

Deteksi Cepat Carnation mottle virus pada Tanaman Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.)

[Rapid Detection of Carnation mottle virus on Carnation Plant (*Dianthus caryophyllus* L.)]

Erniawati Diningsih¹⁾, Gede Suastika²⁾, Tri Asmira Damayanti²⁾, dan Slamet Susanto³⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang-Segunung, Pacet - Cianjur, Jawa Barat, Indonesia 43253

²⁾Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jln. Kamper, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

³⁾Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jln. Meranti, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

E-mail: erniawati.diningsih@yahoo.com, diningsiherniawati@gmail.com

Diterima: 21 Desember 2015; direvisi: 3 Desember 2016; disetujui: 21 Desember 2016

ABSTRAK. *Carnation mottle virus* (CarMV) merupakan virus penting pada tanaman anyelir di dunia, termasuk di Indonesia. Deteksi virus yang mudah dan cepat, diperlukan untuk memantau tanaman induk anyelir bebas virus. Tujuan penelitian adalah mengevaluasi tiga metode preparasi RNA total yang mudah dan cepat dari tanaman anyelir sebagai *template one step RT-PCR*. Sumber RNA total berasal dari daun dan batang anyelir yang terinfeksi CarMV. Metode yang dievaluasi, yaitu *simple direct method* (SDT), *simple extraction method* (SEM), dan kit komersial sebagai banding. Optimasi dilakukan terhadap konsentrasi akhir primer (0,4 – 1,0 µM) dan MgCl₂ (1,5 dan 2,0 mM). Metode SDT dan SEM berhasil mendapat RNA total dari sampel daun maupun batang. Hasil yang didapat dengan metode SDT dan SEM sebanding dengan kit komersial. *One step RT-PCR* RNA total yang digabungkan dengan metode SDT dan SEM menghasilkan intensitas DNA yang sebanding dengan kit komersial. RNA total dari daun sebagai sumber templat *one step RT-PCR* lebih baik dibandingkan batang. Preparasi RNA total dengan metode SDT dan SEM merupakan metode cepat, mudah, dan murah dalam menyediakan templat *one step RT-PCR*. Konsentrasi primer 0,4 µM dan MgCl₂ 2 mM merupakan konsentrasi optimum dan mendapatkan hasil amplifikasi terbaik.

Kata kunci: Carmovirus; Simple extraction method (SEM); Simple direct tube (SDT); One step RT-PCR

ABSTRACT. *Carnation mottle virus* (CarMV) is an important virus on carnation plants in the world, including in Indonesia. A rapid and easy virus detection is necessary to monitor the source of virus free carnation mother plant. The aim of the research was to evaluate three methods of rapid and easy total RNA preparation from carnation plants as template of *one step RT-PCR*. The total RNA source is from the CarMV infected leaf and stem of carnations. The evaluated method namely *simple direct method* (SDT), *simple extraction method* (SEM), and commercial kit as comparison. Optimization was performed to a final concentration of premiere (0.4 – 1.0 µM) and MgCl₂ (1.5 and 2.0 mM). SDT and SEM method successfully obtained a total RNA from both leaves and stems samples. The obtained success by the SDT and SEM methods were comparable with these of commercial kit. One step RT-PCR of total RNA combined with SDT and SEM methods produced DNA intensity comparable with commercial kits. Total RNA from leaves known to be the best source of one step RT-PCR template compared to these from stem. Total RNA preparation by SDT and SEM method is a method of quick, easy, and inexpensive to provide a template one step RT-PCR. Premiere and MgCl₂ concentration of 0.4 µM and 2 mM, respectively were optimum concentration and produced best amplification result.

Keywords: Carmovirus; Simple extraction method (SEM); Simple direct tube (SDT); One step RT-PCR

Carnation mottle virus (CarMV; Carmovirus) merupakan virus penting pada tanaman anyelir di dunia, termasuk di Indonesia (Alexandre *et al.* 2015, Lisa 1995, atau Lomoel *et al.* 1983, Sing *et al.* 2005). Infeksi virus pada tanaman anyelir dapat menyebabkan kehilangan hasil dan penurunan kualitas bunga secara signifikan (Mangal *et al.* 2004). Di Jawa Barat, dari 403 sampel anyelir yang dikumpulkan dari lima lokasi pertanaman anyelir, 336 sampel (83%) ditemukan terinfeksi CarMV (Diningsih *et al.* 2015).

Deteksi serologi dengan ELISA dilakukan untuk mengetahui keberadaan virus dalam sampel dengan jumlah banyak. Namun, ELISA memiliki keterbatasan tidak dapat mendeteksi virus pada konsentrasi yang sangat rendah di dalam jaringan tanaman (Sharma *et al.* 2007). Berbeda dengan RT-PCR merupakan metode

deteksi yang lebih sensitif dibandingkan dengan ELISA karena mampu mengetahui keberadaan virus dalam konsentrasi rendah (Sharma *et al.* 2007). Deteksi virus dengan PCR/RT-PCR membutuhkan asam nukleat sebagai templat yang diekstraksi dari jaringan tanaman.

Ekstraksi RNA total merupakan tahap yang sangat kritis dalam prosedur deteksi virus dengan RT-PCR. Pada beberapa metode yang sudah dikembangkan, ekstraksi RNA total membutuhkan tahapan yang cukup panjang dan rumit, juga menggunakan berbagai bahan kimia yang berbahaya, seperti phenol dan chloroform. Tahapan yang panjang dalam proses ekstraksi seringkali menyebabkan terjadinya kontaminasi antar sampel sehingga hasil yang diperoleh tidak sesuai dengan yang diharapkan (Suehiro *et al.* 2005). Dengan demikian, perlu dikembangkan metode ekstraksi

RNA total yang lebih sederhana, murah, dan tidak menggunakan berbagai bahan berbahaya.

Ekstraksi RNA total yang sederhana dengan metode *simple direct tube* (SDT) dilaporkan berhasil mendapatkan RNA total beberapa spesies virus dari beberapa jenis tanaman yang berbeda seperti *Turnip mosaic potyvirus* (TuMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), dan *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) pada tanaman *Nicotiana rustica* (Suehiro *et al.* 2005), *Chrysanthemum virus B* (CVB) pada tanaman krisan dan *Sugarcane streak mosaic virus* SCSMV pada tanaman tebu (Damayanti & Putra 2012, Temaja *et al.* 2012), sedangkan metode *simple extraction method* (SEM) berhasil menyediakan DNA total *African cassava mosaic virus* (ACMV) dan *East african cassava mosaic cameroon virus* (EACMCV) dari daun singkong (Alabi *et al.* 2008), serta *Chrysanthemum virus B* (CVB) pada tanaman krisan (Setiyawati 2012).

