

## DIAGNOSIS PENYAKIT MOSAIK (*SOYBEAN MOSAIC VIRUS*) TERBAWA BENIH KEDELAI

Wuye Ria Andyanie

Fakultas Pertanian, Universitas Merdeka, Madiun

E-mail : wuye\_andyanie@yahoo.com.

### ABSTRACT

**Mosaic disease (Soybean mosaic virus) diagnosis of soybean seed transmission.** Soybean mosaic disease is wide spread throughout soybean-growing countries. Incidence of this disease in East Java is caused by Soybean mosaic virus (SMV) and cowpea mild mottle virus (CMMV). This aim of study was to find the etiology of disease at 14-28 days after planting (dap) on soybean. Research was done by observing visual symptoms. Visual symptoms confirmed by infectivity test, serology assay, electron microscopy (EM) and molecular detection. Results from experiment indicated that soybean plants (14-28 dap) with symptom could be detected in infectivity test. Mechanical inoculation with symptomatic leaf extracts produced local lesions on *Chenopodium amaranticolor*. Positive results were obtained for Madiun, Ngawi, and Magetan samples when tested against antiserum of SMV in serological assay, however Ponorogo samples were not detected by serological assay. Electron microscopy was also done for the selected sample to confirm the result of positive results. In EM observations, characteristic filamentous particles with modal length close to 900 nm were observed in samples infected with SMV. We detected an array of amplification products of expected size 1385 bp fragment of cylindrical inclusion gene from Madiun, Ngawi, and Magetan isolates in former fields, but not detected in Ponorogo isolate. This result showed the existence of SMV of soybean seed transmission at 14-28 dap in Madiun, Magetan and Ngawi.

Key words: *Soybean mosaic virus*, soybean seed transmitted, polymerase chain reaction, cylindrical inclusion

### ABSTRAK

**Diagnosis penyakit mosaik (Soybean mosaic virus) terbawa benih kedelai.** Penyakit mosaik kedelai tersebar luas di negara penanam kedelai. Kejadian penyakit ini di Jawa Timur disebabkan oleh *Soybean mosaic virus* (SMV) dan *Cowpea mild mottle virus* (CMMV). Tujuan penelitian untuk mengetahui etiologi penyakit kedelai pada 14-28 hari setelah tanam (hst). Penelitian dilakukan dengan mengamati gejala visual. Gejala tersebut dikonfirmasi dengan uji infektivitas, ujiserologi, mikroskop elektron (EM), deteksi molekular. Hasil dari penelitian menunjukkan bahwa tanaman kedelai bergejala (14-28 hst) dapat dideteksi dengan uji infektivitas. Inokulasi secara mekanik dengan ekstrak daun bergejala menghasilkan becak lokal pada *Chenopodium amaranticolor*. Sampel dari Madiun, Ngawi, dan Magetan menghasilkan reaksi positif pada uji serologi dengan antiserum SMV, walaupun sampel dari Ponorogo tidak terdeteksi dengan uji serologis. Sampel-sampel yang bereaksi positif tersebut dikonfirmasi dengan pengamatan mikroskop elektron (EM). Pengamatan EM, karakteristik partikel berbentuk batang lentur dengan panjang artikel 900 nm yang diamati dalam sampel terinfeksi. Produk amplifikasi gen *Cylindrical inclusion* fragmen DNA dari isolat Madiun, Ngawi, dan Magetan mempunyai ukuran 1385bp, tetapi fragmen DNA tersebut tidak terdeteksi di isolat Ponorogo. Hasil ini menunjukkan tanaman 14-28 hst terinfeksi SMV di Madiun, Magetan, dan Ngawi ditularkan lewat benih.

Kata kunci: *Soybean mosaic virus*, terbawa benih kedelai, *polymerase chain reaction*, *cylindrical inclusion*.

