

# **PENYAKIT MOSAIK KEDELAI DAN PENGELOLAAN *Soybean mosaic virus* TERBAWA BENIH**

**Wuye Ria Andayani**  
*Universitas Merdeka Madiun*

## **ABSTRAK**

*Soybean mosaic virus* (SMV) dan *Cowpea mild mottle virus* (CMMV) merupakan penyakit yang penting pada tanaman kedelai. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi penyebab penyakit mosaik kedelai dan mendapatkan metode pengelolaan SMV melalui perawatan benih. Gejala visual dikonfirmasi dengan *Indirect ELISA*, uji becak tunggal dan molekular serta pengamatan menggunakan *Scanning Microscope Electron* (SEM). Hasil deteksi menunjukkan bahwa SMV dan CMMV ditemukan menginfeksi tanaman kedelai di Kabupaten Ngawi, Madiun dan Ponorogo. Berdasarkan deteksi menunjukkan bahwa tanaman kedelai bergejala mosaik pada awal pertumbuhan terinfeksi oleh SMV. Sertifikasi benih terbukti menurunkan infeksi SMV. Benih yang tidak bersertifikat terinfeksi SMV lebih tinggi yaitu 25%, sedang benih bersertifikat 10%. Perlakuan pengeringan benih dengan oven (45 °C), penyimpanan pada suhu 15 °C dan pengeringan dengan oven (40 °C), penyimpanan benih pada suhu 15 °C, 29 °C berpengaruh terhadap daya tumbuh. Daya tumbuh masing-masing adalah 85%; 84%; 83%. Tanaman kedelai di lapang dengan perlakuan ini menghasilkan biji kedelai masing-masing adalah 1,88 t/ha; 1,86 t/ha; 1,87 t/ha. Pengeringan dengan oven pada suhu 40 °C dan penyimpanan dengan suhu 29 °C direkomendasikan pada pengelolaan benih. Penyimpanan benih dengan suhu yang berbeda (15 °C, 22 °C, 29 °C) tidak mempunyai pengaruh pada virus. Perlakuan pengeringan pada suhu 40 °C menurunkan proporsi tanaman terinfeksi dan kadar air dalam biji, tetapi penyimpanan pada suhu 29 °C menghambat deteriorasi.

Kata kunci: SMV, CMMV, strategi pengelolaan, *Indirect ELISA*, RT-PCR

## **ABSTRACT**

*Soybean mosaic virus* (SMV) and *Cowpea mild mottle virus* (CMMV) are the important disease of soybean. The objectives of this study was to detect the mosaic disease on soybean crops, and to get the method of SMV management through seed management. Visual symptoms were confirmed by indirect ELISA, test of singular lesion, molecular and Scanning Electron Microscopy observation. The result showed that SMV and CMMV disease infected soybean plants in Ngawi, Madiun and Ponorogo district. Based on detection that soybean plants with mosaic symptom has infected SMV from an early stage of development. Management strategy of virus disease through reducing diseases incidence as indicated that certificated seed contained 10% of infection and non certificated seeds were infected by SMV up to 25%. The seed germination from drying treatment of seed in 45 °C, and stored at 15 °C and drying of seed in 40 °C subsequently stored in 15 °C and 29 °C were 85%; 84%; 83% respectively. The Soybean yield from these seed treatments were 1,88 t/ha; 1,86 t/ha; 1,87 t/ha respectively. The oven drying at 40 °C and storage at 29 °C are recommended to be practiced. Surprisingly, storage at the different temperatures (15 °C, 22 °C, 29 °C) did not impact on virus levels. Furthermore, drying temperature using oven at 40 °C reduced the proportion of infected plant and decreased water content of seeds. Oven drying at 40 °C and storage at 29 °C treatments inhibited deterioration.

Key words: SMV, CMMV, management strategy, *Indirect ELISA*, RT-PCR

## PENDAHULUAN

Penyediaan benih kedelai bermutu sangat diperlukan untuk meningkatkan produksi (Sudaryanto & Swastika 2010). Salah satu pembatas produksi kedelai adalah penyakit virus. Di Indonesia, penyakit mosaik kedelai disebabkan oleh *soybean yellow mosaic virus* (SYMV), *soybean stunt virus* (SSV), *cowpea mild mottle virus* (CMMV), *soybean mosaic virus* (SMV), dan *peanut stripe virus* (PStV) (Rochan 1991; Horn *et al.* 1991; Tuhummury *et al.* 2000; Andayani *et al.* 2011). Virus yang dapat disebarkan melalui biji adalah SMV dan SSV. Di lapangan, salah satu sumber inokulum adalah benih terinfeksi virus (Iwai *et al.* 1985; Koning & Te Krony 2003; Hobbs *et al.* 2003). Virus yang tidak terbawa melalui biji kedelai adalah PStV, CMMV, dan SYMV. Sumber inokulum virus ini selain tanaman kedelai adalah tanaman dan gulma kacang-kacangan (Usharani *et al.* 2004; Saleh & Baliadi 2006; Tavasoli *et al.* 2009).

