

UPAYA PENYEDIAAN VIRUS MURNI UNTUK PEMBUATAN ANTISERUM *Soybean Mosaic Virus*

Wuye Ria Andayanie ¹⁾

ABSTRAK

Upaya penyediaan virus murni untuk pembuatan antiserum *Soybean mosaic virus* (SMV). SMV merupakan salah satu penyebab penyakit mosaik penting pada kedelai (*Glycine max* L. Merr.) karena dapat mengakibatkan penurunan hasil hingga 57%. Hingga saat ini SMV masih merupakan salah satu kendala bagi peningkatan produksi kedelai. Hingga saat ini, pemuliaan tanaman kedelai lebih diarahkan untuk hasil tinggi, belum ada program pemuliaan untuk ketahanan terhadap penyakit *soybean mosaic virus*. Pemurnian virus merupakan salah satu langkah penting untuk kajian suatu virus dan pengelolaan penyakit virus tersebut. Virus murni dapat diisolasi dari satu luka lokal (*local lesion*) pada *Chenopodium amaranticolor* yang diinokulasi SMV. Tanaman untuk perbanyakan virus (*propagative plants*) kebanyakan berbeda dengan tanaman inangnya. Pada SMV hanya diperbanyak pada tanaman kedelai. Salah satu faktor untuk keberhasilan pemurnian virus adalah perbanyakan virus pada tanaman inang yang tepat. Metode pemurnian sangat ditentukan oleh karakter virus. Sifat-sifat kimia fisika protein dan asam nukleat yang berbeda antara virus atau strain virus akan menyebabkan metode pemurnian virus sangat bervariasi. Virus murni ini digunakan untuk karakterisasi virus dan pembuatan antiserum. Identifikasi SMV dengan memanfaatkan reaksi antara antigen dan antibodi telah banyak diaplikasikan sebagai alat deteksi keberadaan virus pada tanaman dan evaluasi genotipe sebagai sumber gen dalam program pemuliaan untuk ketahanan terhadap SMV berdaya hasil tinggi.

Kata kunci: SMV, *Glycine max*, antiserum, genotipe

ABSTRACT

Soybean mosaic virus (SMV) purification and antisera production. SMV is one of the most important viruses which causes mosaic disease on soybean (*Glycine max* L. Merr.). SMV is one of the obstacles to increase soybean production, because

breeding programs are still more focus on high yield than disease resistant. Purification of this virus is an important step to study a virus characteristic and virus management. Purified virus can be used for characterization of the virus as well as for antisera production. Pure virus can be isolated from one local lesion on *Chenopodium amaranticolor* inoculated by the SMV. Most viruses are propagated in different hosts, however, for the SMV, this virus is propagated in soybean crops. Selection of hosts for virus multiplication is an important step for the success of virus purification. A purification method is determined by the virus characteristics. Different physicochemical properties of the proteins and nucleic acids between virus strains or viruses will influence virus purification methods, which also influencing SMV antisera production. SMV identification employing the reaction between antigens and antibodies has been widely applied as a tool for virus detection and genotype evaluation as a source of resistance genes in breeding programs to obtain SMV resistant soybeans with high yield.

Keywords: SMV, *Glycine max*, genotype, antiserum.

PENDAHULUAN

Produksi kedelai pada tahun 2013 sebesar 779,99 ribu ton biji kering atau mengalami penurunan sebesar 63,16 ribu ton (7,49%) dibandingkan tahun 2012. Pada tahun 2014, produksi kedelai diperkirakan sebesar 892,60 ribu ton. Peningkatan produksi tersebut akibat kenaikan luas panen seluas 50,44 ribu hektar (9,16%) dan produktivitas sebesar 0,69 kuintal/hektar (4,87%) (Badan Pusat Statistik 2014). Hingga kini, penyakit mosaik masih merupakan salah satu kendala bagi peningkatan produksi kedelai, karena program pemuliaan tidak ditujukan pada ketahanan penyakit tetapi lebih diarahkan hanya terhadap hasil yang tinggi. Di Indonesia, salah satu penyakit mosaik kedelai disebabkan oleh *Soybean mosaic virus* (SMV).

Berdasarkan klasifikasi virus, SMV termasuk genus *Potyvirus* dalam famili *Potyviridae*. Diagnosis virus dapat dilakukan secara *biological*, *serological* dan *molecular* (Mulholland 2009; Wang 2009). Uji serologi menggunakan reaksi antigen dan antibodi merupakan salah satu cara untuk mendeteksi dan mengidentifikasi SMV dalam biji dan tanaman kedelai (Ahangaran et

¹⁾ Staf Pengajar Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Merdeka Madiun, Jl. Serayu no 79 Madiun 63133 email wuye_andayanie@yahoo.com

Naskah diterima tanggal 26 Oktober 2013; disetujui untuk diterbitkan tanggal 30 September 2014.

Diterbitkan di Buletin Palawija No. 28: 84–92 (2014).

al. 2009; Andayanie 2012a; Andayanie 2012b). Langkah awal membuat antibodi dilakukan dengan mengisolasi virus dari inangnya. Isolasi ini dilakukan dengan cara pemurnian virus, dan selanjutnya virus murni tersebut digunakan sebagai bahan dasar pembuatan antiserum (Lima *et al.* 2011).