Pada RT-PCR, proses sintesis cDNA juga merupakan tahapan yang penting. *One step* RT-PCR merupakan tahapan sintesis dan multiplikasi cDNA yang cepat karena dikerjakan dalam satu tahap. Proses yang cepat ini dapat mengurangi risiko terjadinya kontaminasi, karena transfer antartabung dapat dihindari seperti yang dilakukan pada proses RT-PCR yang dikerjakan dalam dua tahap (*two step* RT-PCR) (Wacker & Godard 2005).

Pada program distribusi benih tanaman yang bebas virus, metode deteksi dini yang cepat merupakan hal yang sangat penting dilakukan terhadap benih yang dihasilkan sebelum sampai ke petani pengguna atau untuk monitoring kesehatan tanaman induk (*mother plant*). Berdasarkan hal tersebut maka penelitian ini bertujuan mengevaluasi tiga metode ekstraksi RNA total untuk templat *one step* RT-PCR *Carnation mottle virus* (CarMV) dari tanaman anyelir. Hipotesis penelitian ini adalah *simple extraction method* (SEM) dan *simple direct tube* (SDT) merupakan metode sederhana dan cepat untuk mendapatkan RNA total dari tanaman anyelir terinfeksi virus guna mendukung metode deteksi cepat CarMV pada tanaman anyelir melalui *one step* RT-PCR.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dari bulan Juni 2014 sampai dengan April 2015 di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (IPB). Tanaman anyelir terinfeksi CarMV diambil dari kebun anyelir

di daerah Cipanas, Cianjur, Jawa Barat (1.100 m dpl.). Penyimpanan sampel daun dan batang dilakukan pada suhu -80°C.

Ekstraksi RNA Total

Tiga cara metode ekstraksi RNA total yang dievaluasi kemampuannya dalam menyediakan template cDNA, yaitu (1) metode *simple direct tube* (SDT) (Suehiro *et al.* 2005), (2) *simple extraction method* (SEM) (Alabi *et al.* 2008), dan (3) kit pembanding kit komersial *genejet plant RNA purification mini kit* (Thermoscientific, Lithuania).

Simple Direct Tube (SDT). Tiap 100 mg jaringan daun/seludang tanaman anyelir digerus dalam mortar dengan pistil menggunakan nitrogen cair. Setelah tanaman menjadi serbuk, ditambahkan 500 µl PBST (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,15 g/l, KCl 0,2 g/l, Tween-20 500 µl/l) steril ke dalam mortar dan diaduk hingga serbuk tercampur dengan larutan penyanga. Sap tanaman yang dihasilkan diambil sebanyak 50 µl dengan tip yang ujungnya sudah dipotong untuk memudahkan pengambilan sap, dan sap dimasukkan ke dalam tabung PCR (0,2 ml) supaya partikel virus teradsorpsi ke dinding tabung. Tabung diinkubasikan pada suhu ruang selama 20 menit, kemudian sap dibuang dengan menggunakan tip yang sudah terpotong ujungnya agar jaringan tanaman yang terdapat dalam sap dapat terambil. Selanjutnya, tabung PCR dicuci sebanyak 3 – 4 kali dengan 100 µl PBST hingga tabung terlihat bersih dan tidak ada sisa tanaman tersisa. Sebanyak 30 µl DEPC (diethylpyrocarbonate) water yang mengandung 15 unit RNase inhibitor (40 U/µl, Thermoscientific) ditambahkan ke dalam tabung yang sudah bersih tersebut dan diinkubasikan selama 1 menit pada suhu 95°C, dan segera didinginkan dalam es minimal 5 menit. RNA total yang diperoleh bisa langsung digunakan untuk RT-PCR atau disimpan dalam freezer -80°C sampai siap digunakan (Suehiro *et al.* 2005).

Simple Extraction Method (SEM). Sebanyak 100 mg jaringan tanaman digerus dengan nitrogen cair dalam mortar hingga menjadi serbuk. Kemudian ditambahkan 2 ml bufer GEB (Na₂CO₃ 1,5 g/l, NaHCO₃ 2,93 g/l, (pH 9,6), 2% PVP-40, 0,2% Bovine serum albumin, 0,05% Tween-20) ke dalam mortar dan diaduk hingga terbentuk sap. Sebanyak 2 µl sap diambil dan dimasukkan ke dalam tabung mikro 0,5 ml yang berisi 25 µl bufer GES (0.1 M glycine pH 9,0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, dan 1% mercaptoethanol (ditambahkan sesaat sebelum bufer GES digunakan)), kemudian dicampur rata dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 95°C. Tabung segera didinginkan dalam es selama 5 menit dan

Tabel 1. Komposisi reagen untuk reaksi one step RT-PCR (Reagent composition for the reaction of one step RT-PCR)

Premix one step standar (Standard premix of one step)	Volume (Volume), μl	Konsentrasi akhir (Final concentration)
Dream taq PCR master mix 2x (Thermoscientific)	12,5	1x
Primer forward 10 μM	1,0	0,4 μM^*
Primer reverse 10 μM	1,0	0,4 μM^*
DTT 50 mM	2,0	4 mM
Revert aid reverse (200 U/ μl) (Thermoscientific)	0,05	0,4 U
Ribolock RNase inhibitor (40 U/ μl) (Thermoscientific)	0,1	0,16 U
25 mM MgCl ₂	0,5	0,5 mM*
RNA total	2,0	
Air bebas nuclease	5,85	
Total	25	

*Komponen PCR yang dioptimasi. [MgCl₂] final 1,5 mM dan 2,0 mM [Primer] final 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 μM

langsung digunakan untuk RT-PCR atau disimpan dalam suhu -80°C sampai digunakan (Alabi *et al.* 2008).

RNA Total dengan Kit Komersial. Sebanyak 100 mg jaringan tanaman digerus dalam mortar dengan pistil menggunakan nitrogen cair hingga menjadi serbuk. Selanjutnya proses ekstraksi dilakukan sesuai protokol yang direkomendasikan produsen kit (Thermoscientific).