Tingkat penularan virus terbawa benih mencapai 30%. Benih yang terinfeksi virus ini akan tumbuh sebagai tanaman sakit dan menjadi sumber inokulum. Benih mempunyai arti penting dalam pemencaran virus (Albrechtsen 1989; Nakano *et al.* 1998). Di Indonesia, sertifikasi belum memperhitungkan penyakit tanaman, kecuali penyakit yang mengubah identitas benih. Sertifikasi benih dilakukan dengan sortasi karena benih terinfeksi SMV akan mengalami abnormalitas. Hal ini diharapkan dapat mengurangi infeksi virus, sehingga mampu menekan inokulum awal (Djauhari *et al.* 2003).

Pengelolaan virus terbawa benih dilakukan dengan mengurangi inokulum awal ( $X_0$ ) dan laju infeksi penyakit ( $r$ ). Inokulum awal merupakan salah satu fungsi dari proporsi penyakit tanaman pada setiap waktu ( $X_t$ ). Berdasarkan sifat-sifat SMV yang terbawa benih mengurangi  $X_0$  berarti menggunakan benih bebas virus. Laju infeksi penyakit tidak dapat dikurangi melalui populasi vektor, jika ada sumber inokulum karena penularannya secara nonpersisten. Pengelolaan penyakit di atas sesuai dengan prinsip epidemiologi, bahwa semakin rendah inokulum awal perkembangan penyakit atau laju infeksi semakin rendah (Zadoks & Schein 1979; Ali & Hassan 1992; Saleh 2007).

Penyakit mosaik kedelai yang disebabkan oleh SMV di Indonesia telah diteliti oleh Andayani *et al.* (1994); Sismindari & Sujadi (1996); Andayani *et al.* (2011) namun demikian sumber inokulum awal dari benih dan pengelolaan penyakit mosaik terbawa benih yang disebabkan oleh SMV belum pernah diteliti.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan dalam tiga tahap, yaitu: penelitian lapangan, laboratorium dan rumah kaca. Penelitian lapangan dilaksanakan di empat kabupaten yaitu Madiun, Magetan, Ponorogo, dan Ngawi. Penelitian laboratorium dilaksanakan di Laboratorium Virologi, Bioteknologi, Fakultas Pertanian UGM Yogyakarta dan *Plant Pathology Utsunomiya University Japan*. Penelitian lapangan dilaksanakan di lahan Balai Penyuluhan Pertanian (BPP) Kedunggalar, Kabupaten Ngawi. Bahan berupa tanaman dan biji serta benih kedelai bersertifikat varietas Wilis.

### Identifikasi Gejala Penyakit

Empat desa dipilih di setiap kabupaten. Setiap hamparan merupakan pertanaman kedelai yang ditanam oleh petani, seluas  $\pm 5000$  m<sup>2</sup>. Hamparan dibentuk dengan garis diagonal, masing-masing titik diagonal  $\pm 100$  tanaman (Maugh 2007). Pengamatan

dilakukan sejak tanaman berumur 14 hari setelah tanam (HST) dengan selang tujuh hari sampai panen.

#### **a. Gejala Penyakit di Lapangan**

Pengamatan gejala penyakit terdiri atas: gejala awal pada daun muda yang baru tumbuh dan daun yang telah tumbuh sempurna. Gejala penyakit diambil secara acak dan dikelompokkan berdasarkan variasi gejala yang tampak.

#### **b. Gejala pada Biji**

Saat masak fisiologi pada tanaman dengan gejala penyakit mosaik sejak umur 14–28 HST dipanen dari masing-masing lokasi. Kedelai brangkasian dikeringkan untuk memperoleh biji kering dengan kadar air 9–10%. Biji-biji tersebut diambil sebagai contoh dan dikelompokkan berdasarkan morfologi biji. Setiap ulangan terdiri dari 2000 biji (International Seed Testing Association 1999) dengan tiga kali ulangan.

#### **c. Gejala pada Tanaman Hasil Penularan**

Biji yang digunakan berasal dari tanaman bergejala mosaik umur 14–28 HST. Biji tersebut ditanam di polybag dan disungkup dalam kotak kasa sebagai sumber inokulum. *Aphis glycines* digunakan sebagai vektor dari SMV dan dipuaskan selama satu setengah jam. Perbedaan gejala diamati dari hasil infeksi di lapangan (alami) dengan hasil penularan.

### **Penyebab Penyakit**

Deteksi berdasarkan gejala visual di atas dilengkapi dengan uji ELISA dan uji molekular serta pengamatan mikroskopi dengan *mikroskop elektron*. Uji ELISA dilakukan pada tanaman bergejala mosaik umur 14–28 HST dan 28–42 HST serta biji kering.

#### **a. Uji ELISA**

Uji ELISA dilakukan dengan metoda *Indirect-Enzyme Linked Immnosorbent Assay* (I-ELISA) tanpa pelapisan (Koenig 1981). Antigen yang berasal dari ekstrak daun dan bagian-bagian biji dari tanaman bergejala mosaik dan sehat dibuat dengan pengenceran  $10^{-2}$  dari masing-masing lokasi. Antibodi poliklonal terhadap SMV yang tidak dimurnikan dengan pengenceran  $10^{-3}$  berasal dari laboratorium virologi UGM Yogyakarta.