Virus yang tidak dimurnikan dari inangnya, apabila dijadikan antigen akan menghasilkan antibodi yang bereaksi dengan virus dan bagian tanaman yang tersisa, sehingga mengimbas terbentuknya antibodi yang tidak bereaksi spesifik terhadap virus yang dideteksi (Andayanie *et al.* 2011). Antigen yang berasal dari virus murni akan mempunyai spesifitas antibodi poliklonal yang tinggi (Syamsuri dan Wardani 2013). Antibodi poliklonal dapat digunakan untuk mendeteksi virus dalam benih dan evaluasi ketahanan genotype kedelai terhadap infeksi SMV (Kuroda *et al.* 2010; Masuni *et al.* 2011; Andayanie dan Adinurani 2013).

Menurut Van Regenmortel (2012) ada empat prinsip dasar untuk memurnikan virus yaitu (1) propagasi virus pada tanaman inang yang sesuai untuk memperoleh konsentrasi virus yang tinggi dan kandungan senyawa penghambat yang rendah sebagai sumber virus dalam proses pemurnian; (2) pemilihan media homogenisasi menggunakan penyangga pada molaritas dan pH larutan serta penambahan bahan aditif yang tepat untuk mengurangi aktivitas enzim inhibitor saat ekstraksi jaringan tanaman sakit agar virus tidak kehilangan infektifitasnya; (3) perlakuan klarifikasi yang dapat menghilangkan komponen-komponen tanaman inang dalam jumlah semaksimal mungkin, seperti mitokondria dan menghilangkan partikel virus semaksimal mungkin; (4) menambah kloroform dan butanol untuk mendenaturasi lemak atau protein tanpa merusak struktur virus; (5) pemisahan virus dari komponen tanaman dengan presipitasi partikel menggunakan *polyethylene glycole* (PEG). Cara ini dilakukan dengan ultrasentrifugasi dan gradien kepekatan sukrosa untuk memisahkan partikel virus berdasarkan bentuk, ukuran, dan berat jenisnya.

Kesulitan pemurnian SMV biasanya terjadi karena kegagalan pada salah satu langkah yang harus dikerjakan pada tahapan yang dipakai. Pengendapan virus selain dilakukan dengan cara fisik yaitu sentrifugasi pada kecepatan tinggi dan rendah, dapat juga dilakukan dengan jalan presipitasi dengan menambah bahan-

bahan kimia pada larutan atau sedimennya sebelum dilakukan sentrifugasi pada kecepatan tinggi dan rendah. Keberadaan ion $MgCl_2$ pada sentrifugasi gradien akan menurunkan infektivitas virus. Ion Mg^{++} atau Na-EDTA dengan molaritas rendah di dalam bufer resuspensi akan meningkatkan infektifitas virus. Pengaruh penggunaan ion dihydric mampu mengikat subunit dari selubung protein, selain dapat menyebabkan agregasi dari partikel virus. Ion Ca^{++} dan Mg^{++} diperlukan untuk mengurangi pengaruh negatif dari Na-EDTA yang banyak digunakan sebagai senyawa pengkelat pada proses pemurnian virus. Ion Ca^{++} dan Mg^{++} sangat penting dalam mempertahankan integritas pada partikel virus dan proses metabolisme sel inang. Selain itu cara ini dapat menghalangi pengaruh negatif dari Na-EDTA yang dapat merusak partikel virus (Hull 2013).

Sifat-sifat kimia fisika protein dan asam nukleat yang berbeda antara virus atau strain virus menyebabkan metode pemurnian virus sangat bervariasi. Pemurnian virus berbentuk batang lentur (*flexuous*) dilaporkan sering terjadi kehilangan virion dalam jumlah yang sangat besar karena terjadi agregasi partikel virus. Selain itu konsentrasi virus dalam inang sangat rendah, ukuran partikel yang relatif kecil dan lokasi virus dalam tanaman berada di dalam inti sel floem. Mengingat arti penting pemurnian virus untuk pembuatan antiserum dan deteksi SMV serta evaluasi plasma nutfah tahan SMV, maka pemurnian virus perlu mendapat perhatian.

ISOLASI DAN PERBANYAKAN VIRUS

Isolasi bertujuan untuk mendapatkan isolate SMV yang murni, terbebas dari virus yang lain. Isolasi virus dapat dilakukan dengan menginokulasikan virus yang berasal dari tanaman kedelai dengan gejala mosaik ke tanaman *Chenopodium amaranticolor*. Gejala bercak lokal diperoleh kurang lebih tujuh hari setelah inokulasi (Andayanie *et al.* 2011; Andayanie dan Adinurani 2013). Infeksi SMV pada daun tanaman *Phaseolus vulgaris* cv. Topcrop juga menghasilkan bercak nekrotik pada tulang daun, dua atau tiga hari setelah inokulasi (Li *et al.* 2010). Gejala bercak lokal dan nekrotik yang ukuran dan bentuknya seragam diseleksi dan dikumpulkan. Inhibitor pada sap *C. amaranticolor* dan *P. vulgaris* cv. Topcrop lebih tinggi dibandingkan pada sap kedelai, sehingga mempengaruhi konsentrasi awal dari SMV isolat

Yogyakarta. Oleh karena itu, dari gejala bercak lokal pada tanaman *C. amaranticolor*, diinokulasikan kembali ke tanaman kedelai.