Analisis RNA Total

Kualitas, kemurnian, dan konsentrasi RNA total yang diperoleh dari masing-masing metode ekstraksi diukur dengan spektrofotometer nanodrop (Wilmington, USA). Kemurnian RNA total dari protein diukur nilai absorbansinya (A) pada panjang gelombang (λ) 260 nm dan 280 nm dan kemurnian dari bahan-bahan pengotor (phenol, karbohidrat, dan kontaminan lain) diukur pada panjang gelombang 260 nm dan 230 nm. Kemurnian RNA total dari protein ditentukan berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 280 nm (A260/A280), sedangkan kemurnian RNA total dari bahan pengotor ditentukan berdasarkan rasio nilai absorbansi pada panjang gelombang 260 dan 230 nm (A260/A230). RNA total dikatakan murni dari protein jika nilai rasio A260/A280 adalah 2,0, dan murni dari bahan pengotor jika nilai rasio A260/A230 adalah 2,0 – 2,2 (http://www.bio.davidson.edu/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf) [diunduh tgl 22 September 2015]. Konsentrasi RNA ditentukan berdasarkan ketentuan sebagai berikut: nilai absorbansi 1 yang terukur pada panjang gelombang 260 nm (A260 = 1) menunjukkan konsentrasi RNA dalam sampel yang diukur adalah 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Held 2004).

One Step RT-PCR

Sintesis cDNA dan multiplikasi gen CP CarMV dilakukan dalam satu tahap yang dinamakan *one step* RT-PCR. Amplifikasi gen CP CarMV dilakukan menggunakan pasangan primer *forward* BC57 (5' GATCGCGATGAATCCC ACTGTGC 3') dan primer *reverse* BC58 (5' TCACATCCTATAACAACCA TTG 3'). *One step* RT-PCR dilakukan pada volume 25 μl campuran yang terdiri atas reaktan yang ditabulasikan dalam Tabel 1. Proses *one step* RT-PCR dilakukan pada suhu *reverse transcriptase* 42°C selama 60 menit, predenaturasi 94°C selama 3 menit, 35 siklus pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 50°C selama 1 menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama 70 detik (Raikhy *et al.* 2006).

Visualisasi DNA CP CarMV

Visualisasi fragmen DNA gen CP CarMV dilakukan dengan separasi DNA pada 1% agarose dalam TBE 0,5x (89 mM Tris-HCl, 89 mM Boric acid, 2,5 M EDTA, pH 8,3). Elektroforesis dilakukan pada tegangan 50 volt selama 45 menit, kemudian direndam dalam ethidium bromida (EtBr). Penanda DNA yang digunakan adalah Tridye 1 kb DNA ladder (Thermoscientific).

Analisis Data

Pengujian dilakukan dengan tiga ulangan. Data kemurnian RNA dianalisis menggunakan ANOVA dan diuji lebih lanjut menggunakan uji Tukey pada taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kemurnian dan Kualitas RNA

Kemurnian dari Protein. Kemurnian RNA total yang diperoleh melalui metode SDT dan SEM lebih

rendah dibandingkan ekstraksi dengan kit. Kemurnian RNA total yang diperoleh melalui kit adalah 2,02 dari sampel daun dan 2,04 dari sampel batang (Tabel 2). Metode SDT menghasilkan RNA total dengan kemurnian rerata 1,054 dari sampel daun dan 1,248 dari sampel batang, sedangkan metode SEM menghasilkan RNA total dengan kemurnian rerata 0,922 dari daun dan 0,83 dari batang. Kemurnian RNA total dari protein yang rendah pada metode SDT dan SEM ($A_{260}/A_{280} < 2,0$) menunjukkan bahwa dalam larutan RNA total yang diperoleh dengan metode SDT dan SEM masih mengandung protein-protein tanaman yang dapat terabsorb pada panjang gelombang 280 nm. Namun, di antara metode SDT dan SEM, metode SDT masih mampu menghasilkan kemurnian RNA total dari protein yang lebih tinggi dibanding kemurnian RNA total yang dihasilkan SEM.

Kemurnian dari Bahan Pengotor. Kemurnian dari bahan-bahan pengotor (A_{260}/A_{30}) berbeda antara RNA total yang disediakan dengan metode SDT, SEM, dan kit. Ekstraksi dengan kit menghasilkan RNA total dengan rerata kemurnian yang tinggi dari bahan kontaminan, yaitu 2,06 dari sampel daun dan 1,81 dari sampel batang. Metode SDT menghasilkan RNA total dengan rataan kemurnian 0,25 dari sampel daun, dan 0,20 dari sampel batang, sedangkan metode SEM menghasilkan RNA total dengan rerata kemurnian 0,72 dari sampel daun dan 1,25 dari sampel batang (Tabel 2). Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa walaupun lebih rendah dari kit, metode SEM masih mampu menghasilkan RNA total yang kemurniannya lebih tinggi dibandingkan metode

SDT. Hal ini menunjukkan bahwa dalam larutan RNA total yang diperoleh dengan metode SEM menghasilkan kontaminan yang terserap pada panjang gelombang 230 nm lebih rendah dibanding kontaminan yang diperoleh dari metode SDT.

Konsentrasi RNA. Konsentrasi RNA total yang diperoleh dari ketiga metode ekstraksi menunjukkan perbedaan. Metode ekstraksi dengan SEM mampu menghasilkan konsentrasi RNA total yang paling tinggi dibandingkan metode SDT dan kit walaupun kemurniannya dari protein maupun kontaminan masih rendah. Konsentrasi RNA total yang paling rendah ditemukan pada hasil ekstraksi dengan metode SDT. Rerata konsentrasi RNA total yang diperoleh melalui metode SEM, kit, dan SDT dari sampel daun berturut-turut adalah 582,76; 50,5; dan 3,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, sedangkan dari sampel batang berturut-turut 417,12; 29,72, dan 5,64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Tabel 2). Tingginya konsentrasi RNA total yang diperoleh melalui ekstraksi dengan metode SEM berbanding terbalik dengan kemurniannya karena tingginya protein dan senyawa kontaminan lainnya dalam larutan RNA yang dihasilkan. Sebaliknya dengan RNA total yang diperoleh dengan kit, konsentrasi rendah tetapi kemurniannya tinggi. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa konsentrasi RNA total yang diperoleh dari sampel daun lebih tinggi dibandingkan sampel batang. Hal ini diduga dalam jaringan batang terdapat komponen kimiawi yang dapat menghambat pelepasan RNA ketika proses ekstraksi dilakukan. Hasil penelitian ini selaras dengan hasil penelitian Adiputra *et al.* (2012) yang menunjukkan bahwa RNA total yang diperoleh kit konsentrasi rendah, tetapi kemurniannya tinggi.

