

KAJIAN SIFAT BIOEKOLOGI DAN BIOMOLEKULER VIRUS MOSAIK BERGARIS PADA TEBU DI INDONESIA

Kode : IIF/13 (Lanjutan)

Dr. Tri Asmira Damayanti
(Institut Pertanian Bogor)

Lilik Koesmihartono Putra, M.AgSt
(Pusat Penelitian dan Pengembangan Gula Indonesia)

LATAR BELAKANG

Tebu → Gula, komoditas penting di dunia

Kebutuhan gula nasional tahun 2005 : 3.3 jt ton,

Prod.gula Nasional tahun 2005 : 2.2 jt ton, sisanya IMPOR.



**PENYAKIT MOSAIK BERGARIS TEBU
DAPAT MENJADI PEMBATAS PRODUKSI GULA**

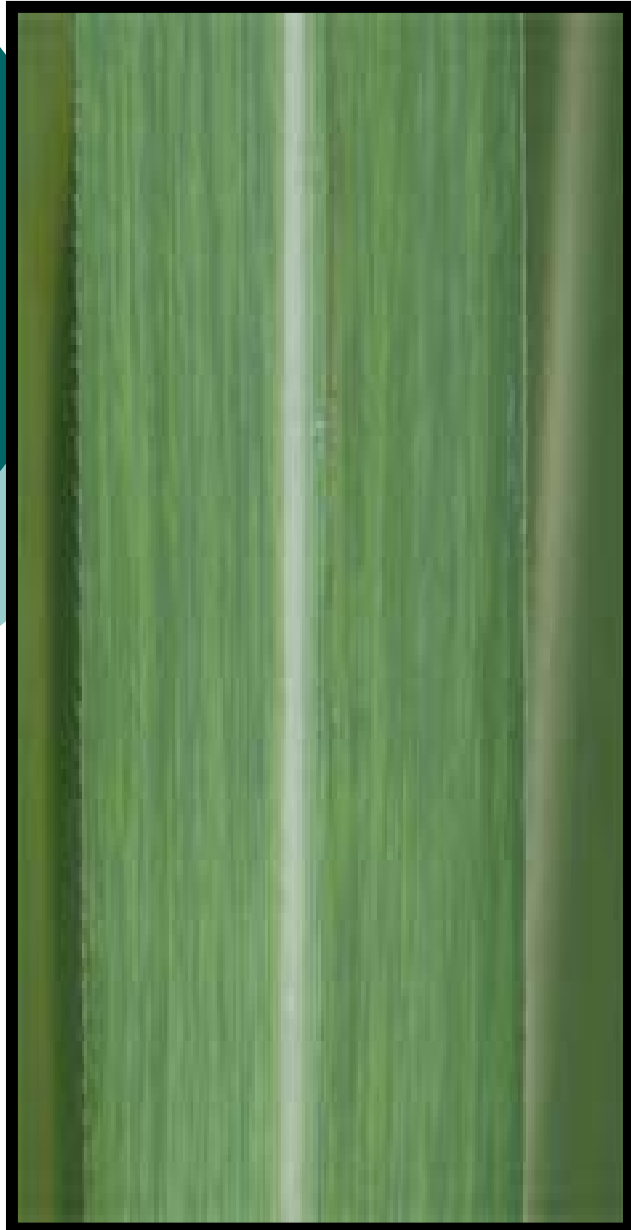


SWASEMBADA GULA PADA TAHUN 2009



TEMUAN & PERUMUSAN MASALAH

- Penyakit baru di Indonesia
- Ditemukan di 59 pertanaman tebu di Jateng dan Jatim; KP 1-62%
- Dominan pada PS 864 (SR)
- Menginfeksi jagung, sorgum & gulma *Dactyloctenium aegypticum*
- Ditularkan via pisau potong, luka dan **stek batang/cutting cane**
- Persebarannya cepat
- *Incidence* lebih banyak pada *irrigated land* dari pada *rain fed land*
- CP gene partial 98% SCSMV isolat Pakistan



Sugarcane Streak Mosaic Virus



Tujuan

- (1) Mencari **metode deteksi** virus pada bibit/cutting cane yang cepat dan mudah diterapkan untuk deteksi rutin
- (2) Menentukan **thermal inactivation point** (TIP) sebagai dasar untuk mengeliminir virus secara fisik
- (3) Mengkaji **aspek pemupukan dan cekaman air** terhadap perkembangan penyakit