Selanjutnya SMV diperbanyak pada kedelai sebagai tanaman perbanyak (*propagative plant*). Propagasi ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi virus yang tinggi dan kandungan senyawa penghambat yang rendah sebagai sumber virus pada proses pemurnian. Pola translokasi, multiplikasi dan inaktivasi strain SMV pada tanaman kedelai mempunyai perbedaan. Uji ELISA menunjukkan strain B dari SMV terdeteksi pada seluruh jaringan daun. Konsentrasi SMV strain D menurun lebih cepat daripada SMV strain B, walaupun SMV strain D konsentrasinya lebih tinggi dibandingkan SMV strain B pada hari ke 10 setelah inokulasi ke tanaman kedelai (Iwai dan Wakimoto 1985).

Jenis tanaman perbanyak menentukan keberhasilan pemurnian. Tanaman inang perbanyak yang baik harus mempunyai kandungan senyawa penghambat (*inhibitor*) yang rendah. Multiplikasi virus berlangsung baik pada tanaman kedelai, walaupun hal ini masih dibatasi dengan adanya strain SMV. Famili Leguminosa mempunyai kandungan tanin dan asam organik serta fenol yang rendah. Kandungan senyawa ini yang tinggi dapat menginaktifkan virion dalam proses pemurnian karena berfungsi sebagai inhibitor. Kondisi lingkungan tanaman perbanyak seperti: suhu, unsur hara, umur tanaman saat diinokulasi dan dipanen akan mempengaruhi konsentrasi virus. Waktu pemanenan daun yang tepat menentukan posisi daun yang rentan terhadap infeksi virus. Tanaman perbanyak digunakan untuk memperoleh partikel virus dengan konsentrasi yang tinggi sebagai sumber virus pada proses pemurnian (Arogundade *et al.* 2009; Andayanie dan Adinurani 2013).

PEMURNIAN VIRUS

Virus murni sangat diperlukan terutama untuk pembuatan antiserum. Beberapa kendala yang sering terjadi pada proses pemurnian SMV adalah terjadinya agregasi dan pematihan partikel serta penguraian oleh enzim proteolitik pada sentrifugasi, filtrasi yang menggunakan senyawa-senyawa organik, proses penyimpanan serta pengasaman. Supernatan hasil ultra sentrifugasi kedua menggunakan kecepatan

78.000 x g selama 90 menit tidak dilakukan resuspensi dan ultrasonikasi selama 30 detik serta sentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit. Selain itu penambahan suplemen yang terdiri atas 0,01 M Natrium-dietildithiocarbamat (Na-DIECA), 0,01 M $MgCl_2$, dan 0,005 M Na-EDTA menunjukkan tingkat kemurnian dan rendemen hasil pemurnian yang bervariasi. Hal ini berbeda dengan resuspensi dengan ultrasonifikasi selama 10–30 detik dan sentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit serta gradien sukrosa tanpa suplemen yang dilakukan oleh Iwai dan Wakimoto (1985). Oleh karena itu modifikasi pemurnian disesuaikan dengan sifat dan jenis virusnya. Isolat SMV dari Yogyakarta dan Jawa Timur telah berhasil dimurnikan berdasarkan metode Iwai dan Wakimoto (1985) dengan modifikasi (Andayanie *et al.* 2013).

Klarifikasi

Perlakuan klarifikasi bertujuan untuk menghilangkan komponen-komponen tanaman inang dalam jumlah semaksimal mungkin dan menghilangkan partikel virus semaksimal mungkin (Kuhn dan Jahrling 2010). Langkah tersebut dilakukan dengan melumatkan daun kedelai hasil perbanyak dengan homogenizer, menggunakan Bufer ekstraksi 0,3 M Natrium Fosfat pH 7,0 dengan perbandingan 1:2 (b/v) dan mengandung senyawa pengkelat 0,01 Na-DIECA serta senyawa untuk klarifikasi yaitu 8% (v/v) kloroform dan butane serta memutar di sentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit.

Media homogenisasi yang tepat dapat mengurangi inhibitor yang terdapat pada tanaman sebagai bahan pemurnian SMV dan virus tidak kehilangan infektivitasnya. Homogenisasi dapat dilakukan dengan larutan penyangga dengan molaritas dan pH yang tepat serta penambahan bahan aditif seperti antioksidan atau bahan pengkelat (*chelating agents*) seperti Natrium dietildithiokarbamat (Na-DIECA) (Andayanie dan Adinurani 2013). Selain itu immunoprecipitasi dapat mempercepat pemurnian SMV dengan jumlah jaringan yang sedikit (Seo *et al.* 2013).

Beberapa pelarut organik seperti n-Butanol dan kloroform mampu mendenaturasi protein dan lemak yang terdapat di dalam mitokondria, kloroplas, dan retikulum endoplasmik. Kebanyakan protein tidak dapat mengendap pada sentrifugasi kecepatan tinggi dan masih terdapat di dalam fraksi supernatan. Oleh karena itu media yang digunakan dalam mengekstraksi

jaringan tanaman harus dirancang agar dapat menghilangkan makro molekul yang berasal dari tanaman inang serta meninggalkan partikel virus yang mempunyai infektivitas tinggi. Penggunaan Triton X-100 dan karbon tetra klorida sebagai pelarut organik terbukti tidak efektif (van Regenmortel 2012).