### PENDAHULUAN

Produksi kedelai di Indonesia tahun 2012 diperkirakan turun 8,40% dibandingkan tahun 2011. Penurunan produksi ini terutama dialami oleh Jawa Timur, Nusa Tenggara Barat, Jawa Barat, Sumatera Utara, dan Lampung (BPS, 2012). Salah satu penyebab rendahnya produktivitas kedelai adalah serangan penyakit mosaik kedelai. Di Jawa Timur, penyakit mosaik

kedelai terutama disebabkan oleh *Cowpea mild mottle virus* (CMMV) dan *Soybean mosaic virus* (SMV) (Saleh & Baliadi, 2006; Andyanie *et al.*, 2011). SMV adalah virus yang ditularkan melalui benih. Sistem perbenihan kedelai di Indonesia yang masih kurang sempurna mempengaruhi penularan dan penyebaran penyakit mosaik (Saleh, 2007). Benih terinfeksi SMV berperan sebagai sumber inokulum (*primary source of infection*). Sumber inokulum ini mempunyai peranan

dalam penularan dan penyebaran penyakit oleh serangga vektor di lapangan. Virus tersebut menghasilkan gejala biji *mottle* (burik) dan *non-mottle*. Oleh karena itu biji *non-mottle* tidak dapat dijadikan jaminan bebas SMV. Infeksi virus pada biji dapat menyebabkan viabilitas atau daya tumbuh benih rendah. Virus ini akan aktif setelah benih disemaikan dan menyebabkantanaman terinfeksi. Infeksi SMV pada awal pertumbuhan akan menghasilkan produktivitas yang semakin rendah. Infeksi virus ini dapat menurunkan produktivitas 25,48% sampai 93,84%. Hasil penelitian menunjukkan intensitas penyakit pada awal pertumbuhan mencapai 13,42 – 30,10% (Koning & Te Krony, 2003; Hobbs *et al.*, 2003; Andayanie, 2012a).

Infeksi SMV menyebabkan gejala pada tanaman, seperti daun permukaannya tidak rata, mengecil dengan gambaran mosaik, menggulung ke dalam, dan tepi daun mengalami klorosis, kadang-kadang disertai tanaman menjadi kerdil. Gejala mosaik pada daun dan gejala burik pada biji tidak dapat digunakan untuk menyimpulkan bahwa daun dan biji tersebut terinfeksi SMV. Uji serologi menunjukkan biji terinfeksi SMV tidak semua memperlihatkan gejala *mottle*. Biji *mottle* dapat dihasilkan oleh biji sehat (Andayanie, 2012b). Tanaman sehat dapat menghasilkan biji dengan intensitas *mottle* yang lebih tinggi pada suhu 20°C dibandingkan suhu 30°C. Suhu rendah akan mempengaruhi ekspresi gen di hilum. Oleh karena itu, uji infektivitas pada tanaman indikator diperlukan untuk mengetahui gejala luka nekrotik terhadap SMV (Tavasoli *et al.*, 2009; Arif & Hasan, 2000; Andayanie *et al.*, 2011). Pengamatan gejala dan uji serologi yang di ikuti oleh pengamatan mikroskop elektron dilakukan untuk mengetahui partikel nukleoprotein virus yang menginfeksi tanaman. Partikel nukleoprotein SMV mempunyai bentuk batang lentur (*filamentous*) dengan ukuran panjang 650"900 nm dan diameter 11-13 nm (Chen *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Di Korea ditemukan lima strain SMV yaitu strain G2, G5, G5H, G7, dan G7H. Strain-strain virus tersebut diidentifikasi melalui gejala fenotip dari *differential host* (inang diferensial). Meskipun pada kondisi lingkungan tertentu gejala penyakit tidak dapat diekspresikan. Sehingga identifikasi strain-strain tersebut juga dilakukan melalui *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism* (RT-PCR/RFLP) dan dianalisis dengan daerah yang mengkode *Cylindrical Inclusion* (CI). Sepasang primer CI mengamplifikasi fragmen DNA berukuran 1385 bp pada posisi 4176 sampai 5560 (Kim *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2011).

Penelitian bertujuan untuk mendiagnosis gejala mosaik pada kedelai di empat kabupaten di Jawa

Timurpada 14-28 hst. Data dan informasi tentang diagnosis SMV terbawa benih digunakan sebagai bahan pertimbangan untuk melaksanakan pengendalian SMV di lapangan dan penelitian yang serupa serta memberikan informasi bagi yang membutuhkan.