Metodologi

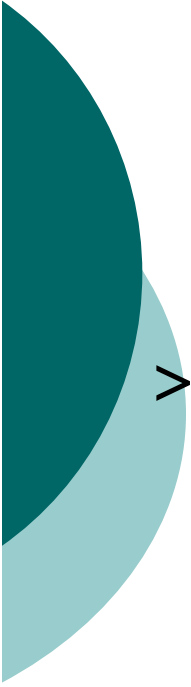
1. Deteksi dengan RT-PCR

ASPEK PENTING PREPARASI TEMPLAT PCR

PCR : powerful tool dalam deteksi asam nukleat

Ekstraksi asam nukleat untuk PCR bervariasi tergantung spesies tanaman, kultivar, tipe jaringan, dan tipe asam nukleat

Penghilangan **komponen penghambat** Reverse Transcriptase atau enzim DNA polymerase PENTING



Faktor yang mempengaruhi pelepasan RNA
dari jaringan tanaman ;

- > Kandungan fisik, kimia serta distribusi virus dalam jaringan tanaman



Ekstraksi asam nukleat sulit dan merepotkan



**Pengembangan dan identifikasi RT-PCR protokol
yg mudah, Reliable dan adaptable untuk diagnosis rutin**

Preparasi RNA Total

Tube Capture -TC
Simple Direct Tube-SDT
Glycine Extraction-Gly
RNA kit (pembanding)-Q