Tabel 2. Rerata nilai kemurnian dan konsentrasi RNA hasil pengukuran dengan nano drop (Mean value of RNA purity and concentration measurement results with nano drop)

Metode ekstraksi RNA (RNA extraction method)	Nilai absorbansi nano drop (Absorbance values of nano drop)		Kemurnian RNA (RNA purity)		Konsentrasi RNA (RNA concentration) $\mu\text{g}/\text{ml}$
	$\lambda 260 \text{ nm}$	$\lambda 280 \text{ nm}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}	
SDT					
Daun (Leaf)	0,078	0,074	1,054ab*	0,250a	3,12
Batang (Stem)	0,141	0,113	1,248ab	0,205a	5,64
SEM					
Daun (Leaf)	14,569	15,80	0,922a	0,72ab	582,76
Batang (Stem)	10,428	12,337	0,83a	1,25ab	417,12
Kit komersial (Commercial kit)					
Daun (Leaf)	1,2625	0,6255	2,02c	2,06b	50,5
Batang (Stem)	0,743	0,3640	2,04c	1,81b	29,72

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada lajur yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji Tukey pada taraf 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on Tukey test at $p=0.05$)

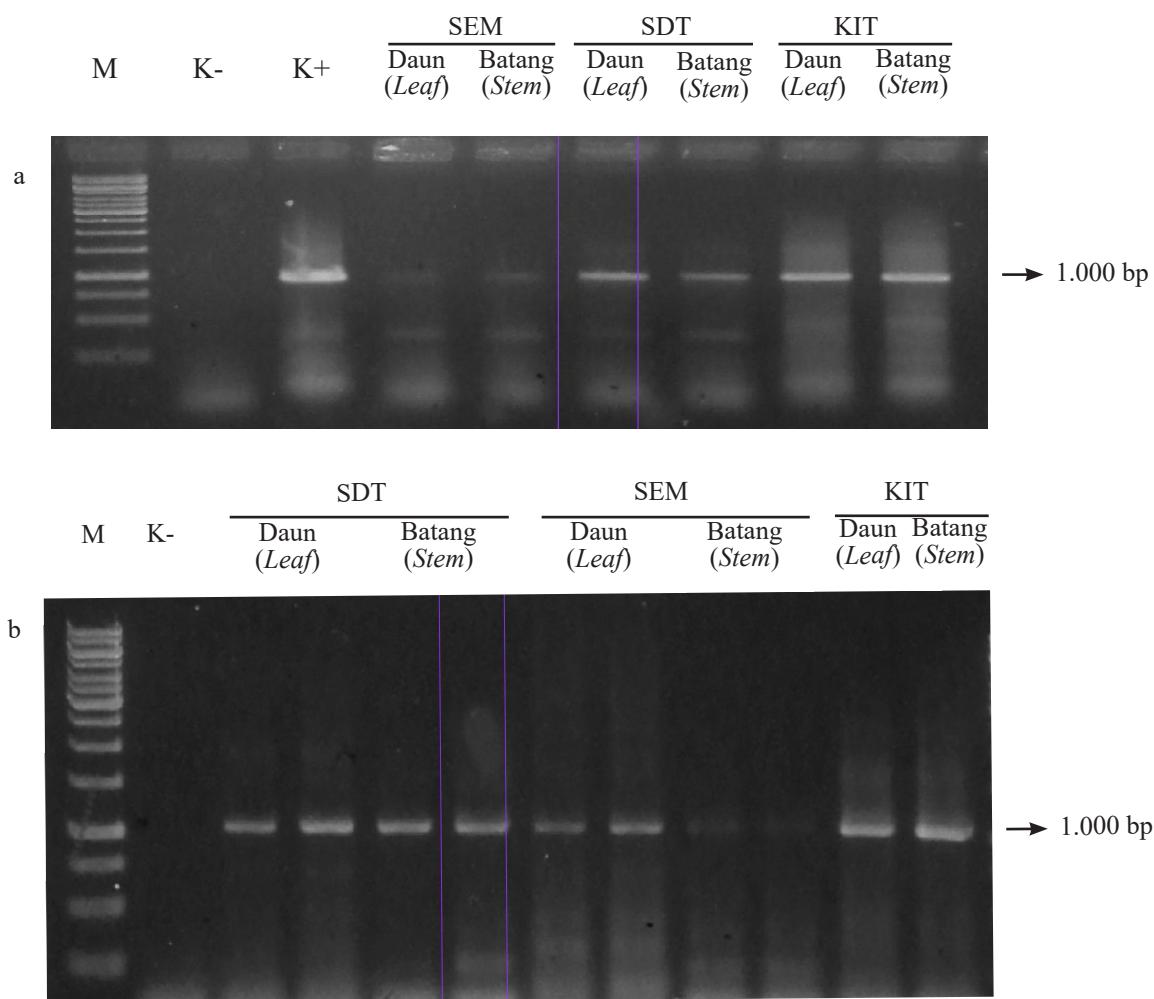
Amplifikasi DNA dengan One Step RT-PCR.

Amplifikasi DNA dengan *one step* RT-PCR dengan konsentrasi primer 0,4 μ M dan MgCl₂ 2,0 mM (standar) menggunakan RNA total yang diekstraksi dengan kit menunjukkan DNA teramplifikasi paling baik dibandingkan *template* RNA total dengan SDT dan SEM dari sampel daun maupun batang (Gambar 1a). *Template* yang berasal dari daun dan batang yang diperoleh melalui ekstraksi dengan metode SEM tidak teramplifikasi dengan baik, sedangkan *template* yang diapatkan dari metode SDT teramplifikasi cukup baik walaupun tidak sebaik kit.

One step RT-PCR dengan konsentrasi primer yang lebih tinggi (0,8 μ M) dan MgCl₂ yang sama (2,0 mM), *template* yang diekstraksi dengan SDT teramplifikasi lebih baik dari pengujian sebelumnya (konsentrasi primer 0,4 μ M) dari sampel daun maupun batang (Gambar 1b). *Template* yang diekstraksi dengan kit

teramplifikasi paling baik seperti pada pengujian pertama (konsentrasi primer 0,4 μ M), sedangkan RNA total yang berasal dari batang yang diekstraksi dengan SEM tetap tidak teramplifikasi dengan baik. Berdasarkan hasil tersebut, optimasi konsentrasi primer dan MgCl₂ dilakukan terutama untuk RNA total yang diekstraksi dari sampel batang dari masing-masing metode ekstraksi.