## METODE PENELITIAN

**Waktu dan Tempat.** Penelitian di lapangan dilaksanakan pada bulan Mei 2010 dan dilakukan pada 32 lokasi pertanaman kedelai varietas Wilis milik petani di Kabupaten Madiun, Magetan, Ponorogo dan Ngawi. Daerah tersebut merupakan lumbung kedelai untuk wilayah barat dari Jawa Timur. Setiap kabupaten ditentukan empat desa. Desa tersebut mempunyai areal terluas untuk penanaman benih kedelai. Pemilihan dua hamparan tanaman kedelai dilakukan secara acak di setiap desa. Setiap hamparan mempunyai luas areal tanam kedelai  $\pm 5000 \text{ m}^2$ . Pengambilan contoh tanaman dilakukan pada titik diagonal, masing-masing titik diagonal  $\pm 100$  tanaman (Maugh, 2007).

Penelitian di rumah kaca dan laboratorium Virologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dilaksanakan mulai bulan September 2010 sampai bulan Januari 2012. Penelitian ini terdiri atas: uji infektifitas, serologi, pengamatan mikroskop elektron dan deteksi secara molekular.

**Pengamatan Gejala Penyakit.** Pengamatan gejala penyakit pada tanaman kedelai terdiri atas: gejala awal pada daun muda yang baru tumbuh dan daun yang telah tumbuh sempurna. Gejala tersebut dikelompokkan berdasarkan variasi gejala yang nampak.

**Uji Infektivitas.** Uji infektivitas dilakukan untuk mengetahui keberadaan dan penyebab penyakit pada tanaman *C. amaranticolor*. Sumber inokulum diperoleh dari contoh tanaman bergejala pada daun muda yang baru tumbuh dan daun yang telah tumbuh sempurna. Daun kedelai bergejala ditambahkan 0,06 M bufer fosfat pH 7 dengan perbandingan 1 g daun setiap 10 ml bufer fosfat (1:10 b/v) sebagai larutan ekstrak daun sakit. Larutan tersebut diambil cairan perasan dengan kapas steril. Tanaman *C. amaranticolor* pada daun ke tiga ditaburi dengan *carborundum* 600 mesh di bagian permukaan atas daun, selanjutnya bagian tersebut dibersihkan dengan air steril. Setengah bagian dari helai daun diinokulasi dengan cairan perasan tersebut. Setiap ulangan diambil tiga tanaman dengan tiga kali ulangan. Tanaman dipelihara dalam kotak kaca yang tidak terlalu gelap dan panas akan mendukung munculnya gejala

nekrotik terhadap infeksi virus yang diuji. Tanaman akan menampakkan gejala becak lokal setelah 15 hari inokulasi. Becak tunggal diinokulasikan ke tanaman kedelai untuk mengetahui penyebab penyakit dan gejala pada tanaman kedelai.

**Uji Serologi.** Uji serologi dilakukan dengan metode *non-precoated indirect ELISA* Menurut Koenig (1981) yang telah dimodifikasi. Uji tersebut menggunakan contoh daun bergejala mosaik, sehat di masing-masing lokasi. Contoh daun diekstraksi dengan bufer Natrium karbonat pH 9,6. Ekstrak tersebut disiapkan dengan seri pengenceran  $10^{-2}$  untuk memperoleh antigen. Antigen dimasukkan ke dalam lubang sumuran *ELISA plate* sebanyak 150  $\mu$ l dan diinkubasi pada suhu kamar selama dua jam. Setelah inkubasi, sap dibuang dan *microtitre plate* dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali, kemudian dimasukkan 100  $\mu$ l (BSA) 2% dan diinkubasi selama dua jam pada suhu ruang. Sap dibuang dan *plate* dicuci dengan PBST sebanyak tiga kali, kemudian dimasukkan 100  $\mu$ l antiserum (diencerkan  $10^{-3}$ ) serta diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam. Sap dibuang dan dicuci sebanyak tiga kali dengan larutan PBST, selanjutnya ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan atau bloking dengan substrat (*p-nitrophenil phosphate* 1 mg/ml dalam 10% *diethanolamine* pH 9,8) sebanyak 100  $\mu$ l dan diinkubasi selama 1,5 jam pada suhu 27°C. Reaksi yang terjadi diamati dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Reaksi dihentikan dengan cara ditambahkan larutan NAOH ke dalam masing-masing sumuran.