Konstruksi cDNA

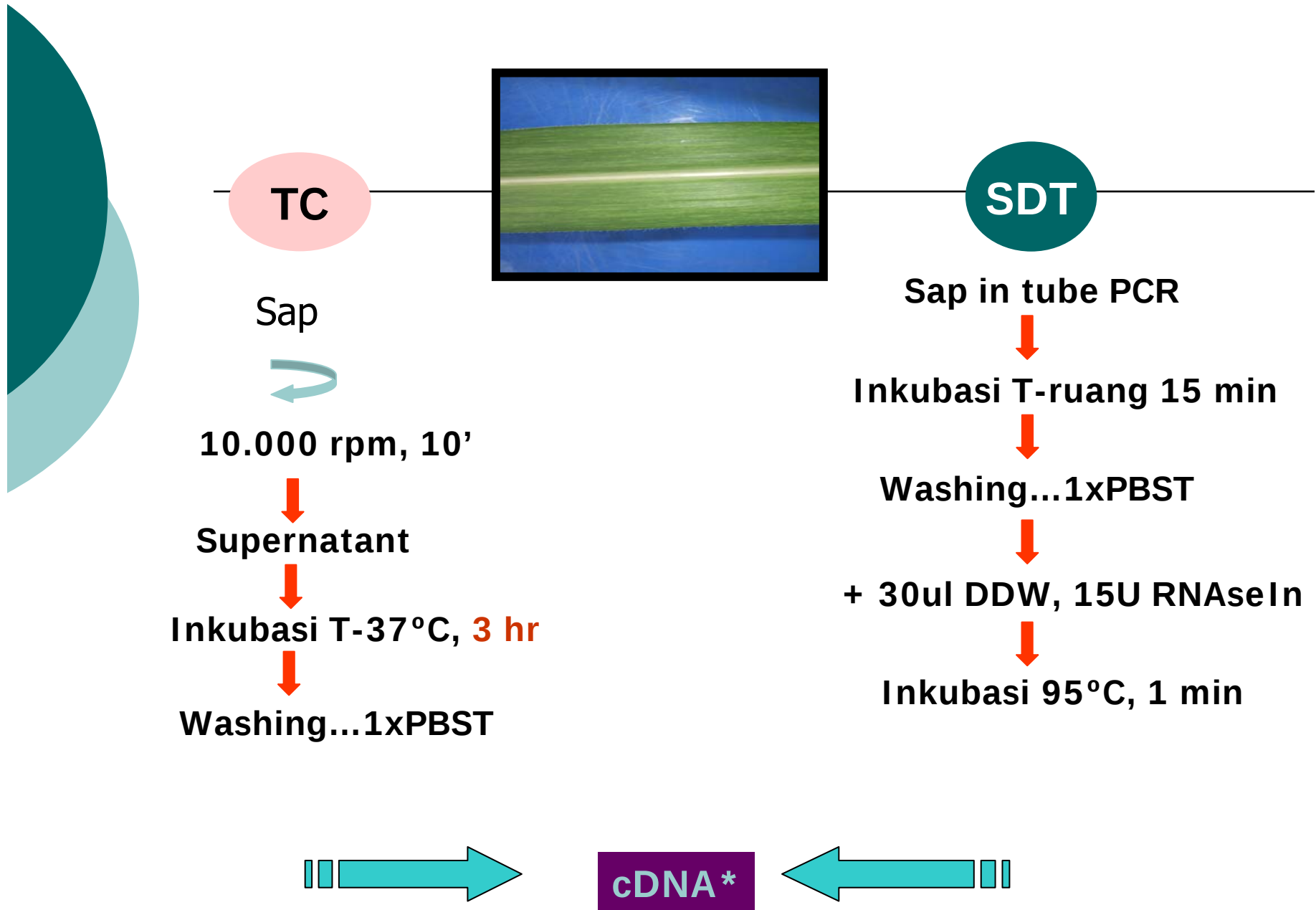
DNA Amplifikasi/PCR

Visualisasi DNA

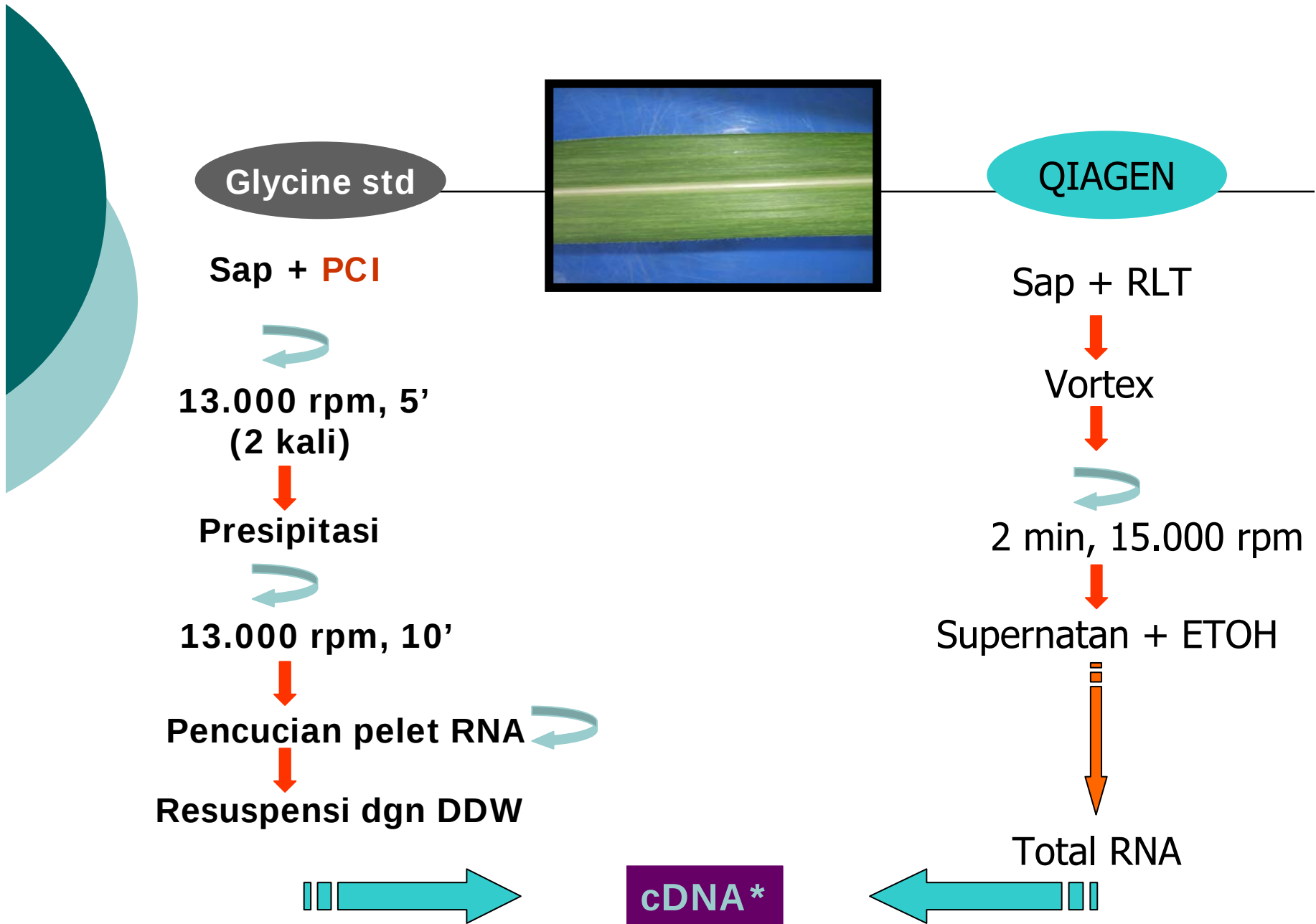
Rapid detection method

cDNA – d(T)20

RT-PCR – SCSMV 547F & SCSMV-AP3



* Sesuai dengan rekomendasi NEB



* Sesuai dengan rekomendasi NEB

2. Penentuan TIP & Aplikasinya pada bibit tebu

Tujuan : mengetahui suhu yg diperlukan untuk menginaktifkan virus

2.1. Penentuan TIP pada tanaman indikator

Sap tanaman sakit



Perlakuan panas, 10 menit (50-65°C dengan interval 5°C)



Inokulasi tanaman indikator
(*Dactyloctenium aegypticum*)



Observasi sampai max 4 MSI



Deteksi dengan RT-PCR



2.2. Aplikasi TIP pada bibit tebu/bagal

Diketahui TIP yang efektif untuk mengeliminir virus pada bibit

