

**ISOLASI, PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI PARSIAL
SOYBEAN STUNT VIRUS**

*(ISOLATION, PURIFICATION AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF
SOYBEAN STUNT VIRUS)*

Sri Sulandari dan Y.B. Sumardiyono
Laboratorium Virologi Tumbuhan
Fakultas Pertanian UGM, Yogyakarta 55281

Roechan
Balai Penelitian Bioteknologi Pertanian Bogor

ABSTRACT

The objective of this study was isolation and characterization of Soybean Stunt Virus, the causal agent of soybean stunt disease. The virus was isolated with single lesion method through *Chenopodium amaranticolor* and *Vigna unguiculata*, and then propagated on *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Differential centrifugation method was used for purification. Virus isolate obtained from Bogor was used for further studies. The result showed that SSV could be isolated on *C. amaranticolor*, but not on *V. unguiculata*, and then propagated on *Nicotiana tabacum* var. Xanthi without any symptom. Purified virus showed $A_{260}/A_{280} = 1.55$, lower than that of CMV. The virion were small isometric particles, about 30 nm in diameter. Coat protein consists of a single type of subunit protein, with molecular weight about 29 kD.

Key words: Soybean Stunt Virus, virus isolation, virus purification

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakterisasi parsial Virus Kerdil Kedelai (*Soybean Stunt Virus*), penyebab penyakit kerdil pada kedelai. Isolasi virus dengan cara bercak tunggal pada *Chenopodium amaranticolor* dan *Vigna unguiculata*. Perbanyakan selanjutnya pada *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Pemurnian virus dilakukan dengan cara sentrifugasi diferensial. Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa Virus Kerdil Kedelai hanya dapat diisolasi pada *C. amaranticolor* dan kemudian diperbanyak pada tembakau Xanthi tanpa menunjukkan gejala. Hasil pemurnian virus diperoleh sediaan virus dengan nisbah $A_{260}/A_{280} = 1.55$, lebih rendah daripada CMV. Virion merupakan partikel isometrik dengan diameter 30 nm. Kapsid protein tersusun dari satu tipe subunit protein dengan berat molekul sekitar 29 kD.

Kata kunci: Virus Kerdil Kedelai, *Soybean Stunt Virus*, pemurnian virus

PENDAHULUAN

Penyakit kerdil pada kedelai yang disebabkan oleh Virus Kerdil Kedelai (*Soybean Stunt Virus* = SSV), merupakan penyakit virus kedelai yang terpenting di

Indonesia (Soeseno, 1987). SSV ditemukan pada tahun 1973 di daerah Bogor dan kemudian diketahui telah ada di semua propinsi di Jawa, Sulawesi Selatan, Sumatera Barat, dan Lampung (Roechan *et al.*, 1975) Infeksi virus pada beberapa kultivar kedelai

menyebabkan tanaman kerdil, daun berkerut, dan menjadi belang, dengan beberapa malformasi.

Penyakit ditularkan melalui biji, cairan tanaman sakit, dan oleh serangga. Vektor berupa kutu daun antara lain *Aphis craccivora* dan *A. glycines* secara non-persisten. Infeksi dapat mencapai biji dengan gejala berupa bercak lokal dengan pola konsentris pada kulit biji. Infeksi pada biji dapat mencapai 80 - 100%, tergantung saat infeksi pertama terjadi dan kultivar kedelai (Roechan *et al.*, 1975, Sinclair, 1993) ai.

Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi, dan karakterisasi parsial virion hasil pemurnian penyebab kerdil pada kedelai. Isolat virus berasal dari beberapa tempat di Pulau Jawa.

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

1. Isolasi virus -- Isolat virus dikumpulkan dari beberapa tempat di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, dan Daerah Istimewa Yogyakarta. Dari antara beberapa isolat yang diperoleh, isolat dari Bogor dipakai sebagai bahan untuk kajian selanjutnya.