##### *1) Soybean mosaic virus* dalam Tanaman Kedelai

Ekstrak daun bergejala mosaik tanaman kedelai umur 14–28 HST dan sehat digunakan sebagai antigen. Penyiapan antigen dilakukan sebagai berikut: (1) daun bergejala mosaik dan sehat diambil secara acak, yaitu kurang lebih 10% dari populasi tanaman bergejala di setiap areal; (2) sampel tersebut di simpan dalam kotak pendingin.

##### *2) Soybean mosaic virus* dalam Biji Kedelai

Biji-biji kedelai dari tanaman bergejala mosaik pada umur 14–28 HST di empat kabupaten diuji untuk mengetahui hubungan antara abnormalitas biji kedelai dengan infeksi SMV dalam biji. Contoh biji tersebut dideteksi dengan 10 kali ulangan.

Menurut Iwai dan Wakimoto (1985) penyiapan antigen yang digunakan untuk distribusi SMV dalam biji sebagai berikut: (1) contoh kerja diambil dari beberapa lokasi, (2) biji dikecambahkan, dan dipisahkan bagian-bagian biji, (3) bagian kulit dan keping biji setiap uji memerlukan empat biji, lembaga memerlukan 12 biji, biji utuh atau

keseluruhan memerlukan dua biji dan dicuci dengan air steril yang mengalir selama 15 menit, (4) satu gram bahan digerus dengan 10 ml larutan PBST 0,02 M pH 7,4 dan dipresipitasi selama empat menit serta dilakukan pemipetan untuk memperoleh antigen.

### **b. Uji Becak Tunggal**

Tanaman kedelai umur 28–42 HST yang bergejala mosaik digunakan sebagai sumber inokulum untuk menghasilkan becak lokal pada tanaman *Chenopodium amaranticolor*.

### **c. Uji Molekular**

RNA total tanaman bergejala mosaik kedelai umur 14–28 HST diekstraksi dengan *Isogen*. Hasil ekstraksi RNA total sebagai RNA cetakan dalam RT-PCR menggunakan *First Strand cDNA Synthesis kit* (Fermentas). Hasil RT sebagai *cDNA complementary* pada reaksi PCR menggunakan *Maxima™ Hot Start Taq DNA Polymerase* (Fermentas) dan primer *Forward*, C15' dan primer *Reverse*, C13'. Target fragmen DNA hasil amplifikasi dari SMV berukuran sekitar 1385 bp (Kim *et al.* 2004).

Diagnosis di atas diperkuat dengan primer *Universal* untuk famili *Potyviridae* (Chen *et al.* 2001). RNA total diekstraksi dengan *RNA Easy Extraction Kit* (Qiagen). Hasil ekstraksi RNA total sebagai RNA cetakan dalam RT-PCR. Hasil RT sebagai *cDNA complementary* pada reaksi PCR menggunakan *KOD PLUS NEO* (TOYOBO Co.LTD).

Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis dengan PAGE (*Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) dalam TBE (*Tris-Borate EDTA*) buffer 1 X, dan divisualisasikan dengan UV *transilluminator* setelah diberi pewarna dengan *ethidium bromide*.

### **d. Mikroskop Elektron**

Pengamatan ini bertujuan untuk mengamati morfologi nukleoprotein dari penyebab penyakit mosaik kedelai umur 28–42 HST. Pengecatan menggunakan 2% *Phosphotungstic acid* (PTA) 2%, pH 6,5 (Dijkstra 1998).

### **e. Pengelolaan Penyakit**

Pengelolaan penyakit ini difokuskan dengan menekan jumlah inokulum awal, dari virus terbawa benih untuk menghasilkan sumber inokulum awal yang rendah.

#### 1) Penggunaan Benih Bersertifikat

Penggunaan benih bersertifikat dimaksudkan untuk mengetahui keterbawaan virus pada benih tersebut. Penelitian dilakukan melalui uji kesehatan benih. Tingkat infeksi SMV pada biji dilakukan dengan uji ELISA, dan uji tumbuh. Persentase tanaman sakit dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$P = \frac{a}{b} \times 100\%$$

P: Persentase tanaman sakit; a: Jumlah tanaman sakit; b: Jumlah tanaman seluruhnya

#### 2) Perlakuan Benih

Perlakuan benih bertujuan untuk menghilangkan infektivitas virus dalam benih dengan daya tumbuh tetap optimal. Perlakuan benih menggunakan kedelai brangkasian dari tanaman bergejala penyakit mosaik pada umur 14–28 HST di lapangan. Cara

pengeringan terdiri empat aras yaitu pengeringan dengan oven pada suhu 35 °C, 40 °C, 45 °C, dan sinar matahari sebagai kontrol dengan kadar air 9–10%. Biji-biji tersebut disimpan selama empat bulan yang terdiri dari tiga aras yaitu penyimpanan dalam *cold storage*, *incubator*, dan gudang, masing-masing pada suhu 15 °C, 22 °C, dan 29 °C sebagai kontrol.