3. Kajian aspek budidaya terhadap perkembangan penyakit

3.1. Pemupukan (Field Trial)

Perlakuan :

Petak utama dosis pupuk N : 0, 3, 6, 8, 10 ku ZA/ha

Anak petak dosis pupuk K : 0, 1, 2, 3 ku KCl/ha

Dosis P semua perlakuan 1 Ku SP-36/ha

Inokulasi : 2 BST, metode Sein

Tebu : PS 864

Tiap plot : 10 juring @ 6m, 20 bagal (3 mata/bagal), 3
ulangan/perlakuan

Rancob : Rancangan acak split plot & DMRT



3.2. Cekaman air (Percobaan rumah kaca)

Perlakuan :

100% kapasitas lapang (sawah)

70% kapasitas lapang (lahan kering masih ada air)

40% kapasitas lapang (lahan kering)

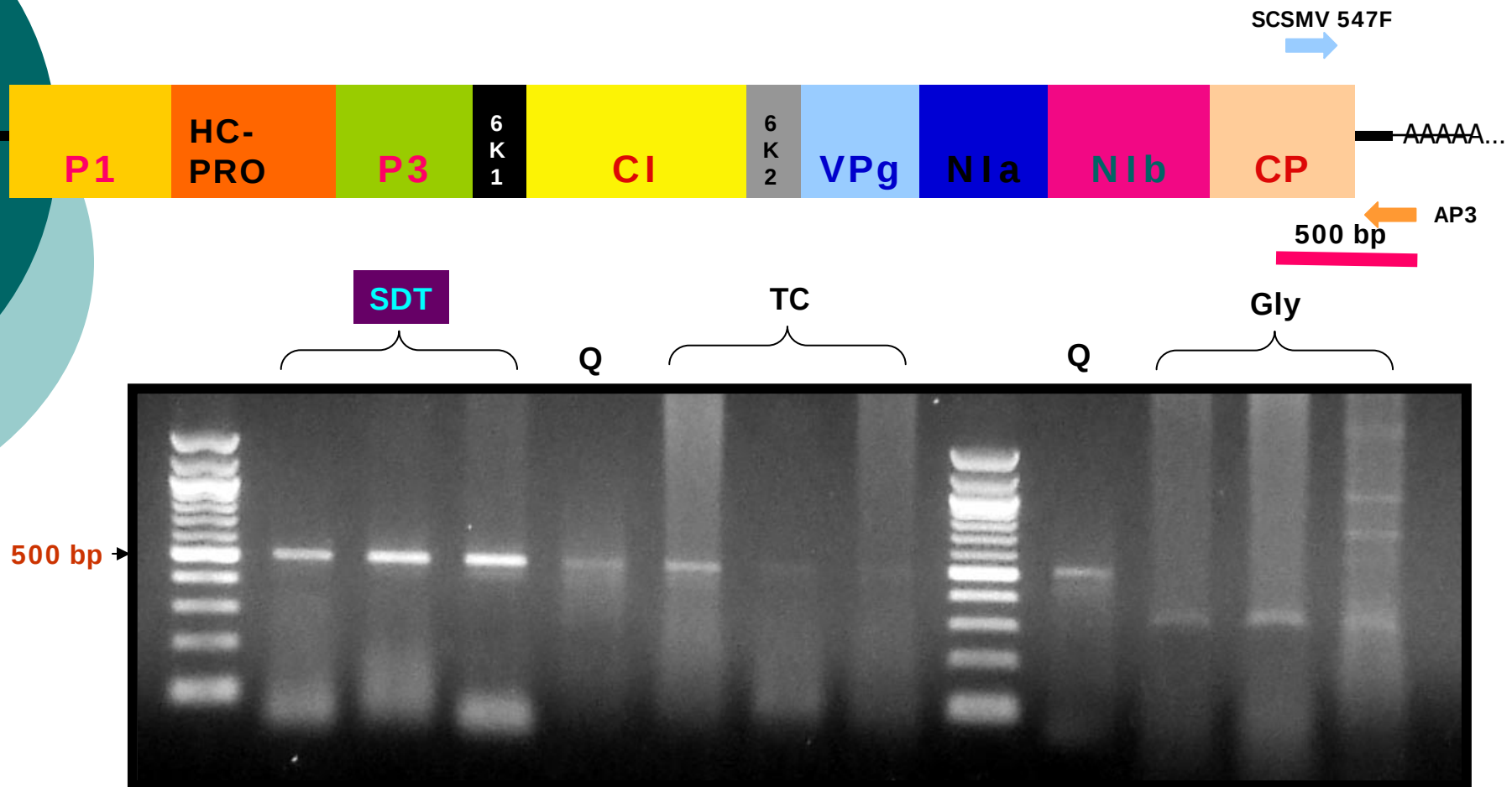
Tebu : PS 851, PS 864, PS 921, PSJT 94-33, PSCO 90-2411