Isolasi virus dilakukan dengan cara bercak tunggal pada tanaman *Chenopodium amaranticolor* dan *Vigna unguiculata*. Daun tanaman sakit dari lapangan dilumatkan dalam bufer sitrat 0,5 M pH 6,5, dan cairannya digunakan sebagai inokulum dalam penularan mekanik dengan menggunakan abrasif karborundum 600. Bercak lokal yang diperoleh diamati bentuk, ukuran, warna, dan masa inkubasinya. Bercak yang diperoleh diinokulasikan kembali pada tanaman indikator yang sama, sampai diperoleh isolat yang stabil

2. Perbanyak virus -- Isolat virus yang diperoleh diperbanyak pada tanaman propagasi. Dalam penelitian ini digunakan

kedelai dan tembakau. Kemudian dipilih tanaman yang paling sesuai sebagai bahan untuk pemurnian virus, berdasarkan uji infektivitas relatif pada *C. amaranticolor*.

3. Pemurnian virus -- Pemurnian parsial dengan sentrifugasi diferensial dilakukan untuk mendapatkan sediaan virus untuk uji karakterisasi. Bahan pemurnian virus adalah tembakau Xanthi yang terinfeksi SSV.

Ekstraksi dilakukan dalam bufer sitrat 0,5 M pH 6,5 yang mengandung 0,1% asam thioglikolat, dan ditambah kloroform sebagai bahan pelarut klorofil dengan perbandingan 1:2:2 (b:v:v). Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 7500 rpm selama 10 menit. Fase air yang diperoleh ditambah 10% PEG 6000 dan 4% NaCl. Setelah diaduk sampai homogen kemudian disentrifugasi pada 11.000 rpm selama 15 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dalam bufer sitrat 0,05 M pH 7,0 yang mengandung 2% Triton X - 100 dan disentrifugasi pada 10.000 rpm selama 5 menit. Kemudian dilakukan kembali konsentrasi dengan PEG 6000 dan resuspensi hasil konsentrasi, diulang sampai tiga kali. Pelet yang diperoleh disuspensikan dalam air dan dibiarkan semalam dalam suhu 4°C. Setelah semua pelet larut kemudian dijernihkan dengan sentrifugasi pada 10.000 rpm selama lima menit, supernatan yang diperoleh merupakan sediaan virus untuk kajian selanjutnya.

Hasil pemurnian diamati dengan mikroskop elektron, elektroforesis pada gel poliakril amida, dan spektrofotometer.

Pengamatan mikroskopi elektron untuk mengetahui bentuk dan ukuran partikel virus dengan cara pengecatan negatif dengan uranil asetat 1%. Elektroforesis pada gel poli akril amida untuk mengetahui berat molekul *coat protein*. Pewarnaan dengan Coomassie brilliant blue. Penanda (*marker*) berat

molekul menggunakan *Albumin* (BM 66000), *Carbonic anhydrase* (BM 29000), *Cytochrome* (BM 12400) dan *Aprotinin* (BM 6500). Sebagai pembanding adalah ekstrak daun kedelai terinfeksi SSV dan tembakau bebas virus dari kultur jaringan. Nisbah RNA dengan protein diamati dengan spektrofotometri, berdasarkan absorpsi sinar ultraviolet dari sediaan virus hasil pemurnian pada $A_{260\text{ nm}}$ dan $A_{280\text{ nm}}$.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Gejala dan isolasi virus

Pengamatan lapangan menunjukkan adanya keragaman gejala infeksi Virus Kerdil Kedelai. Gejala penyakit kerdil kedelai yang ditemukan berupa *veinclearing*, mosaik ringan, mosaik jelas, daun keriput dan kerdil. Keragaman gejala adalah akibat perbedaan kultivar kedelai, umur tanaman saat terjadi infeksi, dan lingkungan tumbuh tanaman (Sinclair, 1993).

Untuk kajian di laboratorium, dari setiap tempat pengamatan lapangan diambil contoh tanaman sakit untuk diisolasi. Tabel 1 menyajikan asal isolat yang digunakan dalam penelitian.

