

INTISARI

EKSTRAKSI dsRNA SECARA SEDERHANA UNTUK PREPARASI DETEKSI RT-PCR TIGA SPESIES VIRUS TANAMAN

WIWIK ENDARSIH
15/388590/PPN/03895

Double stranded RNA (dsRNA) merupakan RNA memiliki berat molekul tinggi ($> 1 \times 10^6$), selalu ditemukan pada tumbuhan terinfeksi oleh virus RNA dan dijadikan sebagai tanda adanya infeksi virus RNA. Metode Ekstraksi dsRNA merupakan alternatif preparasi RNA virus murni untuk deteksi RT-PCR. *Rehmannia mosaic virus* (ReMV) merupakan anggota Tobamovirus yang memiliki karakter virus stabil, *Cucumber mosaic virus* (CMV) pada lada memiliki karakter yang berbeda dibanding tanaman inang lain karena lada kaya polisakarida dan polifenol yang dapat menghambat ekstraksi virus tersebut. Sedangkan *Tomato chlorosis virus* (ToCV) merupakan anggota Genus Crinivirus, *phloem limited* dan berada pada konsentrasi rendah dalam jaringan. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode ekstraksi dsRNA secara sederhana untuk preparasi deteksi RT-PCR terhadap ReMV, CMV, ToCV. Prinsip kerja ekstraksi dsRNA berdasarkan afinitas serbuk selulosa terhadap asam nukleat dan adsorpsi spesifik dsRNA pada konsentrasi etanol 16,6 %. Analisa yang dilakukan meliputi kuantifikasi asam nukleat menggunakan spektrofotometer, efisiensi metode (tingkat kerumitan, waktu, biaya per reaksi) serta sekuensing. Hasil yang diperoleh dari metode ekstraksi dsRNA secara sederhana ini adalah konsentrasi RNA lebih rendah tetapi dengan kemurnian tinggi yang sebanding, per satuan reaksi biaya lebih murah sekitar 20%, mudah karena menggunakan bahan sederhana dan memerlukan waktu 1 jam untuk mengekstraksi dsRNA virus murni dibandingkan dengan metode ekstraksi kit komersil. Berdasarkan hasil PCR dan sekuensing menunjukkan bahwa mosaik pada lada dan tembakau serta klorosis pada tomat berturut turut adalah CMV, ReMV dan ToCV dengan ukuran ampikon berturut turut 501, 568 dan 360 pb. Ekstraksi RNA menggunakan metode dsRNA secara sederhana dapat digunakan untuk preparasi deteksi RT-PCR terhadap CMV, ReMV, ToCV.

Kata kunci : *Cucumber mosaic virus*, ekstraksi dsRNA, *Rehmannia mosaic virus*, RT-PCR, serbuk selulose, *Tomato chlorosis virus*

ABSTRACT

THE SIMPLE VIRAL dsRNA EXTRACTION METHODE FOR PREPARATION DETECTION RT-PCR OF THREE PLANT PATHOGEN VIRUSES SPECIES

WIWIK ENDARSIH
15/388590/PPN/03895

Double stranded RNA (dsRNA) is the high molecule weight of RNA ($> 1 \times 10^6$), always found in plants infected with RNA virus, as a hallmark a RNA virus infection. dsRNA extraction method is one of the RNA preparation alternative method for RT-PCR detection. Rehmanna mosaic virus (ReMV) is the member of Tobamoviruse, a typical stabile virus, Cucumber mosaic virus (CMV) in pepper have different typical from the others CMV host because of pepper have rich of polyphenols and polysaccharides as the inhibitor for RNA extraction. While the Tomato chlorosis virus (ToCV) is the member of criniviruse which is floem limited and have less concentration in the host. The study aims to develop the simple dsRNA extraction method for the preparation of RT-PCR detection for ReMV, CMV, ToCV. The principle of dsRNA extraction is based on the different affinity of nucleic acids of the cellulose powder and the specific adsorption in 16.6% ethanol buffer. The analysis was performed by nucleic acid quantification with spectrophotometer, efficiency of method (level of complexity,time,cost per reaction) and sequencing. The result of this studies are simple dsRNA extraction method have lower result RNA concentration but both of the methods have same RNA purity result. This method is quite cheap about 20% under commercial kit price for each reaction and easy because with the simple material can get pure virus about one hour and the RNA quantity is proportional to the commercial kit. The PCR and sequencing result was performed that virus on pepper, tobacco and tomato leaf is CMV, ReMV and ToCV, respectively have amplicon size 500,568 and 360bp. The simple method of dsRNA extraction can used for the preparation of RT-PCR detection for CMV, ReMV, ToCV.

Keywords : *cellulose powder, Cucumber mosaic virus, dsRNA extraction, Rehmanna mosaic virus, RT-PCR, Tomato chlorosis virus*