Berdasarkan hasil optimasi konsentrasi akhir primer dan MgCl₂ dengan *template* berasal dari sampel batang diketahui bahwa *template* dari ketiga ekstraksi dapat teramplifikasi menghasilkan pola pita DNA dengan intensitas yang berbeda-beda (Gambar 2). Dari optimasi konsentrasi MgCl₂ diketahui bahwa multiplikasi metode cDNA gen CP CarMV dari sampel batang dengan *one step* RT-PCR menunjukkan hasil yang lebih baik pada konsentrasi MgCl₂ 2,0 mM dibandingkan pada konsentrasi MgCl₂ 1,5 mM



Gambar 1. Amplifikasi DNA gen CP CarMV dengan konsentrasi akhir primer 0,4 μ M (a) dan 0,8 μ M (b) dan MgCl₂ 2,0 mM. M= marker DNA 1 kb (Thermoscientific), K-= kontrol negatif, K+= kontrol positif (*DNA amplification of CarMV CP gene with final concentration 0,4 μ M (a) and 0,8 μ M (b) of primer, and 2.0 mM of MgCl₂, M.=Marker DNA 1 kb (Thermoscientific), K-=negative control, K+=positive control*)

untuk ketiga metode ekstraksi pada umumnya. Pada konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 mM, intensitas pola pita DNA yang jelas dan tebal hanya ditunjukkan pada sampel yang diekstraksi dengan metode SEM dan KIT, sedangkan SDT menghasilkan intensitas yang lebih rendah (pita DNA lebih tipis). Berdasarkan hasil optimasi tersebut dapat diketahui bahwa RNA total yang diekstraksi dari batang dengan menggunakan metode SEM dan Kit menunjukkan konsistensi pola pita DNA yang cukup baik pada konsentrasi $MgCl_2$ 2,0 dan 1,5 mM, sedangkan dengan metode SDT pola pita DNA yang lebih baik pada konsentrasi $MgCl_2$ 2,0 mM.

Pada optimasi konsentrasi primer, DNA yang didapatkan dari templat yang diekstraksi menggunakan kit menunjukkan hasil yang konsisten pada tiap konsentrasi primer atau $MgCl_2$ yang digunakan. Semua konsentrasi primer yang digunakan menghasilkan pita DNA yang sama intensitasnya pada kedua konsentrasi $MgCl_2$ tersebut. Pada metode SEM, semua konsentrasi primer yang digunakan menghasilkan pola pita DNA yang konsisten (sama jelas dan tebal) pada konsentrasi $MgCl_2$ 2,0 mM, sedangkan pada konsentrasi $MgCl_2$ 1,5 mM, konsentrasi akhir primer 1 μM menunjukkan hasil yang kurang baik, pita DNA tampak lebih tipis dibandingkan lainnya. Dengan metode SDT, konsistensi intensitas DNA ditunjukkan pada konsentrasi akhir primer 0,4 – 0,8 μM terutama pada konsentrasi $MgCl_2$ 2,0 mM. Pita DNA pada konsentrasi primer 1,0 μM lebih tipis dari yang lainnya pada kedua konsentrasi $MgCl_2$ yang

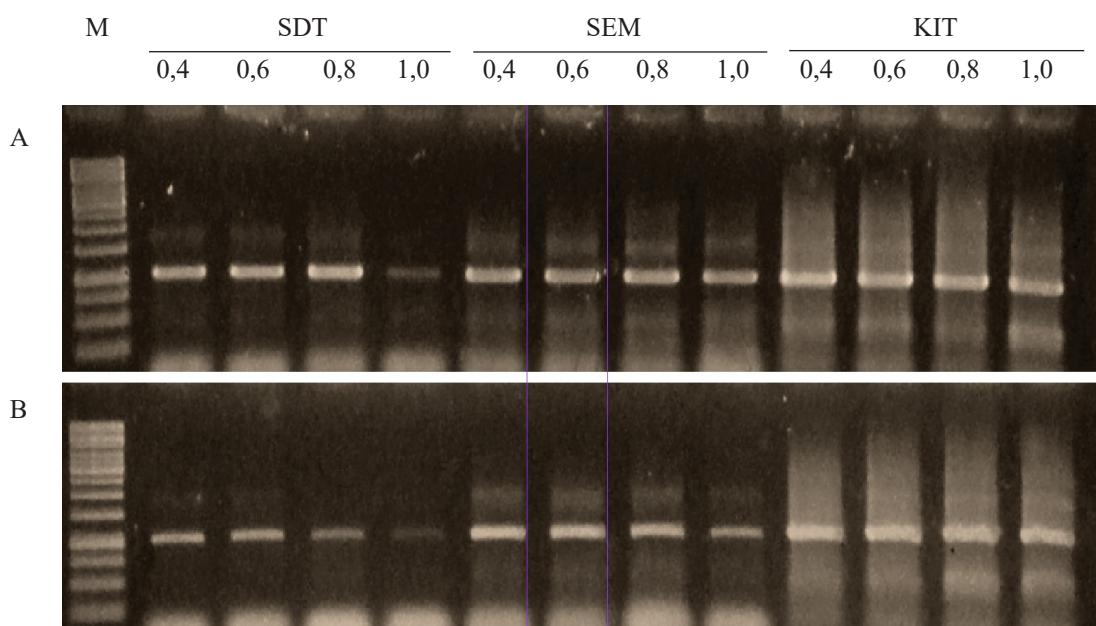
digunakan. Namun, pada metode SDT, konsentrasi primer 0,4–0,8 μM tersebut menunjukkan hasil terbaik jika menggunakan $MgCl_2$ pada konsentrasi 2,0 mM.

Berdasarkan pola pita DNA yang dihasilkan, SDT dan SEM dapat digunakan untuk mengekstraksi RNA total dari sampel daun maupun batang tanaman anyelir terinfeksi. Konsentrasi $MgCl_2$ dan primer yang optimum untuk mendapatkan pola pita DNA yang jelas dan tebal dari sampel tanaman anyelir terinfeksi berturut-turut adalah 2,0 mM (ada penambahan $MgCl_2$ dari luar selain dari yang hanya terkandung dalam *dream taq green PCR master mix*) dan 0,4 μM . Namun, untuk mendapatkan hasil terbaik ini, harus disertai dengan kehati-hatian yang cukup baik pada saat ekstraksi RNA total maupun pada saat preparasi bahan-bahan untuk sintesis dan multiplikasi cDNA.