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) metode Leammli (Anonim 1987) digunakan untuk mengkaji: (1) pengaruh kloroform dan butanol setelah proses homogenisasi dengan penyimpanan bahan tanaman pada -70°C ; (2) penggunaan bufer ekstraksi Na-fosfat 0,3 M pH 7,0 yang mengandung senyawa pengkelat, antioksidan, dan Na-Dieca 0,01 M. Dengan cara tersebut kontaminan dari bahan tanaman mampu dihilangkan dengan denaturasi protein fungsional. Hal ini sebagai usaha meningkatkan efektivitas dalam proses pemurnian (Andayanie dan Adinurani 2013).

Pemisahan dan Pemadatan Virus

Pemisahan virus dari komponen tanaman dapat dilakukan dengan presipitasi partikel menggunakan Polietilen glikol (PEG). Kemampuan mempresipitasi tergantung pada konsentrasi dan jumlah garam yang digunakan. Kelarutan dari garam tergantung pada pH dan temperatur, sehingga fungsi NaCl memberikan pemanasan yang stabil dari RNA.

Dengan visualisasi SDS-PAGE pada konsentrasi gel 15% dengan perlakuan PEG 6000-6% dan NaCl 0,1 M yang dikombinasikan dengan perlakuan klarifikasi menunjukkan selubung protein yang makin jelas dibandingkan saat klarifikasi (Andayanie dan Adinurani 2013).

Partikel virus merupakan molekul protein yang larut karena partikel virus dapat bermuatan positif ataupun negatif tergantung kondisi ion larutan yang dapat mengikat molekul air. Penambahan reagen dapat menetralkan muatan tersebut agar mampu presipitasi. Partikel virus akan mengendap pada sentrifugasi kecepatan rendah setelah presipitasi. PEG dengan konsentrasi 6% dan NaCl 0,1 M banyak digunakan untuk presipitasi pada SMV (Iwai dan Wakimoto 1985).

PEG merupakan polimer dari rantai panjang etilen dengan rumus molekul $\text{HO-CH}_2\text{-(CH}_2\text{-OCH}_2\text{)}_n\text{-CHOH}$. PEG larut dalam air, bersifat anhidrous dan mampu menyerap air. PEG dapat mengendapkan partikel virus dengan dehidrasi partikel virus. Oleh karena itu PEG banyak di-

gunakan dalam proses pemurnian virus (Biswal *et al.* 2008; Gunturu dan Maravadi 2012).

Resuspensi

Resuspensi ditambahkan jika pelet mulai nampak transparan dan memadat dengan menambahkan bufer resuspensi, sehingga memudahkan berdispersi. Bufer resuspensi SMV menggunakan 0,05 M bufer Natrium fosfat pH 7,0 mengandung 0,005 M Na-EDTA, diaduk selama 10–30 detik dan disentrifugasi pada $8500 \times g$ selama 10 menit (Andayanie dan Adinurani 2013).

Ion Mg^{+2} dan Na-EDTA molaritas rendah akan meningkatkan infektifitas virus, hal ini karena: (1) Na-EDTA akan digunakan untuk memisahkan zona virus pada sentrifugasi kerapatan gradien; (2) Ion Mg^{+2} mampu mengikat subunit dari selubung protein dan menyebabkan agregasi partikel virus. Jika dikombinasikan ion Mg^{+2} dan Na-EDTA akan mencegah agregasi SMV (Iwai dan Wakimoto 1985).

Ultracentrifugasi

Ultracentrifugasi preparatif digunakan untuk memisahkan dan mengkonsentrasikan virus (Lawrence dan Steward 2010). Ultracentrifugasi pada SMV menggunakan kecepatan $78.000 \times g$ selama 90 menit dengan pelapisan 5 ml sukrosa 20% sebagai bantalan (*cushion*) dan ditambahkan bufer 0,005 M bufer Borat pH 8,0. Pelapisan larutan sukrosa 20% di dasar tabung sentrifugasi akan membantu pemisahan virus dari komponen tanaman inang yang mempunyai koefisien sedimentasi lebih rendah. Pelapisan dengan cara di atas dapat mengurangi agregasi antar virion.

Larutan sukrosa yang mengandung suplemen 0,005 M Na-EDTA dalam bufer 0,05 Na fosfat pH 7,0 menunjukkan hasil yang lebih baik. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya satu pita pada migrasi subunit protein pada konsentrasi gel 10%. Zona virus diambil setelah ultracentrifugasi dengan gradien sulfat sesium. Jika zona virus yang dihasilkan tidak terlihat jelas, maka zona virus ditetapkan 1 cm di atas dasar tabung. Zona virus dibagi menjadi tiga fraksi. Fraksi virus dari SMV akan dikumpulkan dengan ultracentrifugasi pertama dan kedua. Pelet yang diperoleh diresuspendi dengan 0,05 M bufer borat pH 8,0. Hasil resuspensi disimpan pada suhu 20°C sebagai virus murni (Andayanie dan Adinurani 2013).