Tiap perlakuan diulang 5 kali

Inokulasi : umur 2 bulan, Metode Sein

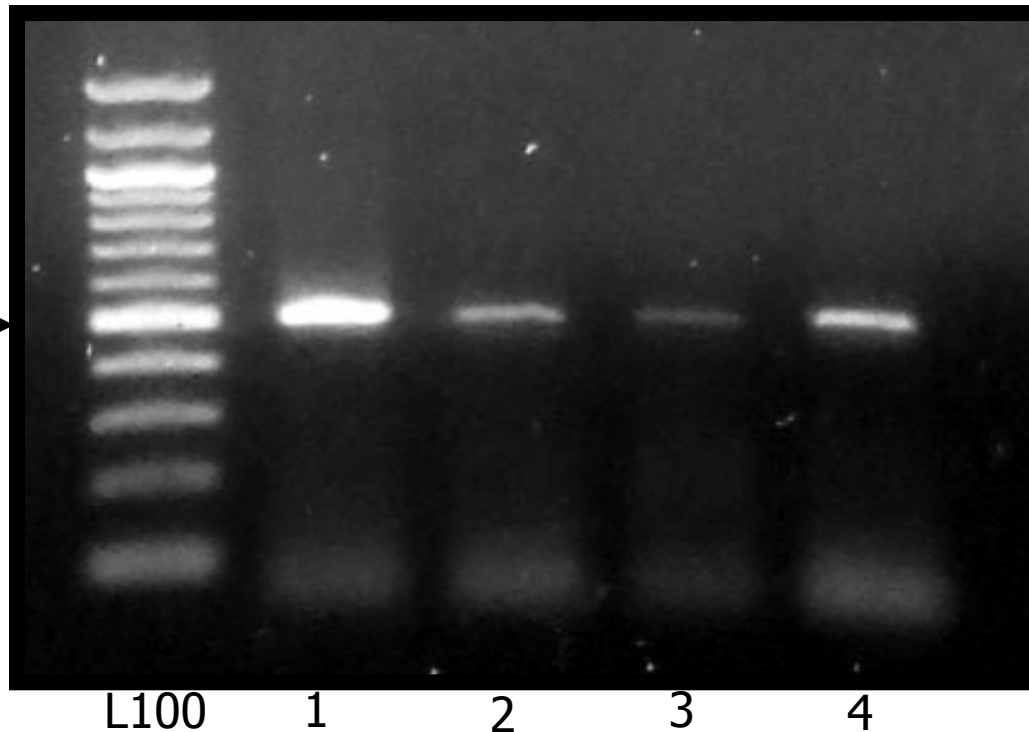


1. EKSPLORASI METODE EKSTRAKSI RNA TOTAL



Metode SDT dengan modifikasi minor merupakan metode ekstraksi yang **mudah**, **cepat**, **murah** dan terbaik dalam menyediakan templat RNA untuk RT-PCR

