dari tebu transgenik.

Figure 4. Comparison of resistances percentage that were calculated based on the observation of the symptoms. The Left and the right panels are HpSCMVCP-CaMV and HpSCMVCP-Ubi transgenic sugarcane, respectively. WT is the control non-transgenic sugarcane, and C1, C2, C3, U1, U2, U3 are transgenic sugarcane lines.



Gambar 5. Deteksi SCMV dengan analisa RT-PCR pada daun tanaman WT (wildtype) dan tanaman tebu transgenik HpSCMVCp-CaMV dan HpSCMVCp-Ubi. Analisa RT-PCR dilakukan menggunakan pasangan primer F3/R3 untuk deteksi fragmen DNA Nib-Cp (atas) dan primer F2/R3 untuk deteksi DNA Actin. M, marker DNA, SCMV sample daun tanaman tebu PS881 (kontrol positif) dan C4 s/d U3 adalah lines tebu transgenic.

Figure 5. Detection of SCMV using RT-PCR in leaves of wildtype (WT) and HpSCMVCp-CaMV and HpSCMVCp-Ubi transgenic sugarcane. The RT-PCR was conducted using primer F3/R3 to amplify DNA fragments of Nib-Cp (upper) and primer F2/R2 to amplify Actin DNA. Actin. M, marker DNA, SCMV was PS881 sugarcane and dan C4 s/d U3 were transgenic sugarcane lines.

DNA Nib-Cp merupakan fragmen DNA gabungan dari DNA Nib dan Cp pada genom SCMV. Fragmen DNA Nib-Cp tersebut dapat diamplifikasi dengan PCR menggunakan pasangan primer F3-R3 dari tanaman tebu yang terinfeksi SCMV. Oleh karena itu, munculnya fragmen DNA tersebut menunjukkan adanya SCMV karena fragmen Nib-Cp yang teramplifikasi merupakan gen dari pathogen SCMV. Analisis RT-PCR ini menunjukkan hasil tanaman tebu WT dan PS881 yang tidak tahan infeksi SCMV terdapat amplifikasi dari fragmen DNA virus Nib-Cp dengan ukuran 483 bp. Sedangkan pada tebu transgenik yang tahan terhadap serangan SCMV tidak ada materi RNA virus yang terdeteksi (Gambar 5).

KESIMPULAN

Eksresi konstruk gen HpSCMVCp pada tebu transgenik berbasis metode RNAi dapat menyebabkan tebu transgenik

menjadi resisten terhadap infeksi virus SCMV dan memiliki materi genetik yang stabil (diturunkan) pada setiap batang nodus pada tanaman generasi berikutnya. Penggunaan Ubi-promoter lebih efektif dalam membantu mengekspresikan gen HpSCMVCp pada tanaman tebu transgenik dibandingkan CaMV-promoter.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H. S., Nurmalasari, Wahyudi, A. H. S., Sholeh, A., Anugrah, C., Iriyanto, F. E. S., Darmanto, W., & Sugiharto, B. (2017). Detection and response of sugarcane against the infection of Sugarcane mosaic virus (SCMV) in Indonesia. *Agronomy*.
- Akbar M, A., Faridah, E., Indrioko, S., & Herawan, T. (2017). Induksi Tunas, Multiplikasi Dan Perakaran *Gyrinops versteegii* (Gilg.) Domke Secara In Vitro. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 11(1), 1–13.

- Apriasti, R., Widyaningrum, S., Hidayati, W. N., Sawitri, W. D., Darsono, N., Hase, T., & Sugiharto, B. (2018). Full sequence of the coat protein gene is required for the induction of pathogen-derived resistance against sugarcane mosaic virus in transgenic sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 2749–2758.
- Burguán, J. (2006). Virus induced RNA silencing and suppression: defence and counter defence. *Journal of Plant Pathology*, 88(3), 233–244.
- Dai, S., Zheng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R. N., & Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by Agrobacterium-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7, 25–33.
- Dewi, I. S., Somantri, I. H., Damayanti, D., Apriana, A., & Santoso, T. J. (2002). Evaluasi Tanaman Padi Transgenik Balitbio terhadap Hama Penggerek Batang. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan Dan Bioteknologi Tanaman*, 141–150.
- Dietzgen, R. G., & Mitter, N. (2006). Transgenic gene silencing strategies for virus control. *Australasian Plant Pathology*, 35(6), 605.
- Holkar, S. K., Kumar, A., Meena, M. R., & Lai, R. J. (2017). Detection and partial molecular characterization of sugarcane mosaic virus infecting sugarcane genotypes. *Journal of Environmental Biology*, 38(3), 409–417.
- Liu, D., Oard, S. V., & Oard, J. H. (2003). High transgene expression levels in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) driven by the rice ubiquitin promoter RUBQ2. *Plant Science*, 165(4), 743–750.
- Pamungkas, F. T., Darmanti, S., & Raharjo, B. (2009). Pengaruh Konsentrasi dan Lama Perendaman dalam Supernatan Kultur *Bacillus* sp.2 DUCC -BR-K1.3 terhadap Pertumbuhan Stek Horisontal Batang Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Jurnal Sains & Matematika*, 17(3), 131–140.
- Pandawani, N. P., Hanum, F., & Ariati, E. P. (2018). Kejadian Penyakit Mosaik dan Varietas Tahan Cucumber Mosaic Virus (CMV) Penyebab Penyakit Mosaik pada Tanaman Mentimun. *Agrimeta*, 8(15), 2088–2521.
- Putra, L. K., Kristini, A., Achadian, E. M., & Damayanti, T. A. (2014). Sugarcane streak mosaic virus in Indonesia: Distribution, Characterisation, Yield Losses and Management Approaches. *Sugar Tech*, 16, 392–399.
- Sholeh, A., Sugiharto, B., & Susilo Add, H. (2019). Monitoring Sugarcane mosaic virus (SCMV) on Recent Sugarcane Varieties in East Java, Indonesia. *Journal of Applied Sciences*, 19(7), 647–653.
- Widyaningrum, S., Pujiasih, D. R., Sholeha, W., Harmoko, R., & Sugiharto, B. (2021). Induction of resistance to sugarcane mosaic virus by RNA interference targeting coat protein gene silencing in transgenic sugarcane. *Molecular Biology Reports*, 48, 3047–3054.
- Yao, W., Ruan, M., Qin, L., Yang, C., Chen, R., Chen, B., & Zhang, M. (2017). Field performance of transgenic sugarcane lines resistant to sugarcane mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, 8(104), 1–9.

Zhu, M., Chen, Y., Ding, X. S., Webb, S. L., Zhou, T., Nelson, R. S., & Fan, Z. (2014). Maize Elongin C interacts with the viral genome-linked protein, VPg, of Sugarcane mosaic virus and facilitates virus infection. *New Phytologist*, 203(4), 1291–1304.