Perbandingan Metode SDT, SEM, dan KIT Berdasarkan Waktu, Biaya, dan Proses Pengerjaan

Ketiga metode ekstraksi RNA total yang digunakan, yaitu SDT, SEM, dan kit komersial memiliki keunggulan dan kelemahan masing-masing dilihat dari komposisi bahan kimia dalam bufer yang digunakan, waktu pengerjaan, tahapan pengerjaan, dan biaya bahan (Tabel 3).

Berdasarkan komposisi bahan kimia dalam bufer yang digunakan, metode SDT dan SEM keduanya tidak menggunakan bahan kimia yang berbahaya seperti phenol maupun chloroform yang biasa digunakan pada metode ekstraksi RNA total yang lain, seperti pada



Gambar 2. Amplifikasi DNA gen CP CarMV dari sampel batang dengan konsentrasi akhir primer 0,4 μM , 0,6 μM , 0,8 μM , dan 1,0 μM (lines) dan $MgCl_2$ 2,0 mM (A) dan 1,5 mM (B) (*DNA amplification of CarMV CP gene from stem sample at 0.4 μM , 0.6 μM , 0.8 μM , and 1.0 μM final concentration of primer (lines) and 2.0 mM of $MgCl_2$*)

metode Wylie (Wylie *et al.* 1993). Namun, metode SDT sedikit lebih unggul dibandingkan SEM karena jumlah ataupun jenis bahan kimia yang digunakan pada metode SDT lebih sedikit dibandingkan SEM. Pada KIT, tidak diketahui komposisi dan jenis bahan kimia yang digunakan (Alabi *et al.* 2008, Suehiro *et al.* 2005).

Dari segi waktu dan tahapan pelaksanaan ekstraksi, metode SEM lebih unggul dibandingkan SDT maupun KIT. Dengan metode SEM, waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan RNA total sedikit lebih cepat dibandingkan metode SDT dan KIT. Waktu yang lebih cepat pada metode SEM disebabkan karena lama tahapan yang lebih sederhana dan singkat (hanya ekstraksi dan inkubasi) dibandingkan metode SDT ataupun KIT. Berdasarkan hasil penelitian, waktu yang dibutuhkan untuk mendapatkan RNA total tanaman dari satu sampel dengan metode SEM hanya membutuhkan waktu sekitar 20 menit, sedangkan SDT dan KIT berturut-turut 33 dan 35 menit. Waktu pelaksanaan ekstraksi antara metode SDT dan KIT adalah sebanding. Waktu yang lebih panjang pada metode SDT dan KIT disebabkan karena lama tahapan ekstraksi yang lebih banyak dan sedikit lebih rumit dibandingkan SEM. Pada metode SDT ada beberapa tahapan ekstraksi, seperti ekstraksi, inkubasi, dan pencucian tabung secara berulang. Demikian juga

pada metode ekstraksi menggunakan KIT memerlukan beberapa tahapan, yaitu beberapa kali sentrifugasi dan beberapa kali transfer sampel dari tabung ke tabung. Tahapan ekstraksi yang panjang tersebut dapat menimbulkan risiko terjadinya kontaminasi antarsampel.

Berdasarkan hasil analisis biaya bahan kimia secara kasar dari ketiga metode ekstraksi yang digunakan, metode SDT dan SEM jauh lebih murah dibandingkan metode ekstraksi dengan KIT. Penggunaan metode SDT dan SEM hanya membutuhkan biaya ekstraksi berturut-turut sekitar Rp1.410,00 dan Rp1.500,00 per sampel, sedangkan dengan KIT membutuhkan biaya Rp53.000,00 per sampel. Harga tersebut dihitung berdasarkan daftar harga bahan kimia tahun 2013 yang dikeluarkan oleh suatu perusahaan distributor bahan kimia di Indonesia. Namun, jika membandingkan antara metode SDT dan SEM, biaya yang harus dikeluarkan untuk setiap sampel uji, dengan metode SDT relatif lebih murah dibandingkan SEM.

One step RT-PCR merupakan salah satu teknik dalam RT-PCR. Teknik sintesis dan amplifikasi cDNA dengan *one step* RT-PCR dapat meminimalisasi terjadinya kontaminasi selama preparasi larutan RT-PCR karena preparasi larutan untuk RT dan PCR disediakan dalam satu tabung yang sama, tidak terjadi

Tabel 3. Perbandingan tiga metode ekstraksi RNA total berdasarkan komposisi bufer, waktu pelaksanaan, tingkat kerumitan, dan perkiraan biaya bahan tiap sampel (Comparison of three total RNA extraction method based on buffer composition, processing time, level of complexity, and estimate of material cost per sample)

Kriteria (Criteria)	Metode ekstraksi RNA (RNA extraction method)		
	SDT	SEM	KIT
Bahan kimia (Chemical material)	Bufer PBST: NaCl KH_2PO_4 Na_2HPO_4 Tween-20 DEPC RNase inhibitor	Bufer GEB: Na_2CO_3 NaHCO_3 PVP-40 Tween-20 Bufer GES: Glycine NaCl EDTA Triton X-100 2Mercaptoethanol	Bufer Lisis Bufer pencuci 1 Bufer pencuci 2 Bufer elusi
Waktu (Time)	33 menit	20 menit	35 menit
Tingkat kerumitan pelaksanaan (Level of complexity)	**	*	**
Biaya ekstraksi (Extraction cost)	Rp1.410,00/ sampel	Rp1.500,00/ sampel	Rp53.000,00/ sampel

*mudah, ** agak rumit. DEPC= Diethylpyrocarbonate, GEB= general extraction buffer, GES= glycineedtasalin

transfer antartabung (Li & Mock 2005). Selain itu, preparasi pereaksi RT-PCR lebih singkat dan tidak terlalu mahal untuk digunakan (Wacker & Godard 2005).

Ekstraksi RNA total dari jaringan tanaman merupakan tahap awal dan tahap yang kritis dalam prosedur RT-PCR (Li & Mock 2005). Keberhasilan dalam mengisolasi RNA total tanaman berpengaruh terhadap hasil amplifikasi dengan RT-PCR (Thomson & Dietzgen 1995). Ketidakberhasilan *one step* RT-PCR mengamplifikasi *template* yang berasal dari batang anyelir pada awal pengujian, terutama *template* yang diperoleh dengan metode SEM, kemungkinan disebabkan karena RNA total tidak berhasil diisolasi. Hal ini diduga karena adanya pengaruh dari komponen-komponen kimia sel dalam ekstrak kasar batang tanaman anyelir yang menjadi penghambat dalam pelepasan RNA pada metode tersebut. Menurut Damayanti & Putra (2012), tidak terdeteksinya virus pada batang beberapa tanaman disebabkan karena rendahnya konsentrasi virus pada jaringan tersebut.