PENGAMATAN HASIL PEMURNIAN

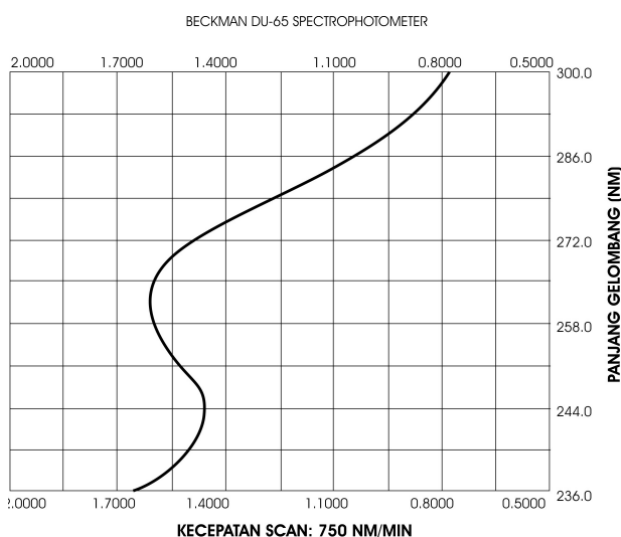
Keberhasilan pemurnian SMV dipengaruhi oleh metode yang digunakan. Metode yang sederhana dan mudah akan memperkecil terjadinya oksidasi. Selain itu strain virus, inang perbanyakan dan tingkat kestabilan virus berpengaruh besar terhadap rendemen hasil pemurnian SMV. Hasil pemurnian dan tingkat kemurnian virus SMV dapat dilakukan dengan cara karakterisasi sebagai berikut.

Spektrofotometri

Spektrofotometri digunakan untuk mengetahui serapan ultra violet pada nukleoprotein, sehingga dapat digunakan untuk mencirikan partikel virus dan mengukur tingkat kemurnian virus. Konsentrasi virus pada SMV diukur menggunakan pedoman menurut Iwai dan Wakimoto (1985) sebagai berikut.

$$E = \frac{0,1\%}{1 \text{ cm} \cdot 260 \text{ nm}} = 2,4$$

Preparasi hasil pemurnian virus menunjukkan kurva absorpsi ultra violet maksimum pada 260 nm dan minimum pada 247 nm yang merupakan karakteristik virus berbentuk batang lentur. Rasio A_{280}/A_{260} yang diperoleh 0,746 (0,683 sampai 0,814) dan $A_{\text{max}}/A_{\text{min}}$ 1,203 (1,082–1,207). Bahu absorpsi spektrum triptophan pada 290 nm (Gambar 1). Konsentrasi virus murni berdasarkan $E = \frac{0,1\%}{1 \text{ cm} \cdot 260 \text{ nm}} = 2,4$ dalam suspensi adalah 0,8601 mg/ml, sehingga



Gambar 1. Spektrum absorpsi ultra violet virus murni

diperoleh 0,32105 mg per 10 gram daun kedelai yang terinfeksi.

Prosedur pemurnian pada daun kedelai yang mengandung isolat SMV-B dan SMV N-65 dari Jepang berbeda dengan isolat Y dari Yogyakarta dan T dari Jawa Timur. Pemurnian SMV menggunakan metode yang sama dengan Iwai dan Wakimoto (1985) tidak diperoleh rendemen hasil pemurnian SMV dari isolat Y dan T. Menurut Andyanie dan Adinurani (2013), pada proses pemurnian SMV dari Iwai dan Wakimoto (1985) memerlukan modifikasi terutama pada prosedur dan bufer untuk gradien sukrosa, sehingga diperoleh tingkat kemurnian hasil dan rendemen hasil pemurnian SMV.

Elektroforesis

Tujuan langkah ini adalah untuk mendeteksi selubung protein dan berat molekul serta protein lain dari hasil proses pemurnian. Deteksi ini menggunakan SDS-PAGE mengikuti metode Leammli yang terdiri atas: *separating gel*, *stacking gel*, preparasi gel, running gel, dan pewarnaan (Anonim 1987). Elektroforesis dengan gel polyacrylamide digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengkarakterisasi molekul DNA atau RNA. Poliakrilamid digunakan untuk memisahkan senyawa makromolekul sebab porinya dapat disiapkan dengan ukuran tertentu, memisahkan dengan cepat dan elektro osmosisnya rendah.

Visualisasi dengan SDS-PAGE pada proses pewarnaan dengan Coomassie Brilliant Blue (CBB) memerlukan waktu yang lama. Hal ini disebabkan bahan penyusun larutan *staining*-nya mudah menguap serta bersifat asam sehingga diperlukan penanganan tersendiri untuk membuat larutan *staining*. Kelemahannya CBB ini peka terhadap protein, sehingga harus dilakukan penggoyangan untuk mengoptimalkan reaksi *staining* CBB. Kelebihan yang dimiliki oleh larutan *staining* CBB lebih mudah menghilangkan sisa-sisa pewarnaannya.

Visualisasi SDS-PAGE dilakukan secara kualitatif berdasarkan pola pita protein yang nampak dan kuantitatif berdasarkan tebal tipisnya pita yang terbentuk. Tebal tipisnya pita protein berhubungan erat dengan kandungan atau banyaknya protein yang mempunyai berat molekul sama, sehingga berada pada posisi pita protein selubung dari SMV yang sama. Pola pita protein hasil elektroforesis dengan penggunaan marker protein yang terdiri atas bovin serum albumin 66 KD, Carbonic anhydrase 29

KD, Cytochrome C 12,4 KD, dan Aprotimin 6,5 KD menunjukkan spesifikasi berat molekul dan tingkat kemurnian protein dari selubung SMV.