a) Uji Kesehatan Benih

Pengujian ini dilakukan dengan uji ELISA dan uji lapangan. Biji yang dikecambahkan dari tanaman sakit umur 14–28 HST sebagai bahan antigen. Uji lapangan bertujuan untuk mengevaluasi tanggapan tanaman kedelai pada umur 14–28 HST terhadap proses pengeringan benih dan tingkat infeksi SMV. Pengamatan dilakukan dengan menghitung proporsi tanaman terinfeksi umur 14–28 HST.

b) Produktivitas

Produktivitas kedelai di lapangan dihitung saat biji masak secara fisiologi (70 HST). Faktor 1: suhu pengeringan benih terdiri dari empat aras: oven pada suhu 35 °C, 40 °C, 45 °C dan sinar matahari sebagai kontrol. Faktor 2: suhu penyimpanan benih terdiri dari tiga aras: 15 °C, 22 °C dan 29 °C sebagai kontrol. Tata letak uji ini adalah acak kelompok faktorial 4 x 3. Setiap contoh diambil 100 tanaman dengan tiga kali ulangan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Gejala Penyakit di Lapangan

Gejala sejak awal pertumbuhan (14–28 HST) menunjukkan gejala infeksi SMV karena infeksi virus tersebut terjadi melalui benih. Meskipun kemungkinan terdapat bersama-sama dengan virus lain, terutama setelah melewati awal pertumbuhan. Oleh karena itu patogen tersebut untuk sementara diberi nama virus penyebab penyakit mosaik kedelai. Keanekaragaman gejala pada tanaman yang disebabkan oleh virus penyebab penyakit mosaik kedelai di lapangan tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Keaneka ragam gejala mosaik pada tanaman kedelai.

Umur pengamatan (HST)	Lokasi	Gejala penyakit
14–28	Ponorogo	Dm, K, Tr
	Madiun	Dm, Tr
	Magetan	Tm, Dm, Tr
	Ngawi	Dm, Vb, Tm, K
28–42	Ponorogo	M, Vb, Tr
	Madiun	M, Dk, Tr, Vc
	Magetan	Tm, M, K, Dm, Tr
	Ngawi	M, Dl, Dk, Tr, Dm, K

Keterangan: Permukaan daun tidak rata (Tr), daun mengecil (Dm), tepi daun melengkung (Tm), tulang daun menebal (Vb), klorosis (K), mosaik sampai ke daun yang paling muda dengan warna hijau gelap di sepanjang tulang (M), daun melepuh dengan warna hijau tua dan melengkung ke dalam (Dl) dan ke luar (Dk), pemucatan tulang daun, mosaik sepanjang tulang daun (Vc).

Gejala penyakit menampakkan keanekaragaman sejak umur 14–28 HST. Persamaan gejala ditampakkan dengan daun mengecil (Dm) dan permukaan daun tidak rata (Tr), serta gejala mosaik (M).

Hasil penularan dari benih yang berasal dari tanaman kedelai bergejala pada umur 14–28 HST di lapangan dengan *A. glycines* hasil dari rearing menunjukkan tidak semua tanaman bergejala mosaik.

## Penyebab Penyakit

### a. Uji ELISA

#### 1) Soybean mosaic virus dalam Tanaman Kedelai

Pengujian I-ELISA dengan pelacak antibodi poliklonal terhadap SMV menunjukkan penyebab penyakit dari gejala mosaik yang beranekaragam pada tanaman kedelai umur 14–28 HST bereaksi positif (Tabel 2).

Tabel 2 Deteksi pada tanaman kedelai berumur 14–28 HST yang tampak sehat dan bergejala mosaik.

Lokasi	Macam gejala pada tanaman	Rerata nilai absorbansi ( $A_{405\text{ nm}}$ ) <sup>*)</sup>	Keterangan
Ponorogo	Tampak sehat	0,246	–
	Bergejala	0,850	+
Madiun	Tampak sehat	0,337	–
	Bergejala	0,932	+
Magetan	Tampak sehat	0,281	–
	Bergejala	0,963	+
Ngawi	Tampak sehat	0,453	+
	Bergejala	0,989	+
Daun sehat		0,224	
Bufer		0,219	

Keterangan: \*) Rerata dari 10 ulangan; Nilai negatif :  $\leq 0,438$  (dua kali nisbah bufer).

Hasil uji ELISA pada Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai absorbansi ultraviolet dari reaksi antibodi dengan ekstrak tanaman nampak sehat lebih tinggi dibandingkan reaksinya dengan *coating buffer* (bufer Natrium Karbonat pH 9,6). Hal ini disebabkan terjadinya reaksi tidak spesifik antara antibodi dengan ekstrak tanaman nampak sehat. Penyebab reaksi tidak spesifik tersebut karena antigen yang diimunisasikan masih mengandung protein tanaman sehat. 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 bahwa gejala mosaik pada tanaman kedelai di Kabupaten Ponorogo, Madiun, Magetan, dan Ngawi pada umur 14–28 HST bereaksi positif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Meskipun di Kabupaten Ngawi, tanaman yang tampak sehat menghasilkan nilai dua kali atau lebih besar daripada kontrol negatif. Tanaman yang tampak sehat ini menunjukkan reaksi positif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Hal ini mungkin dapat terjadi karena beberapa penyebab. Kemungkinan pertama adalah tanaman terinfeksi virus, tetapi belum menampakkan gejala. Kemungkinan kedua adalah spesifitas antibodi rendah, sehingga masih mampu bereaksi dengan virus lain yang menghasilkan gejala *masking* (samar), karena antibodi poliklonal yang digunakan tidak dimurnikan.