**Pengamatan Mikroskop Elektron.** Pengamatan ini bertujuan untuk mengamati morfologi nukleoprotein (virus). Sediaan virus yang digunakan dari daun kedelai bergejala pada 14-28 Hst dan bereaksi positif dengan uji serologi. Pengamatan ini dilakukan dengan cara Dijkstra & de Jager (1998). *Grid* yang mempunyai ukuran 400 mesh dilapisi dengan *Carbon-formvar*. *Grid* tersebut disentuh ke daun terinfeksi. Selanjutnya membran *parafilm* ditetesi dengan *ddH<sub>2</sub>O*, dan dilakukan *coating* dengan *grid* tersebut selama dua menit. *Grid* diserap dengan kertas filter yang berbentuk potongan segitiga. *Grid* ditetesi dengan larutan 2% *Phosphotungtic acid* (PTA) pH 6,5 selama 15 detik. *Grid* dikeringkan lagi dengan kertas filter dan *Grid* dimasukkan ke mikroskop elektron (JEOL 100S Electron Microscope (EM) (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) untuk pengamatan nukleoprotein atau virus.

**Deteksi Molekular.** Ekstraksi RNA total menggunakan contoh daun kedelai bergejala. Selanjutnya

prosedur mengikuti rekomendasi perusahaan (Qiagen). Jaringan tanaman yang terinfeksi ditimbang (0,1 g) dan ditambahkan nitrogen cair (2000  $\mu$ l) kemudian dilakukan penggerusan. Bubuk jaringan tanaman dimasukkan ke tabung ependorf dan ditambahkan bufer RLT (450  $\mu$ l), serta ditambahkan *mercaptoethanol* (4,5  $\mu$ l), kemudian dilakukan homogenisasi. Selanjutnya larutan dipindahkan ke *spin column* warna lila dan disentrifugasi 14.000 rpm selama dua menit, larutan tersebut ditambahkan *etanol* (96–100%) setengah dari volume total. Larutan dicampur segera dengan *pipeting*. Larutan dipindahkan ke *spin column* yang merah muda, kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama 50 detik dengan suhu 22°C, selanjutnya supernatan dibuang. Pelet ditambahkan dengan bufer RW1 (700  $\mu$ l) dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 50 detik dengan suhu 22 °C, supernatan dibuang. Pelet ditambahkan dengan bufer RPE (500  $\mu$ l) dan disentrifugasi 12.000 rpm selama 15 detik, supernatan dibuang dan diulangi tetapi dengan waktu dua menit, supernatan dibuang. *Spin column* warna merah muda ditempatkan di tabung dan ditambahkan *RNase free water* (50  $\mu$ l), kemudian disentrifugasi 12.000 rpm selama satu menit. Cairan yang ada di tabung selanjutnya digunakan sebagai RNA templet untuk keperluan *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR).

Reaksi RT-PCR menggunakan *First Strand cDNA Synthesis Kit*. Semua bahan yang dicampur terdiri atas 5  $\mu$ l *RNase free water*, 1  $\mu$ l *dNTP mix*, 1  $\mu$ l primer *poly d(T)*, 3  $\mu$ l *RNA template*, sehingga jumlah totalnya 10  $\mu$ l. Semua larutan dimasukkan ke mesin *thermocycler* dan diprogram pada suhu 65°C selama lima detik, selanjutnya dimasukkan dalam kotak es. Bahan tersebut dicampur dengan 4,5  $\mu$ l *RNA s free water*, 4  $\mu$ l *Bufer 5 x prime script*, 0,5  $\mu$ l *RNase inhibitor*, 1  $\mu$ l RT ensim, sehingga jumlah total 20  $\mu$ l. Semua larutan tersebut dimasukkan ke mesin *thermocycler*, dan diprogram pada suhu 42°C selama 60 menit, 95 °C selama lima menit, 4°C tidak terhingga.