Visualisasi dengan SDS-PAGE

Dari hasil visualisasi SDS-PAGE diperoleh berat molekul protein selubung partikel virus hasil pemurnian (*coat protein*) dari SMV sekitar 33,13 kDa (Gambar 2).

Poliakrilamid tidak menyerap sinar ultra violet. Senyawa migran dapat direaksikan dengan pereaksi warna. Poliakrilamid terbentuk dari polimerisasi monomer akrilamid menjadi rantai linier. Rantai panjang ini dihubungkan satu dengan yang lain oleh *cross linker* yang berupa N,N-Methylene-bisacrilamide (Bis), ethylene diacrilamide bisacrylsytamine (BAC) atau N,N-dialytlardiamide (DATD). Reaksi polimerisasi terjadi karena adanya katalisator seperti amonium persulfat dan N,N,N tetramethylene-diamine (TEMED). Reaksi tersebut menghasilkan rantai poliakrilamid, sedangkan dengan penambahan bis secara proporsional bereaksi dengan grup fungsional dari bagian rantai poliakrilamide. Konsentrasi akrilamide menentukan panjang rantai polimer, sedangkan konsentrasi bis menentukan ragam dari *cross linking*. Keduanya mempengaruhi sifat fisik, elastisitas, kekuatan mekanis dan ukuran pori serta *network* tiga dimensi gel (Jovanovic *et al.* 2007).

Keberhasilan pemurnian dapat disebabkan oleh faktor metode yang digunakan lebih sederhana, mudah, dan cepat serta penggunaan inang perbanyak yang tepat, sehingga tidak merusak partikel virus selama proses pemurnian dan konsentrasi virus yang dihasilkan cukup tinggi. Tanaman kedelai memberikan hasil dan tingkat kemurnian yang lebih baik dibanding tanaman yang lain. Hal ini disebabkan kandungan inhibitorynya sangat rendah.

Tingkat kemurnian dan rendemen hasil dengan metode Iwai dan Wakimoto (1985) untuk SMV isolat Yogyakarta diperlukan modifikasi agar tidak merusak partikel virus selama proses pemurnian. Metode pemurnian SMV dengan modifikasi ini dapat menekan terjadinya proses oksidasi dengan penggunaan inang perbanyak yang tepat yaitu tanaman kedelai. Hal ini karena kandungan inhibitorynya sangat rendah, sehingga tidak merusak partikel SMV selama proses pemurnian. Selain itu tingkat kemurnian virus ini ditentukan oleh: (1) bufer 0,05 M Na-fosfat pH 7,0 yang mengandung 0,005 M Na-EDTA digunakan untuk resuspensi setelah



Gambar 2. Selubung protein dari virus murni pada SDS-PAGE dalam gel 10%.

M: marker, cp: subunit protein virus: 1. Tanaman kedelai sehat varietas Wilis; 2. Tanaman kedelai sehat varietas Burangrang; 3. hasil pemurnian isolat Y

dilakukan ultrasentrifugasi pertama pada 78.000 x g selama 90 menit; (2) resuspensi dan ultrasonikasi setelah ultrasentrifugasi kedua pada 78.000 x g selama 90 menit tidak dilakukan pengulangan; (3) bufer 0,05 M Na-fosfat pH 7,0 yang mengandung 0,005 M Na-EDTA juga digunakan untuk gradien sukrosa. Tingkat kestabilan virus yang dihasilkan ternyata berpengaruh besar terhadap rendemen hasil pemurnian. Kestabilan SMV dapat diketahui berdasarkan jumlah partikel pada setiap bidang pandang melalui kurva absorpsi ultra violet maksimum pada 260 nm dan minimum pada 247 nm yang merupakan karakteristik virus berbentuk batang lentur (*flexuous*).

PEMBUATAN ANTISERUM

Antiserum terhadap SMV dihasilkan dengan penyuntikan virus murni pada kelinci dengan konsentrasi penyuntikan $\pm 160 \mu\text{g}$ virus murni. Sediaan virus murni digunakan sebagai antigen untuk mengimbas pembentukan antibodi pada kelinci jantan berumur 4–6 bulan. Kelinci memerlukan sedikit antigen untuk imunisasi, volume serumnya relatif banyak, mudah pemeliharaannya, dan menghasilkan antiserum yang baik kualitasnya. Kualitas antibodi sangat dipengaruhi oleh konsentrasi antigen dan cara imunisasi. Imunisasi dilakukan empat kali

dengan injeksi virus murni dan larutan adjuvan pada kelinci. Respons kekebalan suatu individu dapat dilakukan dengan imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu (Andayanie dan Adinurani 2013; Syamsuri dan Wardani 2013). Antiserum ini dapat digunakan untuk mendeteksi langsung ekstrak daun kedelai yang terinfeksi SMV (Andayanie 2012 b; Andayanie dan Adinurani 2013b).

Kualitas Antiserum

Kualitas antiserum yaitu akurasi dan spesifitas dalam uji serologi ditingkatkan dengan penyerapan pada perasaan daun kedelai sehat dan dimurnikan gamma globulin dari antiserum tersebut dengan sulfat amonium untuk menghindari reaksi silang. Upaya peningkatan kualitas antiserum SMV ini dilakukan dengan metode Dijkstra dan Jager (1998); (Andayanie dan Adinurani 2013).