METODE SDT UNTUK EKSTRAKSI RNA TOTAL DARI BATANG DAN PELEPAH TEBU



1. Kontrol daun (+)
2. Pelepah
3. Batang atas
4. Batang bawah

Metode SDT dapat dimanfaatkan deteksi batang induk (asymtomatic)/gejala laten sebelum diperbanyak secara luas untuk produksi stek/bagal bebas virus



MODIFIKASI SDT UNTUK EKSTRAKSI DAN DETEKSI SCSMV

Standard

1. Daun : PBST = 1:1
2. Inkubasi sap 15 menit
3. Konstruksi cDNA & PCR
 - > 100 mM DTT
 - > RT pada suhu 37°C
 - > Primer 25 uM
 - > Taq 0.5U/25 ul

Modifikasi

1. Daun : PBST = 1:6
2. Inkubasi sap 20 menit
3. Konstruksi cDNA & PCR
 - > 50 mM DTT
 - > RT pada suhu 42°C
 - > Primer 10 uM
 - > Taq 1.25U/25 ul

PERBANDINGAN METODE EKSTRAKSI

No	Parameter	Qiagen Kit	SDT	TC	Standard
1.	Kemudahan Pengerjaan	***	****	***	*
2.	Waktu/10 sampel	1 jam	< 1 jam	4.5 jam	2 jam
3.	Simplicity	***	****	***	*
4.	Reliable	***	****	**	*
5.	Kontaminasi	**	*	**	****
6.	Cost	****	*	**	****

Qiagen
RLT/RLC
RW1
RPE
2 column

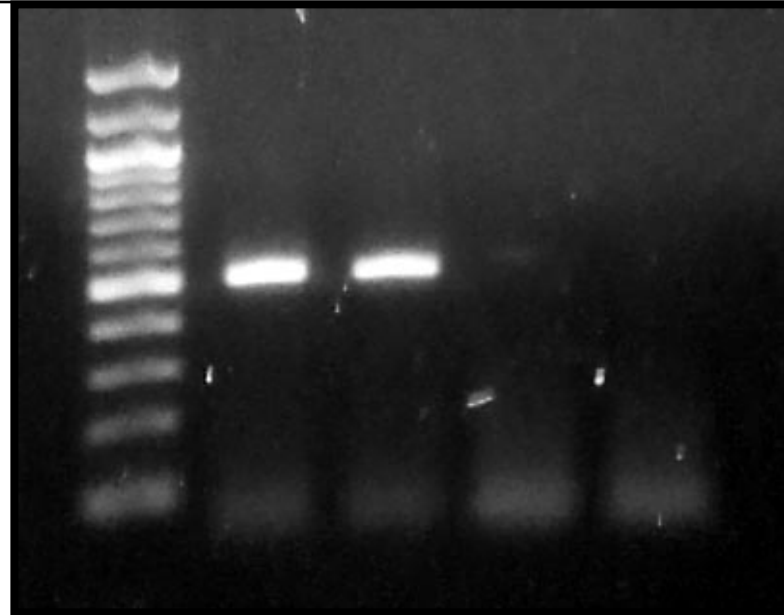
SDT - PBST
8 g NaCl
0.2 g KH₂PO₄
1.15 g Na₂HPO₄
0.2 g KCl

Bufer-TC
1 x PBST
2% PVP

Bufer Glycine
0.5 M Glycine
0.5 M NaCl
5 mM EDTA
20% SDS
5% Bentonite
PCI

2.1. Titik Panas Inaktivasi SCSMV Pada *D. aegypticus*

Hasil deteksi RT-PCR



L100 50°C 55°C 60°C 65°C

TIP SCSMV antara suhu 55-60°C

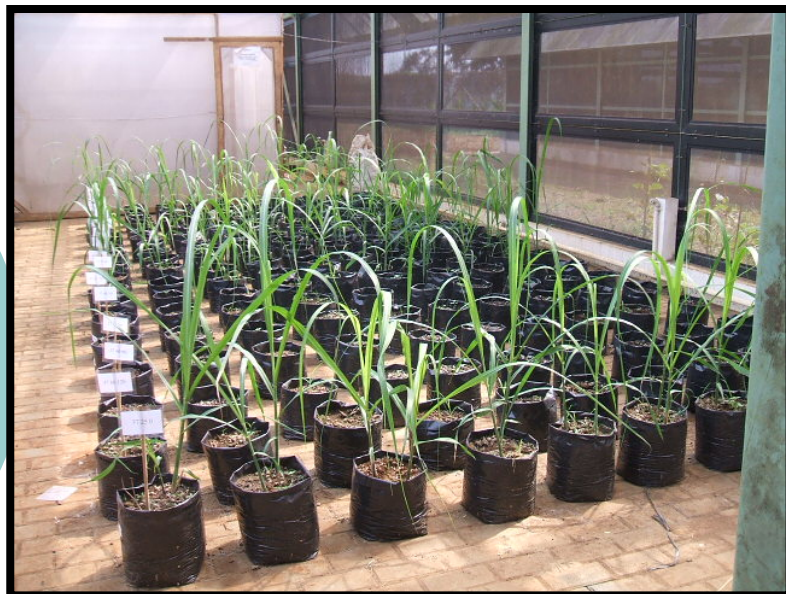
2.2. Aplikasi TIP untuk Eliminasi SCSMV dari Stek Tebu

