

KONSENTRASI PEG 6000 DAN SENYAWA ADITIF BUFER FOSFAT YANG DIPERLUKAN
DALAM PEMURNIAN SOYBEAN MOSAIC VIRUS

CONCENTRATION OF PEG 6000 AND ADDITIVE SUBSTANCE OF PHOSPHATE BUFFER
NEEDED IN PURIFICATION OF SOYBEAN MOSAIC VIRUS

Y.B. Sumardiyono, Susanto Somowiyarjo
Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada

Wuye Ria Andayani
Universitas Merdeka, Madiun

ABSTRACT

The objective of study was to determine the concentration of PEG 6000 for precipitation of virus particles, and additive substance added to the resuspension buffer, during the purification of Soybean Mosaic Virus isolated from Yogyakarta. The results showed that precipitation with PEG 6000 of 6 per cent at final concentration, followed by either two or three cycles differential centrifugation and the virus obtained from each centrifugation resuspended in Phosphate buffer 0.05 M contained NaCl 0.1 M added with 0.005 M Na-EDTA, and then subjected to 10 - 50 per cent sucrose density gradient centrifugation. The purified virus obtained was infective, with the ultraviolet absorption maximum at 260 nm and minimum at 247 nm, ratio A_{280}/A_{260} was 0.7343. Based on extinction coefficient at 260 nm = 2.4, the yield was 0.306 mg/ 100 g infected leaves. SDS-PAGE indicating that coat protein molecule weight was 29.71 kD.

Key words: soybean mosaic virus, method, virus purification

INTISARI

Penelitian bertujuan untuk mengetahui konsentrasi PEG 6000 untuk presipitasi partikel virus dan menentukan senyawa aditif dalam bufer resuspensi, pada pemurnian *Soybean Mosaic Virus* isolat Yogyakarta, agar dihasilkan sediaan virus dengan infektifitas yang tinggi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa presipitasi dengan *Polyethylene Glycol* (PEG) 6000 konsentrasi 6% diikuti dengan dua atau tiga siklus sentrifugasi diferensial dan pengambilan fase virus (resuspensi) dengan bufer fosfat 0,05 M pH 7,0 yang mengandung NaCl 0,1 M ditambah bahan aditif Na-EDTA 0,005 M dan dilanjutkan dengan sentrifugasi dalam gradien sukrose 10 - 50% diperoleh sediaan virus yang infeksi. Virus menunjukkan absorpsi ultraviolet maksimal pada 260 nm dan minimal 247 nm, nisbah A_{280}/A_{260} adalah 0,7343. Berdasarkan koefisien ekstinksi OD_{260 nm} = 2,4 maka hasil yang diperoleh adalah 0,306 mg/ 100 g daun terinfeksi. Berat molekul *coat protein* pada elektroforesis dengan gel poliakrilamida - SDS diperoleh berat molekul 29,71 kD.

Kata kunci: soybean mosaic virus, metode, pemurnian virus

PENGANTAR

Penyakit mosaik pada kedelai (*Glycine max* L. Merr.) yang disebabkan *Soybean Mosaic Virus* (SMV) terdapat di semua daerah penghasil kedelai, dan merupakan penyakit penting karena dapat menurunkan hasil panen antara 10 - 90%. Besarnya kerugian tergantung pada umur berapa tanaman terinfeksi, strain virus, adanya infeksi virus lain dan kondisi lingkungan (Bos, 1972; Sinclair, 1993; Sumardiyono, 1989). Penyebab penyakit termasuk anggota kelompok *Potyvirus*.

Di Daerah Istimewa Yogyakarta, penyakit mosaik kedelai juga ditemukan. Belum diketahui apakah penyakit disebabkan oleh virus dari strain atau isolat yang sama dengan di tempat lain atau

bukan. Sebagian hasil karakterisasi antara lain menunjukkan bahwa virus dapat ditularkan secara mekanik melalui sap tanaman sakit, dengan vektor beberapa spesies aphid secara non persisten, dan melalui biji yang berasal dari tanaman sakit (Sumardiyono, 1989, Sumardiyono *et al.* 1994; 1995). Untuk karakterisasi lebih lanjut akan diperlukan sediaan virus murni. Pemurnian SMV telah diketahui sejak tahun 1967 (Ross, 1967). Cara pemurnian tersebut perlu penyesuaian untuk setiap strain yang berbeda.

Pemurnian virus berbentuk benang (*filamentous*) kerap kali mengalami kegagalan yang disebabkan karena terjadinya agregasi partikel virus. Agregasi dapat terjadi pada setiap

tahap pemurnian. Agregasi virus selain terjadi oleh sebab fisik yaitu sentrifugasi pada kecepatan tinggi dan rendah, dapat juga karena bahan-bahan kimia yang dipakai dalam proses pemurnian (Iwai dan Wakimoto, 1985; Regenmortel, 1982). tetapi yang terbanyak pada tahap presipitasi partikel virus, tahap homogenisasi dan sentrifugasi deferensial. Usaha untuk mengurangi agregasi partikel virus antara lain dengan pemilihan konsentrasi polietilen glikol (PEG) 6000 untuk presipitasi, molaritas bufer untuk resuspensi fase virus berikut senyawa aditif yang harus ditambahkan.