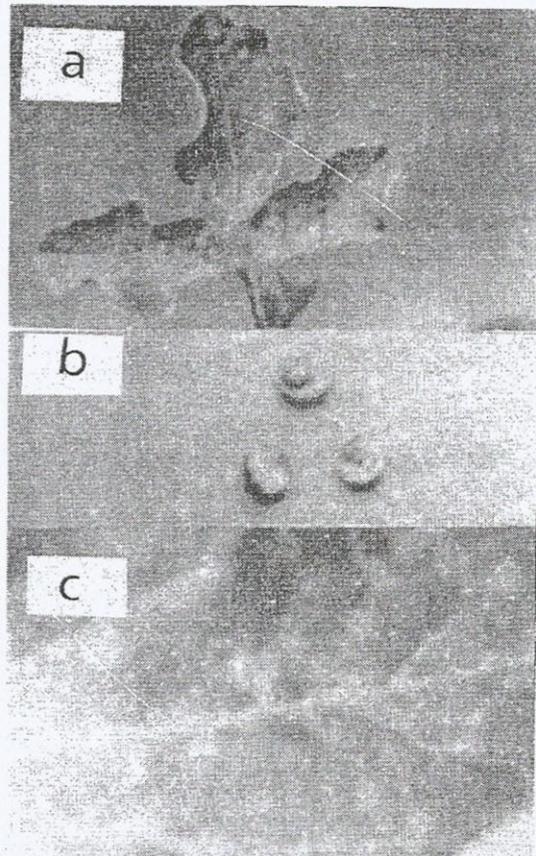
Tabel 1. Asal isolat Virus Kerdil Kedelai

No.	Propinsi	Lokasi/Isolat
1	Jawa Barat	Bogor
2	Jawa Tengah	Klaten, Boyolali, Borobudur, Magelang
3	DI Yogyakarta	Sleman, Gunung Kidul, Bantul
4	Jawa Timur	Ngawi, Nganjuk, Caruban, Jember, Malang

Dalam penelitian selanjutnya digunakan isolat Bogor yang menunjukkan gejala awal

berupa *veinclearing* yang berkembang menjadi mosaik dengan daun berkerut dan tanaman menjadi kerdil (Gambar 1a). Gejala pada biji sangat khas berupa bercak coklat konsentris pada hilumnya (Gambar 1b), yang berbeda dengan gejala yang disebabkan oleh infeksi SMV.

Inokulasi mekanik pada *C. amaranticolor* menghasilkan bercak klorotik berwarna kuning berbentuk bulat (Gambar 1c). Bercak muncul antara 7 - 10 hari setelah inokulasi. Isolat virus dikembangkan dari bercak tersebut. Isolasi virus tidak dapat dilakukan pada *Vigna unguiculata*.



Gambar 1. Gejala infeksi Virus Kerdil Kedelai. (a) gejala pada daun, (b) gejala pada biji, (c) bercak lokal pada *C. amaranticolor*.

2. Perbanyakan virus

Hasil inokulasi SSV pada empat varietas kedelai dan dua varietas tembakau tercantum dalam Tabel 2.

Tabel 2. Reaksi inang perbanyakan terhadap infeksi Virus Kerdil Kedelai

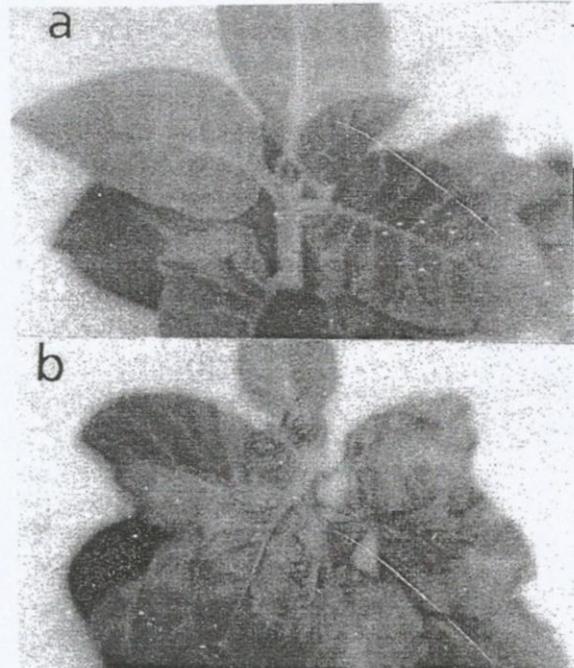
Tanaman	Masa inkubasi	Gejala
1. Kedelai :		
cv. Ringgit	5 - 7 hari	vc, m, kr, kd
cv. Orba	5 - 10 hari	vc, m.
cv. Lokon	7 - 12 hari	vc, mr
cv. Wilis	7 - 12 hari	vc.,mr
2. Tembakau :		
Havana	5 - 7 hari	vc, m
Xanthi	5 - 7 hari	ts

Keterangan

vc - <i>veinclearing</i>	m - mosaik
kr - berkerut	kd - kerdil
mr - mosaik ripgan	ts - tak bergejala

Tabel 2 menunjukkan bahwa reaksi empat kultivar kedelai dan dua kultivar tembakau terhadap infeksi SSV berbeda-beda. Pada kedelai, gejala kerdil hanya terjadi pada kultivar Ringgit, dan pada kultivar lain adalah penjernihan tulang daun (*vein clearing*) dan mosaik.