Perlakuan Panas	Σ Tan. Tumbuh/ Σ Tan Uji	Σ Tan.bergejala / Σ Tan Uji	Keparahan	
SR-55°C (10')	9/10	9/10	++	SR, suhu ruang TB, tidak bergejala (-), stek mati (+), gejala ringan (++) , gejala sedang (+++) , gejala parah
SR-55°C (30')	7/10	4/10	+, 3/10 (TB)	
SR-55°C (60')	0/10	-	-	
SR-55°C (120')	0/10	-	-	
37°C-55°C (10')	9/10	6/10	++, 3/10 (TB)	
37°C-55°C(30')	7/10	5/10	+, 2/10 (TB)	
37°C-55°C (60')	0/10	-	-	
37°C-55°C (120')	0/10	-	-	
SR-60°C (10')	9/10	9/10	+	
SR-60°C (30')	0/10	-	-	
SR-60°C (60')	0/10	-	-	
SR-60°C (120')	0/10	-	-	
37°C-60°C (10')	0/10	-	-	
37°C-60°C (30')	0/10	-	-	
37°C-60°C (60')	0/10	-	-	
37°C-60°C (120')	0/10	-	-	
K-SR	10/10	10/10	+++	
K-37°C	10/10	10/10	+++	

- *Hot Water Treatment* (HWT) > 30 menit : stek mati
- Perlu optimasi lamanya HWT pada suhu 55°C (10 min < t < 30 min)
- Pada HWT 55°C, preheat 37°C tidak memberikan pengaruh nyata

A.

6 MST



B.

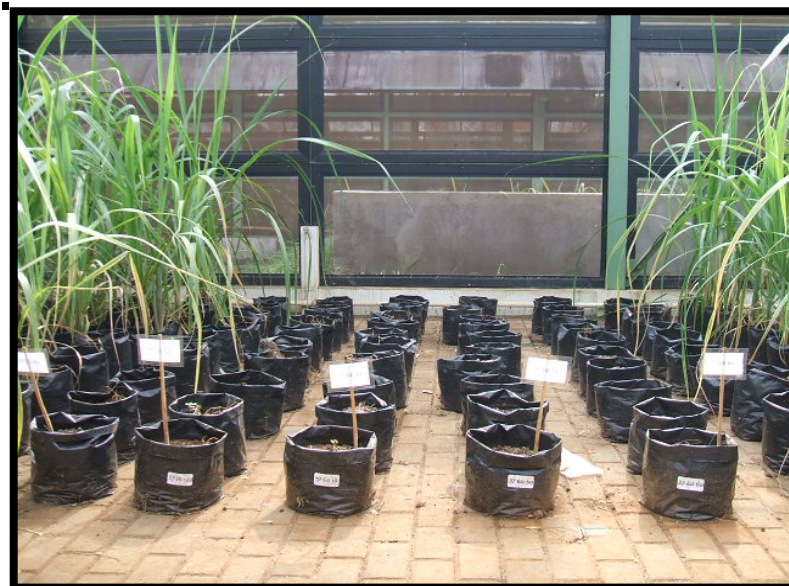
14 MST



C.



D.