Penelitian bertujuan untuk mempelajari cara pemurnian SMV isolat Yogyakarta, berdasarkan cara Ross (1967) yang diperbaiki oleh Iwai dan Wakimoto (1985); dengan memodifikasi cara presipitasi dengan *Poly Ethylen Glykol* (PEG) 6000, dan senyawa aditif yang ditambahkan pada bufer fosfat untuk resuspensi. Evaluasi hasil pemurnian dilakukan dengan uji infektifitas relatif pada tanaman indikator.

BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Virologi Tumbuhan Fakultas Pertanian dan Laboratorium Ilmu Hayati serta Laboratorium Biokimia PAU Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada.

B. Isolasi dan Perbanyakan Virus

Soybean Mosaic Virus (SMV) isolat Yogyakarta diperoleh dari kedelai varietas Wilis yang berasal dari Gunung Kidul Yogyakarta. Virus diisolasi dari tanaman sakit yang berasal dari biji terinfeksi SMV. Isolasi dengan metode lesio tunggal (*single lesion method*) pada *Chenopodium amaranticolor*, sesudah 3 kali isolasi diperbanyak pada kedelai varietas Wilis. Daun bergejala mosaik yang diperoleh dikumpulkan dan disimpan pada -70°C . sampai saat pemurnian

C. Bioessey

Bioessey untuk mengetahui infektifitas relatif virus dengan menghitung jumlah bercak lokal yang terbentuk sebagai hasil reaksi

hipersensitif pada tanaman indikator. Tanaman indikator yang digunakan sebagai indikator adalah *C. amaranticolor*.

D. Pemurnian virus

1. Homogenisasi dan klarifikasi

Daun kedelai hasil perbanyakan dan dibekukan pada suhu 70°C dilumatkan dengan *homogenizer*. Bufer ekstraksi yang digunakan adalah 0.3 M Natrium fosfat pH 7.0 dengan perbandingan 1:2 (b/v) dan mengandung 0.01 M Na-DIECA serta 8% kloroform dan butanol (v/v). Sentrifugasi pada $8500 \times g$ selama 10 menit. Fase air yang mengandung partikel virus diambil.

Presipitasi partikel virus dalam sap dilakukan dengan PEG 6000. Untuk menghindari agregasi virus dilakukan pemilihan konsentrasi PEG dan senyawa aditif yang ditambahkan pada bufer yang tepat.

Partikel virus dalam fase air dipresipitasikan dengan PEG 6000 pada berbagai tingkat konsentrasi ditambah dengan NaCl dengan konsentrasi akhir 0.1 M, aduk pada suhu kamar selama 20-30 menit, diamkan pada temperatur 4°C selama 1 jam. Selanjutnya disentrifugasi pada $8500 \times g$ selama 10 menit. Pelet diresuspensikan dalam bufer fosfat 0,05 M pH 7,0 dengan atau tanpa aditif, disentrifugasi lagi dan supernatan diuji infektifitasnya.

2. Aditif bufer fosfat

Senyawa aditif pada bufer fosfat yang diuji adalah MgCl_2 0,01 M, Na-EDTA 0,005 M, Na-DIECA 0,0025 M. Setelah diaduk selama 10-30 menit pada suhu 4°C , disentrifugasi pada $8500 \times g$ selama 10 menit. Kemudian infektifitas supernatan diamati.

3. Ultrasentrifugasi

Supernatan hasil tahap sebelum disentrifugasi pada $78.000 \times g$ selama 90 menit dengan bantalan (*cushion*) 5 ml sukrosa 20%. Pelet diambil dan diresuspensikan dalam 0.05M bufer fosfat pH 7.0 yang mengandung salah satu aditif terpilih pada pengujian sebelumnya.

4. Sentrifugasi dalam gradien sukrosa

Fase virus kemudian disentrifugasi pada gradien sukrosa 20-50% dalam bufer fosfat 0.05M pH 7.0, pada 47.000 x g selama 3 jam. Zona virus diambil dengan pipet dan diencerkan dengan 0.05 M bufer borat pH 8.0. Suspensi yang diperoleh disentrifugasi pada 78.000 xg selama 90 menit. Pelet yang diperoleh disuspensi dengan 0.05 M bufer borat pH 8.0. Virus murni disimpan pada suhu -20°C untuk penelitian lanjutan.

E. Pengamatan hasil pemurnian

1. Pengamatan absorpsi ultraviolet

Absorpsi ultraviolet dari sedian virus murni yang diperoleh diamati dengan spektrofotometer Beckman DU-65.

