

PENYAKIT MOSAIK PISANG, REAKSI INANG DAN PEMURNIAN VIRUS
(BANANA MOSAIC DISEASE, HOST REACTION AND VIRUS PURIFICATION)

Y.B.Sumardiyono, Sri Sulandari dan Edy Purnawan
Laboratorium Virologi Tumbuhan Fakultas Pertanian UGM

ABSTRACT

*Banana var. Koja showed mosaic symptoms obtained in Kotagede, Yogyakarta used in the studies. The virus was then isolated with single lesion method on *Chenopodium amaranticolor*, and propagated on *Nicotiana tabacum var. Xanthi*. The results of host reaction study showed that infected *Nicotiana tabacum var. Xanthi*, *N. tabacum var. Samsun* and *Cucumis sativus* and *Lycopersicon esculentum* produced systemic symptoms, while *Chenopodium amaranticolor* produced necrotic local lesions. Infected *Vigna unguiculata* did not produce any symptom. The purified virus obtained with the method of Scott showed $A_{260}/A_{280} = 1.21$, with single protein m.w. 24.0×10^3 . Virus showed serological relationship to CMV. All the results indicated that causal agent of banana mosaic disease has some similar properties with CMV.*

Key words: CMV, banana diseases, host reaction

INTISARI

Pisang jenis *Koja* menunjukkan gejala mosaik diperoleh dari Kotagede, Yogyakarta digunakan sebagai bahan kajian. Virus penyebab penyakit mosaik diisolasi dengan cara belur tunggal pada *Chenopodium amaranticolor*, dan dikembangkan pada tembakau var. *Xanthi*. Hasil uji reaksi inang pada tanaman indikator virus tumbuhan menunjukkan bahwa virus menyebabkan gejala sistemik pada *Nicotiana tabacum var. Xanthi*, *N. tabacum var. Samsun*, *Cucumis sativus* dan *Lycopersicon esculentum*; sedangkan pada *Chenopodium amaranticolor* menyebabkan belur setempat, dan pada *Vigna unguiculata* tidak menunjukkan gejala. Pemurnian virus menghasilkan sediaan virus dengan nisbah $A_{260}/A_{280} = 1,21$ dengan satu jenis protein berat molekul sebesar $24,0 \times 10^3$. Virus memiliki hubungan serologi dengan CMV. Hasil pengkajian tersebut menunjukkan virus penyebab penyakit mosaik pisang memiliki beberapa sifat CMV.

Kata kunci: CMV, penyakit pisang, reaksi inang

PENGANTAR

Penyakit mosaik pada pisang pertama kali dilaporkan di New South Wales pada tahun 1929 dan di Amerika Tengah pada tahun 1957 (Bird dan Wellman, 1962; Niblett *et al.*, 1994). Saat ini penyakit terdapat hampir di semua negara penghasil pisang. Penyakit juga telah ditemukan di Indonesia, antara lain di Yogyakarta dan Bogor (Sri Sulandari, 1993; Suastika *et al.*, 1996). Gejala penyakit dimulai dari daun muda, berupa garis hijau terang atau kekuningan yang meluas ke seluruh helaian daun. Kemudian berkembang menjadi mosaik sistemik. Garis-garis kuning yang tampak pada awal gejala dapat berubah menjadi

nekrotik. Tanaman pisang yang terinfeksi sejak dini dapat mengalami kekerdilan dan bentuk daun berubah (Niblett, 1994).

Hasil penelitian di negara lain kebanyakan menunjukkan bahwa penyakit mosaik pada pisang disebabkan oleh suatu strain dari CMV. Virus lain yang pernah dilaporkan dapat menyebabkan gejala mosaik pada pisang adalah Banana Streak Virus (BSV) (Wardlaw, 1972; Lockhart, 1986).

Penelitian berikut mengkaji reaksi tanaman indikator virus tumbuhan terhadap penyebab penyakit mosaik pada pisang, dan cara pemurnian virus berdasar metode pemurnian CMV menurut Scott (1963).

BAHAN DAN CARA PENELITIAN

Isolat virus - Virus yang digunakan dalam penelitian berasal dari tanaman pisang *Koja* yang menunjukkan gejala mosaik di lapangan. Tanaman sakit diperoleh dari Kotagede, Yogyakarta. Isolasi virus dilakukan dengan metode belur tunggal pada *Chenopodium amaranticolor*. Isolat yang diperoleh dikembangkan pada *Nicotiana tabacum* var *Xanthi*.