Antiserum dimurnikan secara presipitasi dengan sulfat amonium jenuh (Clark dan Adams 1977). Konsentrasi antiserum (tidak diserap, diserap, dan murni) diukur berdasarkan nilai absorbansi 1,4 pada panjang gelombang 280 nm setara dengan konsentrasi 1 mg ml⁻¹. Antiserum yang dipresipitasi dengan sulfat amonium konsentrasi proteinnya lebih kecil dibandingkan dengan antiserum yang tidak diserap maupun yang diserap. Hasil pemurnian antiserum SMV yang diencerkan 10 kali menunjukkan nilai absorbansi dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 280 nm. Antiserum yang diserap nilai absorbansi = 0,52, sedangkan gamma globulin = 0,39.

Konsentrasi protein yang dimurnikan lebih kecil dibandingkan dengan protein yang diserap, tetapi reaktivitasnya terhadap antigen lebih tinggi. Reaktivitas antiserum ini dapat dilihat dengan pengenceran masing-masing antiserum 1000 kali, sedangkan antigen dari sampel tanaman diencerkan 100 kali. Antiserum ini dapat digunakan untuk deteksi keterbawaan benih atau indeksing benih secara masal dan keberadaan virus pada sampel tanaman sakit serta evaluasi genotip tahan terhadap SMV, sehingga mencegah timbulnya penyakit yang disebabkan oleh SMV (Andayanie 2012; Andayanie dan Adinurani 2013).

Antiserum poliklonal digunakan dalam pengujian di atas, sehingga mampu mengenali berbagai epitop dari protein selubung virus. Selain itu antiserum terdiri dari kumpulan antibodi heterolog dengan spesifitas berbeda.

Oleh karena itu kendala yang sering terjadi adalah reaksi silang dengan antigen heterolog.

Antiserum monoklonal juga dapat dihasilkan dari virus murni tersebut. Keuntungan antibodi monoklonal dibandingkan dengan poliklonal: (1) antibodi dapat dihasilkan dari antigen dalam jumlah sedikit; (2) antibodi dapat tersedia dalam jumlah tidak terbatas; (3) antibodi spesifik untuk satu epitop determinan dapat diperoleh sekalipun digunakan antigen kompleks sebagai imunogen. Oleh karena itu antibodi monoklonal bersifat homogen dalam tipe dan spesifitas serta cenderung bereaksi secara keseluruhan (hasil komunikasi pribadi dengan Somowiyarjo 2010).

KESIMPULAN

1. Tanaman kedelai sangat prospektif digunakan sebagai inang perbanyakkan SMV.
2. Tanaman kedelai yang diinokulasi penyebab penyakit menghasilkan virus murni cukup tinggi sekitar 0,32 mg dari 100 gram bahan segar.
3. Fraksi ke-3 dari zona virus mempunyai nilai $A_{260} = 0,746$ dan tingkat kemurnian cukup tinggi dengan nilai nisbah $A_{260}/280 = 1,203$. Berdasarkan analisis elektroforesis secara SDS-PAGE, ukuran selubung protein penyebab penyakit mosaik kedelai sekitar 33,67 kDa.
4. Imunisasi kelinci menggunakan 160 µg virus murni dari SMV menghasilkan antiserum yang cukup baik kualitasnya.
5. Pemilihan antara antibodi poliklonal dan monoklonal didasarkan pada macam dan alasan pengujian.

SARAN-SARAN

Pemurnian *Soybean mosaic virus* agak sulit dilakukan karena konsentrasi virus di dalam inang rendah dan tidak stabil. Konsentrasivirus yang rendah tersebut menjadi kendala untuk penyediaan antibodi. Oleh karena itu pemilihan inang untuk perbanyakkan, dan metode yang lebih sederhana serta mudah akan memperkecil terjadinya proses oksidasi dan hilang dan rusaknya partikel-partikel virus.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Ditjen DIKTI untuk dana Hibah Strategi Nasional Tahun 2013–2014. Penulis juga menyampaikan terimakasih kepada Dr. Asadi dan Dr Karden Mulya

dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian (BB Biogen) untuk bantuan plasma nutfah kedelai.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahangaran A., G.H.M. Mohammadi, M.K. Habibi, S. Khezri, and N. Shahraeen. 2009. Use of rapid serological and nucleic acid based methods for detecting the Soybean mosaic virus. *J. Agric Sci. Tech.* 11: 91–97.
- Andayanie, W.R., Y.B. Sumardiyono, S. Hartono dan P. Yudono. 2011. Incidence of soybean mosaic disease in East Java Province. *J. Agrivita* 33(1):15–22.
- Andayanie, W.R. 2012a. Penyakit mosaik kedelai dan pengelolaan *Soybean mosaic virus* terbawa benih. Hlm. 335–347 dalam A. Widjono, *et al.* (Edt.). Inovasi Teknologi dan Kajian Ekonomi Komoditas Aneka Kacang dan Umbi Mendukung Empat Sukses Kementerian Pertanian. Pros. Seminar Nasional Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi. Puslitbang Tanaman Pangan, Bogor 2012.
- _____. 2012b. Diagnosis penyakit mosaik (*Soybean mosaic virus*) terbawa benih kedelai. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 12 (2):185–191.
- Andayanie, W.R. 2013. Evaluasi genotipe kedelai [*Glycine max* (L.) Merr.] tahan terhadap mosaik virus. Disampaikan pada Seminar dan Kongres Nasional XXII. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia. Padang 7–10 Oktober 2013.
- Andayanie, W.R. dan Adinurani, P.G. 2013. Ketahanan dan pemuliaan kedelai [*Glycine max* (L.) Merr.] terhadap virus mosaik (*Soybean mosaic virus*) berdaya hasil tinggi. Laporan Akhir. Penelitian Hibah Strategis Nasional Tahun I. Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat. Dirjen Dikti. Kementerian Pendidikan dan Kebudayaan. 47 Hlm.
- Arogundade, O., S.O. Balogun and T.H. Aliyu. 2009. Effects of *Cowpea mottle virus* and *Cucumber mosaic virus* on six soybean (*Glycine max* L.) cultivars. *Virology J.* 6: 220.
- Badan Pusat Statistik. 2014. Produksi padi, jagung, dan kedelai (Angka Ramalan I tahun 2014). Berita Resmi Statistik. No 50/07/Th. XVII, 1 Juli 2014.
- Biswal, S., J. Sahoo, P.N. Muchthy, R.P. Giradkar, and J.G. Avari. 2008. Enhancement of dissolution rate of gliclazide using solid dispersion with Polyethylene Glycol 6000. *J. AAPS Pharm. Sci. Tech.* 9(2): 563–570.
- Clarck, M.F. and A.N. Adams. 1977. Characteristics of microplate methods of enzyme linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–483.
- Dijkstra, J. and C.P. de Jager. 1998. Practical Plant Virology Protocols and Exercises. Springer. Lab. Manual. 459 p.
- Gunturu, S. and D.A Maravadi. 2012. Preparation and evaluation solid dispersions of Nimesulfide. *Internat. J. of Pharmacy* 2(4): 777–785.
- Hull, R. 2013. Plant virology. Fifth edition 2014. Copyright © 2014 Elsevier Inc. Acad. Press. 1118 pp.
- Iwai, H. dan S. Wakimoto. 1985. An improved method for purification of *Soybean mosaic virus*. *Ann Phytopath Soc. of Japan* 51 (4): 485–474.
- Jovanovic, S., M. Barac, O. Macej, T. Vucic, C. Lacryevac. 2007. SDS Page analysis of soluble proteins in reconstituted milk exposed to different heat treatment. *J. Sensors* 7: 371–383.
- Kuhn J.H. and P.B. Jahrling. 2010. Clarification and guidance on the proper usage of virus and virus species names. *Arch Virol.* 155(4): 445–453.
- Kuroda, T., K. Nabata, T. Hori, K. Ishikawa, and T. Natsuaki. 2010. Soybean leaf rugose mosaic virus, a new soilborne virus in the family Potyviridae, isolated from soybean in Japan. *J. of General Plant Pathol.* 76: 382–388.
- Lawrence J.E. and G.F. Steward. 2010. Purification of viruses by centrifugation. *Manual of Aquatic Viral Ecology*. Chapter 17: 166–181.
- Li K., Q.H. Yang, H.J. Zhi, J.Y. Gai. 2010. Identification and distribution of *Soybean mosaic virus* strains in Southern China. *Plant Dis.* 94: 351–357.
- Lima, J.A.A., A.K.Q. Nascimento, F.R. Silva, A.K.F. Silva and M.L. Aragao. 2011. An immuno precipitation enzyme linked immuno sorbent (IP–ELISA) technique for identification of plant viruses. *Proc. of XXII National Meeting of Virology* 16(1): 56–59.
- Masuni, M., A. Zare, and K. Izadjanah. 2011. Biological, serological and molecular comparison of Potyviruses infecting Poaceous plants in Iran. *Iran J. Plant Pathol.* 47(1): 11–14.
- Mulholland, V. 2009. Immunocapture-PCR for plant virus detection. pp. 183–192 in R. Buras (Ed.). *Plant Pathology; Techniques and Protocols*, Agric. Sci. Agency. Edinburgh EH 129 FJ, U.K.
- Rahamma, S., dan A. Hasanuddin. 1989. Inokulasi virus mosaik kedelai pada berbagai umur tanaman. Hlm. 115–117 dalam Pros. Kongres Nasional X dan Seminar Ilmiah PFI di Denpasar.
- Seo J.K, M.Kang, M.S.V Phan, K.H. Kim. 2013. Rapid purification of *Soybean mosaic virus* from small quantities of tissue by immunoprecipitation. *J. of Virol. Methods.* 191(1): 31–32.
- Syamsuri, A. dan A.K. Wardani. 2013. Studi antibodi poliklonal anti gelatin babi dengan Dot

- Blot dan potensinya sebagai perangkat deteksi gelatin babi. *J. Pangan dan Agroindustri* 1(1): 36–45.
- van Regenmortel, M.H.V. 2012. Serology and immunochemistry of plant viruses. Acad. Press, Inc 111 Fifth Avenue, New York 10003: 32–36.
- Wang, A. 2009. *Soybean mosaic virus*: research progress and future perspective. Proc. of World Soybean Res. Conf. VIII (www.wsrc2009.cn). Beijing, China.
-