Reaksi PCR menggunakan *Maxima<sup>TM</sup> Hot Start Taq DNA Polymerase*. Prosedur kerja mengikuti rekomendasi perusahaan (Fermentas). Semua bahan yang terdiri atas 8,5  $\mu$ l *water nuclease free*, 5  $\mu$ l bufer 10 x *Hot Start PCR*, 4  $\mu$ l 25 mM *MgCl<sub>2</sub>*, 2,5  $\mu$ l *dNTP mix* 2 mM, *Hot Start Taq DNA Polymerase*, 1,5  $\mu$ l Primer CI F (5'GCATTCAACTGTGCGC TTAAAGAAT 3') dan 1,5  $\mu$ l Primer CI R (5'TTGAGGCTGCAAAAATTA CTCATT 3') (Kim *et al.*, 2004), 2  $\mu$ l *DNA template* dicampur dengan *spindown*. Semua larutan dimasukkan ke mesin *thermocycler* yang diprogram denaturasi awal pada 95°C selama dua menit, denaturasi 95°C selama satu menit dan *annealing* (penempelan primer) 68°C

selama satu menit serta ekstensi pada 72°C selama satu menit untuk *amplification* (pelipat gandaan) sebanyak 40 siklus, ekstensi terakhir 72°C selama 10 menit dan 4°C selama tidak terhingga.

Larutan untuk elektroforesis terdiri atas 7,4 ml *distillated water*, 1 ml 10 x TBE, 100 µl APS 10%, 9 µl TEMED, 1,7 ml *polyacrilamide* 29:1. Semua larutan dimasukkan *plate* dan diberi sisir sebanyak jumlah sampel. Sisir diambil dan *plate* dimasukkan pada kotak yang telah diberi TBE 1x, kemudian dilakukan *loading* dengan 3 µl sampel dan 2 µl pewarna, serta 1kb penanda DNA yang digunakan sebagai alat pengukur band. Listrik dipasang dengan 10 MA selama 15 menit, setelah itu dirubah menjadi 24 MA selama 35 menit. Pengamatan dilakukan di bawah *transluminator*.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Gejala Penyakit.** Hasil pengamatan pada tahapan kajian lapangan menunjukkan gejala penyakit pada tanaman kedelai tersebar di semua lokasi pertanaman kedelai sejak awal pertumbuhan. Gejala di lapangan menampakkan keanekaragaman. Infeksi virus penyebab penyakit dapat dibedakan dengan virus lain dengan pengamatan gejala pada saat awal pertumbuhan. Gejala penyakit pada tanaman kedelai setelah melewati awal pertumbuhan sulit dibedakan dengan infeksi virus lain karena gejalanya menjadi kompleks. Keanekaragaman gejala pada tanaman kedelai pada 14–28 hst disajikan pada Gambar 1.

Gejala penyakit pada 14–28 hst menunjukkan kecenderungan infeksi virus melalui benih karena gejala muncul sejak awal pertumbuhan. Meskipun setelah 28 hst terdapat bersama-sama dengan CMMV (komunikasi pribadi dengan Tomohde Natsuaki, 2010). Secara umum virus yang sama dapat menghasilkan gejala yang berbeda atau gejala yang sama dapat disebabkan oleh virus yang berbeda, sehingga tidak semua gejala mosaik kedelai disebabkan oleh SMV. Keanekaragaman gejala ini disebabkan oleh umur tanaman dan lingkungan saat terjadinya infeksi, virus terbawa benih dan sumber inokulum lain yang menghasilkan gejala yang beranekaragam di lapangan dan juga sering dikacaukan dengan gejala penyakit fisiologis karena kekurangan unsur hara (Hull, 2002). Oleh karena itu, gejala secara visual ini perlu didukung dengan diagnosis serologi, uji infektivitas pada tanaman *C. amaranticolor*, dan pengamatan mikroskop elektron, serta deteksi secara molekular.