Reaksi inang - Uji reaksi tanaman indikator terhadap virus penyebab mosaik pisang dilakukan pada *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*, *N. tabacum* var *Samsun*, mentimun (*Cucumis sativus*), kacang panjang (*Vigna unguiculata*) dan tomat (*Lycopersicon esculentum*). Penularan ke tanaman indikator dilakukan secara mekanik dengan cairan tanaman sakit. Cairan tanaman sakit dibuat dalam bufer sitrat 0,5 M, pH 6,5 yang mengandung 0,1% asam tioglikolat. Abrasif yang digunakan adalah serbuk karborundum 600 mesh.

Pemurnian virus - Pemurnian virus berdasar pada cara pemurnian CMV yang dikemukakan oleh Scott (1963). Cara ini dipilih karena kebanyakan mosaik pisang disebabkan oleh suatu strain CMV. Sebelum diekstraksi sumber virus dibekukan pada suhu -20°C. Ekstraksi dalam bufer sitrat 0,5 M, pH 6,5 yang mengandung asam tioglikolat 0,1%. Perbandingan antara daun dengan bufer ekstraksi 1:1 (b/v). Larutan penjernih digunakan kloroform, yang ditambahkan pada bufer ekstraksi dengan perbandingan 1:1 (v/v). Fase air yang diperoleh setelah ekstraksi disaring dan kemudian sentrifugasi pada 7000 x g selama 5 menit. Supernatan yang diperoleh kemudian disentrifugasi ultra pada 79000 x g selama 60 menit. Pelet yang diperoleh diresuspensikan dalam bufer borat 0,005 M pH 9,0, dan dibersihkan dengan sentrifugasi pada 7000 x g selama 5 menit, supernatan yang diperoleh adalah sediaan virus murni. Pengamatan virus yang diperoleh meliputi infektivitas relatif, spektrofotometri UV, uji serologi terhadap antibodi CMV, dan selubung protein virus (*coat protein*).

Infektivitas relatif - Pengujian dilakukan dengan inokulasi mekanik pada setengah daun *C. amaranticolor*. Setengah daun yang lain dipakai sebagai pembanding. Infektivitas relatif dinyatakan dalam jumlah belur setempat yang terjadi.

Uji serologi - Uji serologi dengan cara ELISA tak langsung. Hasil serologi dinyatakan dalam perbandingan nilai A_{405} sampel dengan A_{405} hasil pengamatan tanaman sehat.

Elektroforesis - Elektroforesis dalam gel poliakrilamide yang mengandung SDS bertujuan untuk mengamati berat molekul selubung protein, menurut metode Lemmli. Pewarnaan gel dengan *Coomassie brilliant blue*. Berat molekul coat protein ditentukan dengan membandingkan terhadap standar berat molekul yang terdiri atas Albumin (66 kD), carbonic anhydrase (29 kD), Cytochrom C (12,4 kD), dan Aprotinin (6,5 kD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala dan isolasi virus - Tanaman pisang sakit yang dijadikan sumber isolat virus menunjukkan gejala daun berupa gambaran mosaik berwarna kuning muda dan garis-garis hijau tua (Gambar 1).



Gambar 1. Gejala mosaik pada daun pisang yang baru tumbuh dari tunas.
Figure 1. Mosaic symptom on new emerging banana leaf

Isolasi virus dengan metode belur setempat pada *Chenopodium amaranticolor* dapat berhasil bila inokulum yang digunakan lebih dahulu diencerkan dengan bufer ekstraksi. Penambahan asam tioglikolat dapat meningkatkan infektivitas inokulum. Keberhasilan isolasi virus dengan cara bercak tunggal antara lain ditentukan oleh keadaan inokulum. Senyawa-senyawa fenol, asam organik, musilase, beberapa protein tertentu dan enzim khususnya ribonuklease bila terdapat dalam cairan inokulum dapat menggagalkan isolasi virus (Goodman *et al.*, 1991). Hasil inokulasi mekanik menunjukkan bahwa cairan daun pisang mengandung penghambat infeksi virus, sehingga dapat menurunkan infektivitas inokulum. Efek penghambat berkurang bila inokulum diencerkan dengan bufer yang ditambah asam tioglikolat.

Reaksi inang - Kajian reaksi tanaman indikator virus tumbuhan terhadap infeksi virus mosaik pada pisang disajikan dalam tabel 1.