Menurut Sánchez-navarro *et al.* (2007), CarMV tersebar secara merata dalam seluruh jaringan tanaman. Hal ini didukung oleh hasil penelitian yang menunjukkan bahwa metode SDT dan SEM berhasil mengekstraksi RNA total dari jaringan daun maupun batang tanaman anyelir yang terinfeksi CarMV. RNA CarMV berhasil dilepaskan dari partikel virus dengan suhu denaturasi 95°C selama 1 menit ketika ekstraksi menggunakan metode SDT dan 95°C selama 10 menit dengan metode SEM. Menurut Suehiro *et al.* (2005), suhu dan waktu denaturasi untuk virus yang berbeda ditemukan berbeda. Hasil penelitian ini berbeda dengan hasil penelitian Setiyawati (2012) yang menunjukkan bahwa hanya metode SEM yang berhasil mendapatkan RNA total yang berkualitas dalam pengujian RT-PCR terhadap *Chrysanthemum virus B* (CVB) dari tanaman krisan. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya perbedaan kandungan berbagai senyawa-senyawa kimia dalam jenis tanaman yang berbeda, teknik penggerjaan dari pelaku ekstraksi, dan kualitas bufer ekstraksi yang digunakan sehingga memengaruhi hasil ekstraksi.

Berbagai metode isolasi RNA telah banyak dikembangkan dari jaringan tanaman, tetapi metode tersebut memerlukan banyak tahapan, sentrifugasi yang berulang, dan adanya penggunaan bahan kimia yang berbahaya (Wylie *et al.* 1993). Ekstraksi dengan metode SDT dan SEM memiliki beberapa keunggulan. Kedua metode tersebut dapat meminimalisasi terjadinya kontaminasi karena tidak terjadi transfer sampel yang berulang-ulang ke tabung berikutnya (Suehiro *et al.* 2005), tidak menggunakan bahan kimia

berbahaya seperti phenol sehingga mengurangi tingkat bahaya pada pelaku ekstraksi, dapat menghasilkan pita DNA dengan intensitas yang baik, terutama jika ekstraksi dilakukan pada sampel daun, dan memiliki tingkat kerumitan yang lebih rendah pada proses ekstraksi dibandingkan dengan menggunakan KIT. Penggunaan metode SDT dan SEM dalam ekstraksi RNA total juga dapat mengurangi waktu inkubasi dan meniadakan penggunaan sentrifugasi (Suehiro *et al.* 2005, Alabi *et al.* 2008) seperti yang dilakukan pada proses ekstraksi dengan KIT. Menurut Alabi *et al.* (2008), SEM memiliki kelebihan lain dibanding SDT. Di samping untuk mengekstraksi RNA, SEM juga dapat digunakan untuk mengekstraksi DNA.

One step RT-PCR dengan *template* berasal dari ketiga metode ekstraksi yang dibandingkan menghasilkan pita DNA dengan konsistensi yang berbeda-beda. Keberhasilan sintesis cDNA sangat dipengaruhi oleh kemurnian *template* RNA dan integritas RNA (Wang *et al.* 2003). KIT menghasilkan pita DNA dengan konsistensi yang lebih baik dibanding SDT dan SEM. Kombinasi ekstraksi dengan KIT dan amplifikasi *template* dengan *one step* RT-PCR selalu menghasilkan pita DNA dengan intensitas yang tinggi pada setiap kali pengujian. Namun, tidak demikian halnya dengan *template* yang diekstraksi dengan SEM dan SDT. Kemurnian RNA yang rendah pada RNA total hasil ekstraksi dengan SEM dan SDT diduga menjadi penyebab rendahnya konsistensi pita DNA yang dihasilkan pada *one step* RT-PCR di samping konsentrasi primer, dan MgCl₂ yang digunakan. Dalam reaksi PCR, Mg²⁺ berperan sebagai pemandu bagi DNA polymerase dalam pemilihan nukleotida yang benar dalam proses sintesis DNA (Yang *et al.* 2004).

Untuk mendapatkan RNA total tanaman dengan kualitas dan kuantitas yang tinggi diperlukan bahan-bahan kimia tertentu dalam bufer ekstraksi yang dapat menghambat kerja enzim RNase (Claros & Canovas 1999). Bahan-bahan tersebut terkandung dalam ketiga metode ekstraksi yang dievaluasi dalam penelitian ini. Metode SDT menggunakan DEPC-air yang mengandung RNase inhibitor sebagai pelarut RNA yang berfungsi untuk mencegah degradasi RNA oleh RNase (Amanda & Cartealy 2015). SEM menggunakan 2-mercaptoethanol dalam bufer ekstraksi yang berfungsi untuk mengeliminasi ribonuklease (RNase) yang dilepaskan selama sel lisis. KIT komersial juga mengandung bahan-bahan pendegradasi RNase.

Untuk deteksi patogen secara rutin dan dalam jumlah sampel yang banyak diperlukan metode isolasi RNA yang cepat, sederhana, lebih aman terhadap

kesehatan, dan dengan biaya yang relatif lebih murah. Di antara ketiga metode tersebut, KIT komersial memang merupakan komponen yang dapat menjamin bahwa RNA yang diperoleh akan memiliki kualitas dan kuantitas yang baik. Namun, dengan menggunakan KIT, biaya ekstraksi tiap sampel jauh lebih mahal dibanding SDT maupun SEM.

KESIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa teknik *one step* RT-PCR menggunakan template RNA total yang didapatkan melalui metode SDT dan SEM yang sederhana, cepat, dan murah dapat mendeteksi CarMV pada tanaman anyelir. Metode SDT dan SEM mampu mengekstraksi RNA total tanaman baik dari sampel daun maupun batang tanaman anyelir terinfeksi CarMV. *One step* RT-PCR dengan konsentrasi MgCl₂ 2,0 mM dan konsentrasi akhir primer 0,4 μM mampu menghasilkan pita DNA gen CP CarMV dengan intensitas yang cukup baik dengan menggunakan template yang berasal dari hasil ekstraksi dengan metode SDT dan SEM baik dari sampel daun maupun batang tanaman anyelir.