**Uji Infektifitas.** Sampel tanaman dari berbagai lokasi memberikan reaksi berupa gejala becak lokal terhadap infeksi virus pada tanaman indikator (*C. amaranticolor*) (Gambar 2). Gejala yang dihasilkan ini untuk membedakan dengan gejala penyakit karena kekurangan unsur hara. Meskipun CMMV juga menghasilkan becak lokal pada tanaman indikator tersebut. Oleh karena itu, uji infektifitas ini dikonfirmasi dengan uji serologi.

**Uji Serologi.** Uji serologi menggunakan metode *non-precoated* I-ELISA dengan pelacak antibodi poliklonal



Gambar 1. Keanekaragaman gejala mosaik pada tanaman kedelai 14–28 hst. (A) Daun mengecil, klorosis, dan permukaan daun tidak merata, (B) daun mengecil dan tepi daun melengkung, (C) klorosis dan tulang daun menebal, dan (D) daun mengecil, melengkung ke dalam dan keluar serta melepuh.

terhadap SMV menunjukkan penyebab penyakit dari gejala yang beranekaragam pada tanaman kedelai pada 14-28 hst bereaksi positif, kecuali di Kabupaten Ponorogo. Hasil uji serologi pada sampel daun tersebut disajikan pada Tabel 1.

Ekstrak tanaman bergejala mosaik menghasilkan nilai dua kali atau lebih besar daripada kontrol negatif pada absorbansi ultraviolet dengan panjang gelombang 405 nm untuk reaksi antibodi dengan antigen. Hasil uji ini membuktikan gejala penyakit pada contoh tanaman kedelai pada 32 lokasi di Kabupaten Madiun, Magetan, dan Ngawi pada 14-28 hst bereaksi positif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Sedangkan contoh dari Kabupaten Ponorogo bereaksi negatif. Reaksi positif tersebut dapat dihasilkan oleh virus lain. Hal ini disebabkan antibodi poliklonal SMV yang tidak murni. Hasil penelitian pendahuluan menghasilkan konsentrasi suspensi virus murni adalah 0,7142 mg/ml, sehingga pada setiap 10 gram daun hanya menghasilkan 0,30607 mg virus. Sehingga spesifitas antibodi rendah. Oleh karena itu, reaksi positif dari uji serologi ini dikonfirmasi dengan pengamatan mikroskop elektron.

**Pengamatan Mikroskop Elektron.** Hasil pengamatan menunjukkan partikel nukleoprotein (virus) berbentuk batang lentur (*filamentous*) dan panjang berukuran 900 nm serta diameter sekitar 12 nm. Partikel tersebut merupakan partikel nukleoprotein virus (Gambar 3). Partikel nukleoprotein dengan bentuk dan kisaran panjang serta diameter tersebut termasuk partikel nukleoprotein dari SMV (Chen *et al.*, 2001 dan Chen *et al.*, 2002)

**Deteksi Molekular.** Ekstraksi RNA total menggunakan tanaman kedelai bergejala pada 14-28 hst. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F mempunyai ukuran 1385 bp (Gambar 4 A). Berdasarkan fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F menunjukkan pada tanaman kedelai bergejala dari isolat asal Madiun dan Ngawi serta Magetan ditemukan SMV. Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F berukuran 1385 bp mempunyai kesamaan dengan fragmen DNA dari SMV di Korea (Kim *et al.*, 2004).