Gambar 2 menunjukkan perbedaan reaksi tembakau varietas Havana dengan varietas Xanthi terhadap infeksi SSV. Infeksi SSV pada varietas Havana menyebabkan gejala mosaik, tetapi pada varietas Xanthi tidak menunjukkan gejala. Meskipun tidak memberikan gejala, pada uji konsentrasi relatif tembakau Xanthi merupakan inang perbanyakan yang baik.

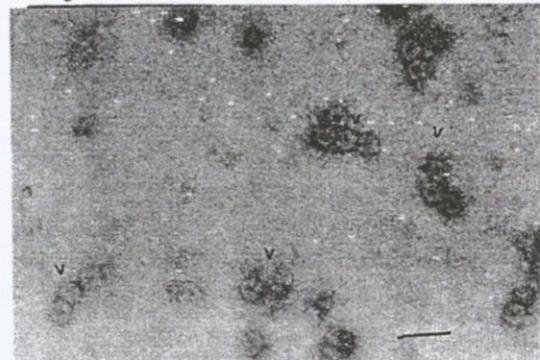


Gambar 2. Hasil inokulasi pada tembakau Xanthi. (a) dengan SSV dan (b) dengan CMV.

3. Pemurnian virus

a. Pengamatan mikroskop elektron —

Hasil pengamatan dengan mikroskop elektron terhadap sediaan virus hasil pemurnian parsial dengan pengecatan negatif disajikan dalam Gambar 3.



Gambar 3. Partikel virus SSV berbentuk bulat, dengan diameter 30 nm.

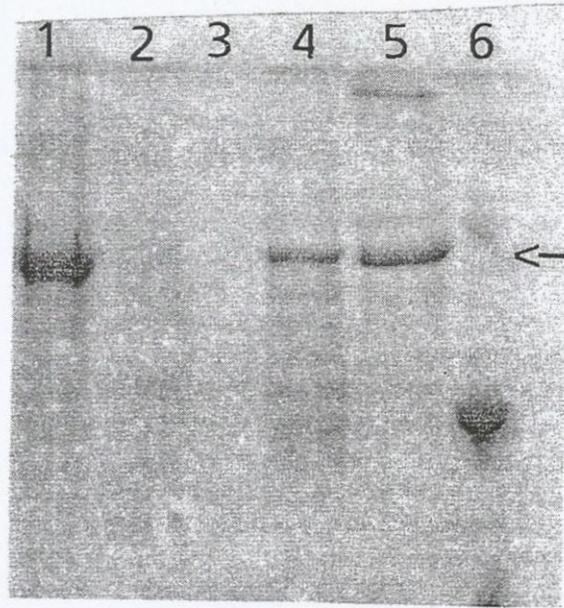
Dalam pengamatan diperoleh satu macam partikel virus berbentuk bulat. Diameter virion rata-rata 30 nm. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya, yang menyatakan bahwa virion SSV berbentuk bulat (Roechan *et al.*, 1975), dan virus termasuk anggota kelompok *Cucumovirus*.

b. Absorbansi ultraviolet — Pengamatan dengan spektrofotometer terhadap sediaan virus menunjukkan pola absorpsi ultraviolet seperti virus RNA lainnya. Absorpsi maksimal terjadi pada panjang gelombang 260 nm, sebesar 1,594 dan absorpsi pada 280 nm sebesar 1,029. Nisbah $A_{260}/A_{280} = 1,55$. Menurut CMI (1980) untuk anggota *Cucumovirus* nisbah tersebut adalah 1,65, sehingga dapat disimpulkan bahwa sediaan virus yang dihasilkan masih mengandung protein lain, selain *coat protein* virus. Karena itu metode pemurnian virus perlu diperbaiki, agar sediaan virus yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian yang tinggi, dan nantinya dapat digunakan sebagai imunogen. Kontaminasi protein lain akan berpengaruh terhadap afinitas dan spesifisitas antibodi yang dihasilkan (Regenmortel, 1992).

c. Elektroforesis pada gel poliakril amida — Hasil elektroforesis protein diperoleh satu jenis protein dengan berat molekul lebih kecil dari 29 kD (Gambar 4).