Perlu menguji skala massal keefektifan metode ekstraksi RNA total untuk mengetahui konsistensi hasil ekstraksi RNA total dan kualitas RNA total yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

1. Adiputra, J, Hidayat, SH & Damayanti, TA 2012, ‘Evaluasi tiga metode preparasi RNA total untuk deteksi turnip mosaic potyvirus dari benih *Brassica rappa* dengan reverse transcription-polymerase chain reaction’, *J. Fitopatol. Indones.*, vol. 8, no. 2, hlm. 44-9.
2. Alabi, OJ, Kumar, PL & Naidu, RA 2008, ‘Multiplex PCR for the detection of *African cassava mosaic virus* and *East african cassava mosaic cameroon virus* in cassava’, *J. Virol. Methods*, vol. 154, no. 1-2, pp. 111-20.
3. Alexandre, MAV, Duarte, LML, Ramos, AF & Harakava, R 2015 ‘Identification and molecular characterization of *Carnation mottle virus* Brazilian isolates from carnation’, *Horticultura Brasileira* 33:257-260. doi:10.1590/S0102-053620150000200019.
4. Amanda, UD & Cartealy, IC 2015, ‘Isolasi RNA total dari mesokarp buah kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq. var. Tenera)’, *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.*, vol. 1, no. 2, pp. 171-6.
5. Cevik, B, Bakir, T & Koca, G 2010, ‘First report of *carnation mottle virus* in Turkey’, *Plant Pathol.*, vol. 59, pp. 394.
6. Claros, MG & Canovas, FM 1999, ‘RNA isolation from plant tissues: a practical experience for biological undergraduates’, *Biochem. Edu.*, vol. 27, pp. 110-3.
7. Damayanti, TA & Putra, LK 2012, ‘Komunikasi singkat: Preparasi RNA virus mosaik bergaris dari tanaman tebu menggunakan metode tabung PCR’, *J. Fitopatol. Indones.*, vol. 8, no. 1, hlm. 22-7.
8. Diningsih, E, Suastika, G, Damayanti, TA & Susanto, S 2015, ‘Characterization a carmovirus on carnation in West Java, Indonesia’, *Jurnal Agrivita*, vol. 32, no. 2, hlm. 108-14.
9. Held, P 2004, *Nucleic acid quantitation using biotek’s scanning microplate spectrophotometer applications department biotek instruments, Inc*, diunduh 2015 Oktober 16, <http://www.biotek.com/resources/docs/PowerWave_HT_Quantitation_of_Nucleic_Acids_App_Note.pdf>.
10. Li, R & Mock, R 2005, ‘An improved transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the detection of two cherry flexivirus in *Prunus* spp.’, *J. Virol. Method*, vol. 129, pp. 162-9.
11. Lisa, V 1995, ‘Carnation’, in Loebenstein G, RH Lawson, & Brunt, AA (eds.), *Virus and virus like diseases of bulb and flower crops*, John Wiley and Sons, 543 pp.
12. Lommel, SA, Mc Cain, AH, Mayhew, DE & Moris, TJ 1983, ‘Survey of commercial carnation cultivar for four viruses in California by indirect ELISA’, *Plant Dis.*, vol. 67, pp. 53-6.
13. Mangal, M, SV, Bhardwaj & Anil Handa 2004, ‘Production of virus-free carnation plant through heat therapy’, *Defence Sci. J.*, vol. 54, no. 1, pp. 53-6.
14. Noname 2015, *Protocol nano drop*, diunduh 2015 September 22, <http://www.bio.davidson.edu/gcat/protocols/NanoDrop_tip.pdf>.
15. Raikhy, G, Hallan V, Kulshrestha, S, Ram, R & Zaidi, AA 2006, ‘Multiplex PCR and genome analysis of *Carnation mottle virus Indian isolate*’, *Curr. Sci.*, 01. 90 No-1:74-82.
16. Sánchez-navarro, JA, Carmen, C, Cano, EA & Pallás V 2007, ‘Plant tissue distribution and chemical inactivation of six carnation virus’, *Crop Prot.*, vol. 26, no. 7, pp. 1049-59.
17. Setiyawati, S 2012, ‘Deteksi *Chrysanthemum B carlavirus* dari stek krisan’, tesis Sekolah Pascasarjana Bogor (ID), Institut Pertanian Bogor, Bogor.
18. Sharma, S, Sing, B, Rani, G, Zaidi ,AA, Hallan, U, Nagpal, A & Virk, GS 2007, ‘Production of *Indian citrus ringspot virus* free plant of kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting’, *J. Cent. Europ. Agric.*, vol. 8, no. 1, pp. 1-8.
19. Sing, HP, Hallan, V, Raikhy, G, Kulshrestha, S, Sharma, ML, Ram, R, Garg, ID & Zaidi, AA 2005, ‘Characterization of an Indian isolate of *Carnation mottle virus*’, *Current Science*, vol. 88, no. 44, pp. 594-601.
20. Suehiro, N, Matsuda, K, Okuda, S & Natsuaki, T 2005, ‘A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR’, *J. Virol. Methods*, vol. 125, no. 1, pp. 67-73.
21. Temaja, GRM, Puspawati, NM & Mayadewi, NNA 2012, ‘Utilization of SDT-RT-PCR plant virus detection’, *J. Agric. Sci. and Biotechnol.*, vol. 1, no. 1, hlm. 24-29, <<http://ojs.unud.ac.id/index.php/JASB>>.
22. Thomson, DR & Dietzgen, G 1995, ‘Detection of DNA and RNA plant viruses by PCR and RT-PCR using a rapid virus release protocol without tissue homogenization’, *J. Virol. Methods*, vol. 54, no. 2-3, pp. 85-95.
23. Wacker MJ & Godard MP 2005, ‘Analysis of one-step and two-step real-time rt-pcr using superscript iii’, *J. Biomol Tech.*, vol. 16, no. 3, pp. 266-71.

24. Wang, B, Lu, MK, Yu, SQ & Zang, RP 1990, 'Elimination of *Carnation mottle virus* from carnation plant', *Chinese Journal of Virology*, vol. 6 no. 4, pp. 341-6, doi: CNKI: SUN:BDXB.01.1990-04-008.
25. Wylie, S, Wilson, CR, Jones, RAC & Jones, MGK. 1993, 'A polymerase chain reaction assay for *Cucumber mosaic virus* in lupin seeds', *Aust. J. Agri. Res.*, vol. 44, no. 1, pp. 41-51.
26. Yang, L, Arora, K, Beard, WA, Wilson, SH & Schlick, T 2004, 'Critical role of magnesium ions in DNA polymerase beta's closing and active site assembly', *Journal of the American Chem. Soc.*, vol. 126, no. 27, pp. 8441-53, doi:10.1021/ja049412o. PMID 15238001.