Fragmen DNA yang tidak berhasil diamplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F dari isolat asal

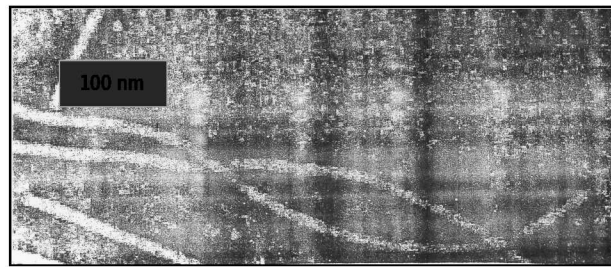


Gambar 2. Gejala becak lokal pada tanaman *C. amaranticolor*

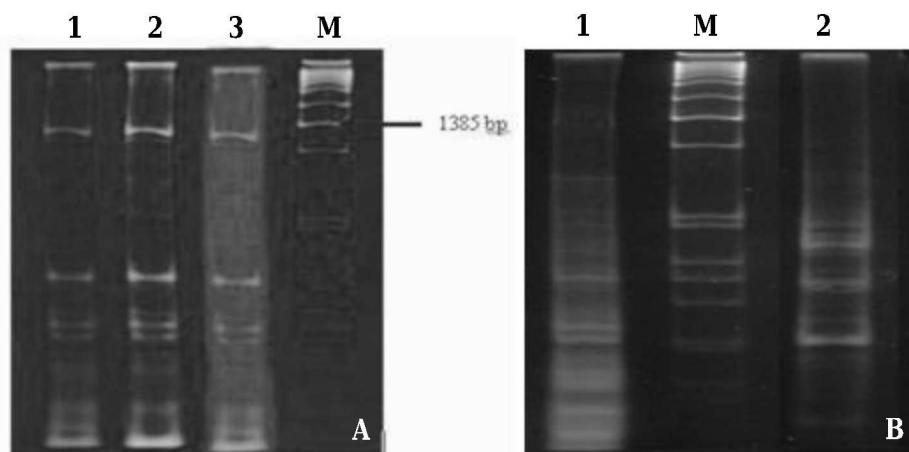
Tabel 1. Uji serologi pada tanaman kedelai bergejala pada 14-28 hst

Lokasi	Rerata nilai absorbansi ( $A_{405\text{ nm}}$ ) <sup>*)</sup>	Keterangan
Ponorogo	0,350	-
Madiun	0,932	+
Magetan	0,963	+
Ngawi	0,989	+
Daun sehat	0,224	
Bufet	0,219	

<sup>\*)</sup> rerata dari 3 ulangan, masing-masing 10 contoh daun, nilai negatif :  $\leq 0,438$  (dua kali nisbah bufer).



Gambar 3. Partikel nukleoprotein virus. Bar dalam *micrograph* 100 nm



Gambar 4. Fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR menggunakan primer CI 5560R dan CI 4176F. (A) Lajur 1. isolat asal Madiun; 2. isolat asal Ngawi; 3. isolat asal Magetan. (B) Lajur 1. isolat asal Ponorogo yang tidak teramplifikasi; Lajur 2. isolat dari tanaman sehat (kontrol M: DNA Ladder 1 kb sebagai penanda DNA (Fermentas).

Ponorogo (Gambar 4 B). Reaksi negatif dari contoh tanaman bergejala mosaik dapat disebabkan karena infeksi virus lain.

**SIMPULAN**

Gejala yang beraneka ragam dihasilkan oleh tanaman kedelai pada 14-28 hst di Kabupaten Madiun, Magetan, Ponorogo dan Ngawi. Uji infektifitas dan serologi menunjukkan gejala tersebut disebabkan oleh penyebab penyakit. Meskipun isolat dari Kabupaten Ponorogomenunjukkan reaksi negatif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Penyebab penyakit pada tanaman kedelai di Kabupaten Madiun, Magetan, dan Ngawi mempunyai partikel nukleoprotein berbentuk batang lentur dengan panjang berukuran 900 nm dan diameter berukuran sekitar 12 nm. Isolat tersebut

menghasilkan fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR dengan primer CI 5560R dan CI 4176F berukuran 1385 bp.

**SANWACANA**

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Nomor: 096/SP2H/DP2M/IV/2009 dan Nomor: 336/BAP/DP2M/IX/2010. Penulis juga menyampaikan terimakasih kepada Prof (Ret). Dr. Y.B. Sumardiyono, Dr. Sedyo Hartono, M.P., Prof. Dr. Prapto Yudono, M.Sc. (UGMYogyakarta), Prof. Dr. Tomohide Natsuaki (*Director, Center for Bioscience Research and Education Utsunomiya University, Mine-Machi, Japan*) yang telah memberikan kritik, saran, fasilitas laboratorium dan analisis untuk diagnosis molekular.