Tabel 1. Reaksi inang terhadap virus penyebab mosaik pisang
Table 1. Host reaction to banana mosaic causal agent virus

Tanaman indikator Indicator plant	Hasil Results
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	K, Bs
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi	MS
<i>N. tabacum</i> var. Samsun	MS
<i>Cucumis sativus</i>	MS
<i>Vigna unguiculata</i>	-
<i>Lycopersicon esculentum</i>	M, KS

Keterangan (Notes):

K : klorotik (*chlorotic*); Bs : belur setempat (*local lesion*); M : mosaik (*mosaic*); S : sistemik (*systemic*); K = klorotik (*chlorotic*); - : tidak bergejala (*symptomless*).

Tabel 1 menunjukkan bahwa infeksi virus pada *N. tabacum* var. Xanthi, *N. tabacum* var. Samsun dan *C. sativus* menyebabkan gejala mosaik sistemik; pada *C. amaranticolor* menyebabkan gejala klorosis setempat dan belur setempat, dan pada *V. unguiculata* tidak memberikan gejala.

Kecuali *V. unguiculata*, tanaman indikator menunjukkan reaksi yang sama dengan reaksi tanaman tersebut terhadap CMV (Francki *et al.*, 1979; Kurstak, 1981). Infeksi CMV pada beberapa kultivar *Vigna unguiculata* dapat menyebabkan nekrotik setempat, tetapi kebanyakan kultivar tidak memberikan gejala.

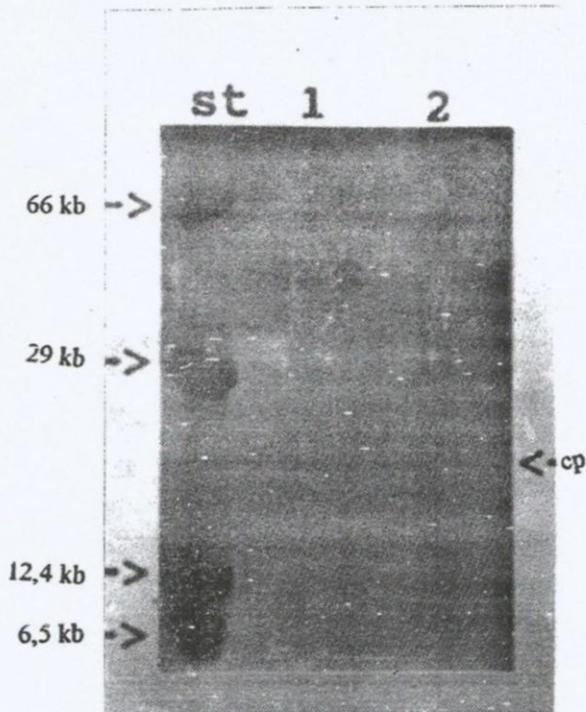
Purifikasi - Konsentrasi relatif virus pada beberapa tahap purifikasi dipantau dengan uji infektivitas relatif pada *C. amaranticolor*. Salah satu tujuan pemantauan untuk menguji apakah cara pemurnian yang dipilih dapat diterapkan untuk virus yang dikaji. Pemantauan dilakukan terhadap hasil tahap ekstraksi, hasil sentrifugasi kecepatan rendah dan hasil akhir pemurnian setelah disuspensikan kembali (resuspensi) dalam bufer borat. Hasil uji tercantum dalam tabel 2.

Tabel 2. Infektivitas relatif virus
Table 2. Relative infectivity of virus

Tahap purifikasi Stage of purification	Jumlah belur setempat Number of local lesion
Ekstraksi (<i>Extraction</i>)	49
Sentrifugasi I (<i>Centrifugation I</i>)	30
Hasil akhir (<i>Final results</i>)	23,8

Infektivitas relatif virus menunjukkan penurunan antara tahap awal dengan tahap berikutnya. Penurunan dapat disebabkan terjadinya inaktivasi virus selama proses pemurnian baik karena adanya agen inaktivasi virus. Meskipun terjadi penurunan infektivitas relatif, hasil akhir pemurnian masih diperoleh sediaan virus. Pengamatan sediaan virus yang diperoleh dengan spektrofotometri diperoleh nisbah antara $A_{260}/A_{280} = 1,21$. Pola absorpsi ultra violet tersebut dekat dengan CMV. Menurut Brunt (1995), pada anggota Cucumovirus nisbah tersebut akan diperoleh 1,3. Nilai nisbah yang sedikit lebih kecil dapat disebabkan sediaan virus yang diperoleh masih terkontaminasi dengan protein tanaman.