## 2) Soybean mosaic virus dalam Biji Kedelai

Berdasarkan contoh campuran dari 32 lokasi pengamatan menunjukkan biji-biji dari tanaman kedelai bergejala mosaik umur 14–28 HST (Tabel 3).

Tabel 3 Distribusi *Soybean mosaic virus* dalam biji dari tanaman bergejala mosaik

Gejala pada biji	Bagian tanaman	Rerata nilai absorbansi ( $A_{405\text{nm}}$ ) <sup>*)</sup>	Keterangan
<i>Non mottle</i> <sup>**)</sup>	Kulit biji	0,987	+
	Keping biji	1,052	+
	Embrio	1,047	+
	Biji penuh	0,832	+
<i>Mottle</i> <sup>***)</sup>	Kulit biji	0,993	+
	Keping biji	0,972	+
	Embrio	0,547	+
	Biji penuh	1,024	+
Biji sehat <sup>****)</sup>		0,094	-
Bufer		0,092	-

Keterangan: \*)Rerata dari tiga kali ulangan; \*\*) kondisi bagian kulit biji tidak nampak bergejala burik (*non-mottle*); \*\*\*) Kondisi bagian kulit biji nampak bergejala burik (*mottle*); \*\*\*\*) : Biji yang dihasilkan dari tanaman sehat; Nilai negatif  $\leq 0,184$  (dua kali nisbah bufer).

Biji-biji yang dikecambahkan dari tanaman kedelai bergejala mosaik umur 14–28 HST tersebut bereaksi positif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Gejala biji *non mottle* tidak mempunyai jaminan bereaksi negatif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV. Hal ini dapat terjadi karena proses pemasakan dan pengeringan benih tidak menyebabkan protein yang melindungi asam nukleat terdenaturasi.

## b. Uji Becak Tunggal

Inokulasi secara mekanik dengan ekstrak daun kedelai umur 28–42 HST bergejala mosaik ke tanaman *C. amaranticolor* diantara daun termuda dan tertua menghasilkan becak lokal. Penelitian ini menunjukkan virus penyebab penyakit mosaik di lapangan mempunyai infektifitas pada tanaman *C. amaranticolor*.

## c. Uji Molekular

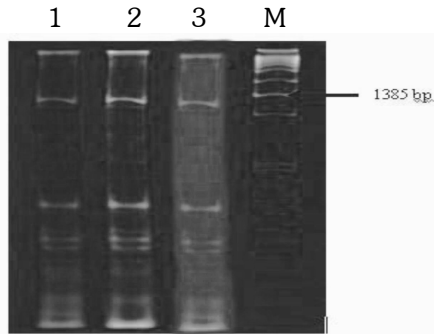
### a. Soybean mosaic virus

Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F dari isolat Madiun dan Ngawi serta Magetan mempunyai ukuran 1385 bp adalah SMV (Gambar 1).

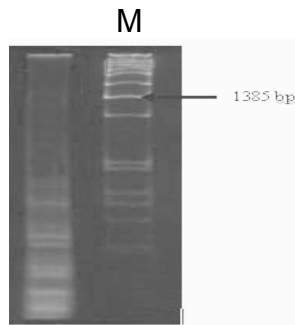
Fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F berukuran 1385 bp juga digunakan oleh Kim *et al.* 2004. Fragmen DNA yang tidak berhasil di-amplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176 F dari isolat asal Ponorogo tertera pada Gambar 2.

Hasil deteksi ini menunjukkan reaksi negatif dapat terjadi karena beberapa penyebab. Kemungkinan pertama adalah virus penyebab penyakit mosaik kedelai bukan SMV. Kemungkinan kedua adalah virus tersebut merupakan salah satu anggota genus *Potyvirus*.

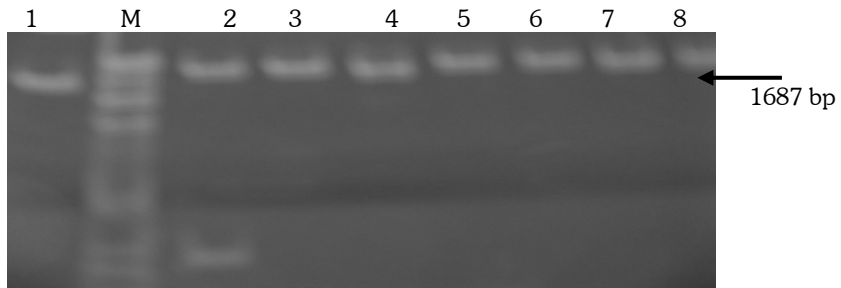
Analisis molekular dari contoh daun kedelai diatas juga digunakan untuk mengetahui fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer *Universal* yang berukuran sekitar 1687 bp. Pasangan primer *Universal* yaitu *Sprimer* (F) dan *oligo d(T)(M4)* (R) digunakan untuk identifikasi famili *Potyviridae* (Gambar 3).