Hasil ini menunjukkan bahwa Virus Kerdil Kedelai memiliki kapsid protein yang hanya tersusun dari subunit protein yang seragam, seperti pada virus lain anggota *Cucumovirus*. Berbeda dengan CMV yang memiliki subunit protein dengan BM 26 kD (Francki, 1985), virus Kerdil Kedelai memiliki berat molekul subunit protein lebih besar dari 26 kD tetapi lebih kecil dari 29 kD. Protein tersebut sama dengan yang diperoleh dari ekstraksi tanaman kedelai terinfeksi SSV. Pada ekstrak daun tembakau

bebas virus yang berasal dari kultur jaringan tidak ditemukan protein. Ini membuktikan bahwa protein tersebut adalah protein viral.



Gambar 4. Elektroforesis pada gel poliakril amida. (1) sediaan virus, (2) dan (3) ekstrak daun tembakau bebas virus dari kultur jaringan, (4) ekstrak daun kedelai terinfeksi SSV, (5) ekstrak daun tembakau Xanthi terinfeksi SSV, (6) penanda. Anak panah menunjukkan *coat protein*.

Kesimpulan penelitian adalah isolasi Virus Kerdil Kedelai dapat dilakukan dengan baik pada *C. amaranticolor* dan kemudian diperbanyak pada tembakau Xanthi. Partikel virus kerdil kedelai berbentuk isometrik, dengan diameter 30 nm. Nisbah absorpsi ultraviolet pada 260 nm 280 nm sebesar 1,55 menandakan bahwa metode pemurnian virus perlu diperbaiki, sehingga sediaan virus tidak terkontaminasi oleh protein tumbuhan. Subunit protein penyusun kapsid terdiri atas satu tipe protein, dengan berat molekul 29 kD.

Penelitian ini merupakan sebagian dari Proyek Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi Tahun 1996/1997. Penulis pertama merupakan Peneliti Utama dalam proyek tersebut, dan yang lain merupakan anggota tim peneliti. Kepada Pimpinan Proyek Penelitian Hibah Bersaing Perguruan Tinggi, Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi diucapkan terima kasih atas segala pembiayaannya.

DAFTAR PUSTAKA

- Ball, E.M. 1974. *Serological test for identification of plant viruses*. Amer. Phytoph. Soc. Inc., St. Paul, Minnesota. 32p.
- C.M.I. 1970. *Description of Plant Viruses*. No. 1
- Francki, R.I.B. 1972. Purification of viruses. *Dalam: Principles and techniques in plant virology* (Eds C.I. Kado and H.O. Agrawal). Van Nostrand Reinhold Co. New York.
- Roechan, M., M. Iwaki and D.M. Tantera 1975. Virus disease of legume plants in Indonesia. 2. Soybean stunt virus. *Centr. Res. Inst. Agric. Bogor*, 15 : 1 - 16.
- Sinclair, J.B. 1993. *Compendium of soybean disease*. 2nd ed. Amer. Phytoph. Soc. St. Paul, Minn. 106 p.
- Somowiyarjo, S., N. Sako, and F. Nonaka. 1988. The use of monoclonal antibody for detecting zucchini yellow mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 54: 436 - 443.
- Somowiyarjo, S., N. Sako and F. Nonaka. 1990. Production and characterization of monoclonal antibodies to watermelon mosaic virus. 2. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56: 541 - 548.
- Suseno, R. 1987. *Virus terbawa benih tanaman pangan serta hubungannya dengan sertifikasi dan pengawasan mutu benih*. Lokakarya Patogen Terbawa Benih dalam rangka Pengembangan Pengawasan Mutu dan Sertifikasi Benih. Bogor.
- Van Regenmortel, M.H.V. 1981. *Serology of plant viruses*. Acad. Press., New York.