Elektroforesis - Pada pengamatan protein dengan SDS - PAGE diperoleh satu jenis protein dengan berat molekul sekitar 24 kD (Gambar 2). Berarti virus yang dikaji hanya memiliki satu jenis protein, yaitu selubung protein (*coat protein*).



Gambar 2. SDS-PAGE protein.
Figure 2. Protein SDS - PAGE.

Bila selubung protein virus tumbuhan kelompok Cucumovirus, salah satu anggotanya adalah CMV, terdiri atas 180 struktur subunit protein sejenis, dengan berat molekul masing-masing subunit antara $23 - 26 \times 10^3$ Dalton (Francki, 1985), hasil ini menandakan bahwa sediaan virus yang diperoleh dari purifikasi merupakan anggota kelompok Cucumovirus.

Serologi - Hasil uji serologi memakai antibodi CMV disajikan dalam tabel 3.

Tabel 3. Uji serologi dengan antibodi CMV
Table 3. Serological test with antibodies against CMV

Antigen (<i>Antigen</i>)	Hasil (<i>Result</i>) ^a
Cairan tanaman (<i>Sap of</i>) :	
Pisang sakit mosaik (<i>Diseased banana</i>)	1,93/++
Pisang sehat (<i>Healthy banana</i>)	1 / -
Tembakau terinfeksi CMV (<i>CMV infected tobacco</i>)	2,03/+++
Sediaan virus murni (<i>Purified virus</i>)	2,10/+++

Keterangan (Note):

^a $A_{405 \text{ nm}}$ sampel (*sample*) / $A_{405 \text{ nm}}$ pisang sehat (*healthy banana*).

Sediaan virus, dan cairan tanaman pisang sakit dan tembakau terinfeksi CMV memberikan reaksi positif terhadap antibodi CMV, dan absorpsi 405 nm sekitar dua kali dari pada tanaman sehat.

Hasil serologi memperkuat dugaan bahwa sediaan virus yang diperoleh dari purifikasi memiliki kekerabatan serologi terhadap CMV. Seberapa jauh kekerabatan serologik antara CMV dengan virus penyebab mosaik pisang perlu dikaji lebih lanjut.

Kesimpulan penelitian menunjukkan bahwa berdasar reaksi tanaman indikator, pengamatan spektrofotometri ultra violet dan berat molekul subunit protein hasil akhir purifikasi, dan uji serologi, virus penyebab mosaik pisang yang dikaji, menunjukkan sifat-sifat CMV.

PENUTUP

Sebagian dari penelitian ini telah ditulis sebagai skripsi oleh penulis ketiga, di bawah bimbingan penulis pertama dan kedua; pada bulan Mei 1995.

DAFTAR PUSTAKA

- Bird, J. dan F.L. Wellman. 1962. A mosaic disease of musaceous crops in Puerto Rico. *Phytopathology* 52: 286 (Abs.)
- Brunt, A.A. 1995. Plant virus names. *Dalam: Virus and virus-like disease of bulb and flower crops*. John Wiley, New York.

- Francki, R.I.B., D.W. Mossop, dan T. Hatta. 1979. Cucumber mosaic virus. *Description of plant viruses*, No. 213. Commonw. Mycol. Inst., Kew, England.
- Goodman, R.N., Z. Kiraly dan K.R. Wood. 1986. *Biochemistry and physiology of plant disease*. Univ. Missouri Press, Columbia.
- Kurstak, E. 1981. *Handbook of plant virus infections and comparative diagnosis*. Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam.
- Lockhard, B.E.L. 1986. Purification and serology of bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76: 995 - 999.
- Niblett, C.L., S.S. Papu, J. Bird dan R. Lastra. 1994. Infectious chlorosis, mosaic, and heart rot. *Dalam : Banana diseases caused by virus - Compendium of Tropical Fruit Diseases*. APS Press.
- Scott, H.A. 1963. Purification of cucumber mosaic virus. *Virology* 20: 103 - 106.
- Sri Sulandari, 1993. Penyakit mosaik pada tanaman pisang. *Kumpulan intisari makalah Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia XII*, Yogyakarta 6 - 8 September 1993. (Abstr.)
- Suastika, G., K. Tomaru, J. Kurihara dan K.T. Natsuaki. 1996. A cucumber mosaic Cucumovirus isolate from banana mosaic disease in Indonesia. *Dalam: Biological control in sustainable tropical agriculture*. NODAI Center Internat. Progr., Tokyo University of Agriculture, 60 - 71.
- Wardlaw, C.W. 1972. *Banana disease*, 2nd ed. Longman, London.