Gambar 1 Fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR menggunakan primer CI 5560R dan CI 4176F. Lajur 1. isolat asal Madiun; 2. isolat asal Ngawi; 3. isolat asal Magetan; M: DNA Ladder 1 kb sebagai marker (Fermentas).



Gambar 2 Fragmen DNA yang tidak berhasil diamplifikasi dengan primer CI 5560R dan CI 4176F dari isolat asal Ponorogo. M: DNA Ladder 1 kb sebagai marker (Fermentas).



Gambar 3 Fragmen DNA hasil amplifikasi RT-PCR menggunakan primer *Universal* untuk identifikasi famili *Potyviridae*.

Lajur 1–2 isolat asal Magetan; 3–4 isolat asal Ngawi; 5–6 isolat asal Madiun; 7–8 isolat asal Ponorogo; M: DNA Ladder 1 kb sebagai marker (Promega).

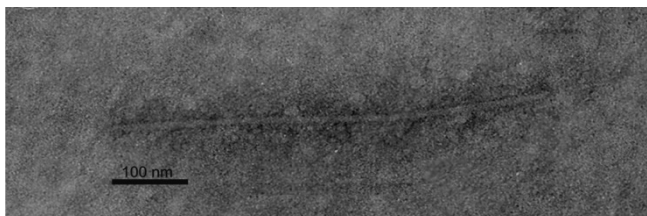
Berdasarkan fragmen DNA hasil amplifikasi menunjukkan isolat dari Kabupaten Ponorogo tidak teramplifikasi dengan pasangan primer yaitu primer CI 5560R dan 4176F, ternyata pada uji molekular teramplifikasi dengan pasangan primer *Universal*. Menurut *Chen et al. (2001)* fragmen DNA hasil amplifikasi dengan primer *Universal* digunakan untuk identifikasi dari famili *Potyviridae* berukuran sekitar 1687 bp.



Hasil ini membuktikan penyakit mosaik kedelai di empat lokasi penelitian yaitu Kabupaten Magetan, Ngawi, Madiun, dan Ponorogo pada umur 14–28 HST disebabkan oleh virus dari famili *Potyviridae*.

d. Mikroskopi Elektron

Hasil penelitian menunjukkan partikel nukleoprotein (virus) berbentuk batang kaku dan panjang berukuran 650 nm serta berdiameter 13–15 nm adalah CMMV.



Gambar 4 Partikel nukleoprotein (virus) pada kajian mikroskopi elektron.

### 1) Pengelolaan Benih

a. Penggunaan Benih Bersertifikat

Benih bersertifikat dan tidak bersertifikat pada uji ELISA, masing-masing bereaksi positif sebesar 10% dan 25%. Benih yang terinfeksi SMV tidak dapat dilakukan diagnosis secara visual saja. Berdasarkan hasil pengamatan tanaman kedelai bergejala mosaik dengan uji tumbuh pada benih bersertifikat menunjukkan persentase penampakan gejala 25%, lebih kecil dibandingkan benih yang tidak bersertifikat sebesar 40% (Tabel 4). Gejala mosaik pada tanaman kedelai juga dapat disebabkan oleh patogen terbawa benih yang lain, sehingga persentase penampakkannya pada uji tumbuh lebih tinggi dibandingkan diagnosis secara serologi.

Tabel 4 Proporsi tanaman kedelai bergejala mosaik

Jenis benih	ELISA	Uji tumbuh (%) <sup>*)</sup>
Benih bersertifikat	10% <sup>***)</sup>	25,00 <sup>**)</sup>
Benih tidak bersertifikat	25%	40,00

\*) 
$$\frac{\text{Jumlah tanaman bergejala}}{\text{Jumlah tanaman uji}} \times 100\%$$

\*\*): Rerata jumlah tanaman bergejala masing-masing menggunakan 5 tanaman uji

\*\*\*): 
$$\frac{\text{Jumlah reaksi dengan nilai positif}}{\text{Jumlah uji}} \times 100\%$$

Hasil uji kesehatan benih dengan benih bersertifikat mengindikasikan bahwa infeksi SMV pada biji tidak diagnostik. Biji tidak bergejala atau tampak normal dapat mempunyai reaksi positif dengan antibodi poliklonal terhadap SMV, tetapi benih bersertifikat lebih baik dibandingkan benih tidak bersertifikat.

b. Perlakuan Benih

1) Kesehatan Benih

Hasil penelitian menunjukkan rerata reaksi positif pada uji ELISA dari benih terendah terjadi dengan pengeringan oven (45 °C) yaitu 58,35%. Selain itu pengeringan benih dengan sinar matahari pada suhu ±40 °C bereaksi positif yaitu 75% lebih sedikit dibandingkan dengan pengeringan dengan oven pada suhu 40 °C yaitu 88,35% (Tabel 5). Pemrosesan benih menggunakan suhu diatas akan mempengaruhi protein, sehingga virus mengalami inaktivasi. Selain itu sifat antigeniknya menyebabkan sifat serologi tidak bereaksi terhadap antibodi poliklonal dari SMV.