3. Kajian aspek budidaya terhadap perkembangan penyakit

3.1. Pemupukan (Field Trial)

Pupuk ZA vs Parameter produksi & *incidence* SCSMV

Perlakuan	Pengaruh Pupuk ZA			
	Σ Rumpun	Σ Tunas	Tinggi (cm)	KP (%)
ZA0	15.67a	38.75a	25.95a	3.11a
ZA3	17.92b	63.33b	47.40b	10.10b
ZA6	20.00c	63.00b	55.55c	13.13bc
ZA8	21.17cd	64.41b	61.28d	15.34c
ZA10	21.92d	64.00b	61.70d	14.55c

ZA nyata meningkatkan parameter produksi & *incidence* SCSMV



Pupuk K vs Parameter produksi & *incidence* SCSMV

Perlakuan	Pengaruh Pupuk K			
	Σ Rumpun	Σ Tunas	Tinggi(cm)	KP (%)
K0	19.67a	58.40a	49.46a	8.96a
K1	19.13a	59.20a	50.43a	12.08b
K2	19.13a	59.27a	51.48a	11.86b
K3	19.40a	57.93a	50.14a	12.15b

K tidak nyata berpengaruh pada parameter produksi, tapi Meningkatkan *incidence* SCSMV

Dugaan ; lokasi percobaan jenuh K

Interaksi Pupuk ZA & K vs parameter produksi & *incidence* SCSMV

Per-lakuan	Pengaruh Pupuk ZA dan K			
	ΣRumpun	ΣTunas	Tinggi(cm)	KP (%)
ZA0K0	17.33bc	39.67a	24.73a	1.90a
ZA0K1	15.00a	35.00a	25.20a	5.67c
ZA0K2	14.00a	38.67a	26.87a	2.63a
ZA0K3	16.33a	41.67a	27.00a	2.23a
ZA3K0	16.67b	59.00b	45.27b	3.80b
ZA3K1	19.00bcd	68.33b	48.00b	11.60d
ZA3K2	18.33bcde	63.67b	49.40b	9.70d
ZA3K3	17.67bcd	62.33b	46.93b	15.30d
ZA6K0	21.00cde	66.00b	55.80c	9.40c
ZA6K1	19.33bcde	63.00b	55.47c	15.77d
ZA6K2	21.00cde	62.67b	59.27cd	14.43d
ZA6K3	18.67bcde	60.33b	51.67c	13.07d
ZA8K0	22.67e	63.00b	60.97e	16.33d
ZA8K1	21.33e	64.67b	61.30e	11.73d
ZA8K2	19.67bcde	68.00b	60.50de	17.67d
ZA8K3	21.00cde	62.00b	62.37e	15.77d
ZA10K0	20.67bcde	64.33b	60.53e	13.37d
ZA10K1	21.00cde	65.00b	62.17e	15.63d
ZA10K2	22.67e	63.33b	61.37e	14.83d
ZA10K3	23.33e	63.33b	62.73e	14.37d

- ZA : ↑ parameter produksi & incidence SCSMV
- ZA > 3 ku/ha tidak nyata
↑ Σrumpun, & tunas, tapi nyata meningkatkan tinggi tanaman
- > K jenuh di lokasi penelitian



Perlu optimasi lebih lanjut



Rekomendasi spesifik Lokasi

3.2. Pengaruh Cekaman Air Terhadap *Incidence* SCSMV

Perlakuan	Σ Tanaman bergejala/ Σ Tanaman uji tiap klon					Masa Inkubasi (Hari)
	PS 851	PS 864	PS 921	PSJT 941	PSCO 902	
KL 40%	1/5	3/5	3/5	2/5	1/5	14-30
KL 70%	2/5	4/5	3/5	2/5	1/5	10-30
KL 100%	3/5	5/5	3/5	3/5	1/5	14-30

Air meningkatkan kerentanan tebu thdp SCSMV pada beberapa klon, namun sifat genetik klon juga berperan

Note : PSCO 902 – tahan
PS 851 - moderat
PS921, PSJT 941 – rentan
PS 864 – sangat rentan

Percobaan Pemupukan



Percobaan Cekaman Air





KESIMPULAN

- Metode ekstraksi SDT merupakan metode yang terbaik dalam menyediakan templat RT-PCR untuk deteksi SCSMV
- SDT dapat diandalkan untuk digunakan dalam deteksi rutin karena *simple*, mudah, murah dan konsisten
- TIP SCSMV berkisar 55-60°C, namun perlu optimasi pada lamanya waktu perlakuan untuk aplikasi pada stek/bagal tebu
- Pemupukan (ZA) berpengaruh tidak hanya pada parameter pertumbuhan, tetapi juga *incidence* SCSMV
- Rekomendasi pemupukan sebaiknya spesifik lokasi
- Cekaman air meningkatkan kerentanan tanaman terhadap SCSMV



RENCANA PENELITIAN TAHUN KE-3

1. Konstruksi rekombinan CP dan produksi antisera SCSMV untuk tujuan deteksi serologi
2. Eksplorasi bakteri endofit dan PGPR asal tanaman tebu untuk pengendalian biologi SCSMV



Terimakasih