## DAFTAR PUSTAKA

- Andayanie WR, Sumardiyono YB, Hartono S & Yudono P. 2011. Incidence of soybean mosaic disease in East Java Province. *J. Agrivita*. 33(1):15-22.
- Andayanie WR. 2012a. Penyakit mosaik kedelai dan pengelolaan *Soybean mosaic virus* terbawa benih. Hlm. 335-347. Dalam: *Prosiding Seminar Nasional Hasil Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi. Pusat penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Bogor*.
- Andayanie WR. 2012b. Evaluation of low temperature treatment induced mutant of *Soybean mosaic virus* (SMV) for cross protection in soybean. *J. Australasian Plant Pathology*. (Submitted).
- Arif M & Hassan S. 2000. Occurrence and distribution of soybean mosaic potyvirus in soybean crop of North West Frontier Province, Pakistan and characterization of prevalent isolates. *Pakistan Journal of Biological Science* 3 (12): 2126-2130.
- BPS. 2012. *Produksi Kedelai Tahun 2012*. Badan Pusat Statistik, Jakarta. [http://www.bps.go.id/brs\\_file/aram\\_2jul12.pdf](http://www.bps.go.id/brs_file/aram_2jul12.pdf). Diakses tanggal 16 Februari 2012.
- Chen J, Chen JP & Adam MJ. 2001. A universal PCR primer detect members of the Potyviridae and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. *Journal Archives of virology (arch. virol.)*. 146: 757-766 p.
- \_\_\_\_\_. 2002. Characterisation of Some *Carla-and Potyviruses* from Bulb Crops in China. *Journal Archives of Virology*. 147: 419-428.
- Dijkstra J & de Jager CP de. 1998. *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises*. Springer, London.
- Hobbs HA, Hartman GL, Wang Y, Hill CB, Bernard RL, Pedersen WL & Domier DL. 2003. Occurrence of seed coat mottling in soybean plants inoculated with *bean pod mottle virus* and *Soybean mosaic virus*. *J. Plant Disease* 87: 1333-1335.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth edition. Academic Press, Tokyo.
- Hwang TY, Soon CJ, Oksun K, Hyang MP, Seuk KL, Min JS, Man SC, Yu YL, Hpng TY, Young UK, Wook HK & Yul HK. 2011. Intra host competition and interaction between *Soybean mosaic virus* (SMV) strains in mixed infected soybean. *Australian Journal of Crop Science* 5(11): 1379-1387.
- KimYH, Kim OS, Roh JH, Moon JK, Sohn SI, Lee C & Lee JY. 2004. Identification of *soybean mosaic virus* strains by RT-PCR analysis of *cylindrical inclusion coding region*. *Plant Disease* 88: 641-645.
- Koenig R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *J. Gen Virol*. 55:53-62.
- Koning G & Te Krony DM. 2003. Soybean seed coat mottling: Association with *soybean mosaic virus* and *Phomopsis* spp. seed infection. *J. Plant Disease* 87: 413-417.
- Maugh TM. 2007. *Pedoman Surveilensi Organisme Pengganggu Tumbuhan di Asia dan Pasifik*. Diterjemahkan oleh Andi Trisyono. ACIAR Monograph No. 119a.
- Saleh N & Baliadi Y. 2006. Penyakit *cowpea mild mottle virus* pada kedelai dan strategi pengendaliannya. *Bul. Palawija*. 11: 7-14.
- Saleh N. 2007. Sistem produksi kacang-kacangan untuk menghasilkan benih bebas virus. *J. Iptek Tanaman Pangan* 2 (1): 56-78.
- Tavasoli M, Shahraeen N & Ghorbani SH. 2009. Serological and RT-PCR detection of *cowpea mild mottle Carla virus* infecting soybean. *J. General and Molecular Virology* 1(1): 7-9.