Tabel 5 Benih terinfeksi SMV setelah perlakuan benih

Pengeringan	Hasil uji ELISA			Rerata (%)
	Penyimpanan			
	15 °C	22 °C	29 °C	
Oven (35 °C)	18/20 <sup>a)</sup>	20/20 <sup>a)</sup>	20/20 <sup>a)</sup>	96,65
Oven (40 °C)	16/20	17/20	20/20	88,35
Oven (45 °C)	9/20	13/20	13/20	58,35
Matahari (± 40 °C)	12/20	15/20	18/20	75,00

Keterangan :

$$^a) : \frac{\text{Jumlah reaksi dengan nilai positif pada kolom yang sama}}{\text{Jumlah uji}} \times 100\%$$

Menurut Iwai *et al.* (1985) dan Albrechtsen (1989b), bahwa deteksi virus pada biji perlu dipastikan karena virus berada dalam dua bentuk di dalam biji yaitu: (1) dalam keadaan infeksi dan tidak dapat dideteksi secara serologi; (2) dalam keadaan tidak infeksi, tetapi secara serologi dapat terdeteksi.

2) Uji Tumbuh

Kejadian penyakit pada pengamatan umur 14–28 HST menunjukkan gejala mosaik kedelai tertinggi terjadi pada proses pengeringan benih dengan oven suhu 35 °C, dan terendah suhu 45 °C. Proporsi tanaman terinfeksi SMV dicantumkan pada Tabel 6.

Tabel 6 Proporsi tanaman terinfeksi SMV dari hasil pengeringan benih

Pengeringan benih <sup>a)</sup>	Proporsi tanaman terinfeksi (%) <sup>**)</sup>
Oven (35 °C)	6,17 a <sup>***)</sup>
Oven (40 °C)	3,50 b
Oven (45 °C)	1,00 c
Matahari (± 40 °C)	5,17 a
BNT 0,95%	1,36

Keterangan:

<sup>a)</sup> Benih dari tanaman bergejala di lapangan dan telah didiagnosis positif SMV dengan uji ELISA dan molekular

$$^*) : \frac{\text{Jumlah tanaman bergejala}}{\text{Jumlah tanaman yang diamati (50 tanaman)}} \times 100\%$$

<sup>\*\*\*)</sup>: Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5%

### 3) Produktivitas

Produktivitas kedelai dari benih terinfeksi yang diperlakukan dengan proses pengeringan dengan kadar air 9–10% dan penyimpanan benih selama empat bulan antara 1,27 t/ha sampai 1,88 t/ha (Tabel 7).

Tabel 7. Produktivitas kedelai hasil perlakuan benih.

Pengeringan	Produktivitas kedelai (ton/ha)		
	Penyimpanan		
	15 °C	22 °C	29 °C
Oven (35 °C)	1,31 d <sup>*)</sup>	1,28 d	1,27 de
Oven (40 °C)	1,87 a	1,83 b	1,86 a
Oven (45 °C)	1,88 a	1,80 b	1,84 b
Matahari ( $\pm$ 40 °C)	1,72 c	1,69 c	1,60 cd

Keterangan:

<sup>\*)</sup> : Angka yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji jarak ganda Duncan

Proses pengeringan benih dengan oven pada suhu 45 °C, jika dikombinasikan dengan penyimpanan benih pada suhu 15 °C mempunyai kelemahan yaitu biaya produksi yang dikeluarkan sangat tinggi karena penyimpanan pada suhu tersebut secara praktis sulit dicapai, kecuali jika digunakan untuk benih pokok. Hasil yang sama diikuti dengan kombinasi pengeringan oven pada suhu 40 °C dan penyimpanan pada suhu 29 °C. Keistimewaan cara ini adalah proporsi tanaman terinfeksi SMV rendah dan produktivitas tercapai.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan

1. Penyakit mosaik terbawa benih kedelai menghasilkan gejala yang beraneka ragam pada tanaman dan biji kedelai di Kabupaten Madiun, Magetan, Ponorogo, Ngawi.
2. Berdasarkan uji ELISA, dan molekular penyebab penyakit mosaik terbawa benih kedelai adalah SMV. Infeksi CMMV ditemukan pada tanaman kedelai berumur 28–42 HST. Partikel nukleoprotein berbentuk *flexious* dengan panjang berukuran 650 nm dan berdiameter 13–15 nm.
3. Perlakuan benih dengan oven pada suhu 40 °C dan 45 °C dapat menghilangkan infektifitas virus pada biji, jika dikombinasikan dengan penyimpanan benih pada suhu 15 °C dapat digunakan untuk memproduksi benih pokok. Perlakuan benih dengan oven pada suhu 40 °C, jika dikombinasikan dengan penyimpanan benih pada suhu 29 °C dapat digunakan untuk memproduksi benih sebar.

### Saran

Perlu pengecekan pada kemurnian dan konsentrasi RNA sebelum RT-PCR dilakukan. Selain itu hasil "PCR product" dilakukan kloning dan sekuensing.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional Nomor : 0084/SP2H/PP/K7/KL/IV/2011. Penulis juga

menyampaikan terimakasih kepada Prof (Ret). Dr. Y.B. Sumardiyono, Dr. Sedyo Hartono, M.P, Prof. Dr. Prapto Yudono Msc (UGM Yogyakarta), 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 serta mikroskop elektron.

## DAFTAR PUSTAKA

- Albrechtsen SE. 1989. *Seed borne virus, lecture notes*, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Copenhagen. 62 pp.
- Ali A, Hassan S. 1992. Ecology and epidemiology of *Soybean mosaic virus* in the North West Frontier Province of Pakistan. *Phytopathol* 5: 21–28.
- Andayani WR, Sumardiono YB, Somowiyarjo S. 1994. Isolasi dan pemurnian *Soybean mosaic virus*. Tesis. Program Pasca Sarjana. Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. 59 hal. Tidak dipublikasikan
- Andayani WR, Sumardiyono YB, Hartono S, Yudono P. 2011. Incidence of soybean mosaic disease in East Java Province. *Agrivita Science*. Vol. 33. Number 1: 15–22
- 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. *archiv of virol (arch. virol.)*. 146: 757–766.
- Dijkstra J, Cees P, Jager. 1998. *Practical plant virology*. Protocols and exercises. Springer. 293–294 p.
- Djauhari SS *et al.* 2003. *Kedelai (deskripsi, budidaya dan sertifikasi benih)*. Dinas Pertanian Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Jawa Timur. The quality soybean seed multiplication and training project. Japan International Cooperation Agency. 143 Hlm.
- Hobbs HA *et al.* 2003. Occurrence of seed coat motling in soybean plants inoculated with *Bean pod mottle virus* and *Soybean mosaic virus*. The American Phytopathological Society. *Plant Disease* 87: 1333–1335.
- Horn N, Saleh N, Baliadi Y. 1991. *Cowpea mild mottle virus* could not be detected by ELISA in soybean and groundnut seeds in Indonesia. *Neth. Plant Pathol.* 97: 125–127.
- [ISTA] International Seed Testing Association. 1999. *International rules for seed testing*. Seed Science Technol.
- Iwai H, Ito T, Wakimoto S. 1985. Distribution patterns of *Soybean mosaic virus* Strain B and D. *Reprinted from annals of the Phytopathological Society of Japan* 51: 475–481.
- Kim YH *et al.* 2004. Identification of *Soybean mosaic virus* strains by RT-PCR analysis of *Cylindrical Inclusion coding region*. Publication No. D-2004-0322-02R. 2004. The American Phytopathological Society. *Plant Disease* 88:641–645.
- Koenig R. 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. *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. The American Phytopathological Society. Publication no D-2003-0210-01R. *Plant Disease* 87: 413–417.
- Maugh TM. 2007. *Pedoman surveilensi organisme pengganggu tumbuhan di Asia dan Pasifik*. Alih bahasa oleh Andi Trisyono. ACIAR Monograph No. 19a. 192 hlm.
- Nakano M *et.al.* 1998. Distribution of soybean virus diseases in Indonesia. Tentative report of JICA-RIFCB Project on breeding of virus resistant on soybean. Bogor.

- Rochan M. 1991. *Peanut Stripe virus* infection on soybean and its transmission to peanut. Seminar hasil penelitian tanaman pangan Balittan Bogor (Indonesia). 19–20 Februari 1991.
- Saleh N, Baliadi Y. 2006. Penyakit *Cowpea mild mottle virus* pada kedelai dan strategi pengendaliannya. *Bul. Palawija* No. 11:7–14.
- Saleh N. 2007. Sistem produksi kacang-kacangan untuk menghasilkan benih bebas virus. *Iptek Tanaman Pangan*. Vol 2 No 1–2007. Hlm. 56–78.
- Sismindari, Sujadi. 1996. Kloning gen coat protein SMV dengan pendekatan PCR. *Perlindungan Tanaman Indonesia*. Vol 2, No. 1. Hlm. 36–39.
- Sudaryanto T, Swastika DKS. 2010. Ekonomi kedelai di Indonesia. Dalam Sumarno, Suyanto, A. Widjono, Hermanto, dan H. Kasim (Ed). *Kedelai; teknik produksi dan pengembangan*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Kementerian Pertanian. Penerbit PT Balai Pustaka. Hlm 1–30.
- Tavasoli M, Shahraeen N, Ghorbani SH. 2009. Serological and RT-PCR detection of *Cowpea mild mottle Carla Virus* infecting soybean. *General and Molecular Virology*. Vol. 1 (1). 7–9.
- Usharani KS, Surendranath B, Haq QMR, Malathi VG. 2004. *Yellow mosaic virus* infecting soybean in Northern India is distinct from the species infecting soybean in Southern and Western India. *Current Science*. Vol. 86. No. 6. 845–850 .
- Warwick D, Demski JW. 1988. Susceptibility and resistance of soybean to *Peanut stripe virus*. *Plant Disease*. 72: 19–21.
- Zadoks JC, Schein RD. 1979. *Epidemiology and plant disease management*. Oxford Univ. Press. New York.