2. Elektroforesis dalam gel poliakrilamida -SDS

Sediaan virus sebanyak 40 µl dicampur dengan 20 µl 2-merkapt-etanol, 0,1 M Tris-HCL dan 0,001% (v/v) bromofenol biru dipanaskan pada 100°C selama 2 menit. Setelah dingin dianalisis pada gel SDS-Poliakrilamida menurut Laemli. Pewarnaan dengan 0,01% *Commassie Blue*. Sebagai tolok ukur berat molekul digunakan Bovin serum albumin (66 kD), karbonat anhidrase (29 kD), dan cytochrome C (12,4 kD).

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Pemilihan konsentrasi PEG 6000

Dalam proses pemurnian atau purifikasi virus tumbuhan berbentuk benang kegagalan terutama disebabkan oleh karena terjadinya agregasi partikel. Presipitasi partikel virus dalam sap untuk pemadatan konsentrasi banyak dilakukan dengan PEG 6000 pada konsentrasi antara 2 - 8%, ditambah 0,1M NaCl (Hebbert, 1963). Tingkat konsentrasi PEG 6000 yang tepat untuk presipitasi suatu virus, agar agregasi partikel virus terhindar, ditentukan secara empirik. Hasil uji konsentrasi PEG 6000 untuk presipitasi partikel virus mosaik kedelai (SMV) yang berada dalam fase air dari tahap klarifikasi tercantum dalam tabel 1.

Tabel 1. Konsentrasi PEG 6000 untuk presipitasi SMV

Konsentrasi PEG	Infektifitas	Persen
1%	4	57,14
2%	6	85,71
4%	7	100
6%	11	157,1
8%	7	100

Hasil uji menunjukkan bahwa infektifitas tertinggi diperoleh pada pemekatan dengan PEG 6000 pada konsentrasi final 6%. Pada konsentrasi PEG 6000 kurang dari 6% infektifitasnya lebih rendah, sedangkan pada konsentrasi 8% ada kecenderungan menurun kembali.

2. Pemilihan aditif bufer fosfat

Aditif ditambahkan kedalam bufer fosfat yang digunakan untuk resuspensi fase virus untuk memisahkan ribosom, poli ribosom dan protein tumbuhan dari virus. Senyawa pengkhelat Na-EDTA, Na-DIECA, maupun MgCl₂ kerap ditambahkan untuk maksud tersebut (Matthews, 1992). Pengujian senyawa aditif yang ditambahkan pada bufer fosfat untuk resuspensi pelet menunjukkan bahwa infektifitas tertinggi tercapai pada pemakaian Na-EDTA 0,005M. Hasil pengujian tercantum dalam tabel 2.

Tabel 2. Pengaruh aditif bufer fosfat untuk resuspensi fase virus terhadap infektivitas virus

Suplemen	Infektifitas	Persen
MgCl ₂ 0,01 M	21	105
Na-EDTA 0,005 M	28	140
Na-DIECA 0,0025M	7	35
Tanpa aditif	20	100

Infektivitas hasil pemurnian virus tetap tinggi sebab senyawa aditif Na-EDTA yang berada dalam bufer fosfat molaritas rendah dapat mencegah agregasi virus dengan mengkhelat kation bivalen dan mencegah oksidasi polifenol.

dalam bufer fosfat untuk resuspensi maka pemurnian SMV isolat Yogyakarta dilakukan berdasar metode yang telah ada (Ross, 1967; Iwai dan Wakimoto, 1985) dengan modifikasi sebagai berikut:

DAUN SAKIT YANG DIBEKUKAN -70° C
Lumatkan dalam bufer fosfat 0,5 M (1:2 b/v) pH 7,0, mengandung 0,01 M Na-DIECA, kloroform - butanol (8% v/v)

SAP
Sentrifugasi 8.500 x g, selama 10 menit

SUPERNATAN
Tambahkan 6% PEG 6000 dan 0,1 M NaCl. Diaduk pada suhu 20°C, didiamkan pada suhu 4°C selama 1 jam, dilanjutkan dengan sentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit

PELET
Resuspensikan dalam bufer fosfat 0,05 M, pH 7,0 mengandung Na-EDTA, diaduk selama 30 menit, disentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit

SUPERNATAN
Sentrifugasi pada 78000 x g, selama 90 menit (Sebelum dilanjutkan ke tahap berikutnya, diulangi sentrifugasi diferensial satu atau dua kali lagi)

PELET
Resuspensikan dalam bufer fosfat 0,05 M, pH 7,0 mengandung Na-EDTA, diaduk selama 30 menit, disentrifugasi pada 8500 x g selama 10 menit

SUPERNATAN
Sentrifugasi dalam gradien sukrose 10 - 50 % pada 47000 x g selama 3 jam

ZONA VIRUS
Dialisis dalam bufer borat 0,05 M pH 8,0 semalam. Sentrifugasi pada 78000 x g selama 90 menit

PELET
Resuspensikan dalam bufer borat

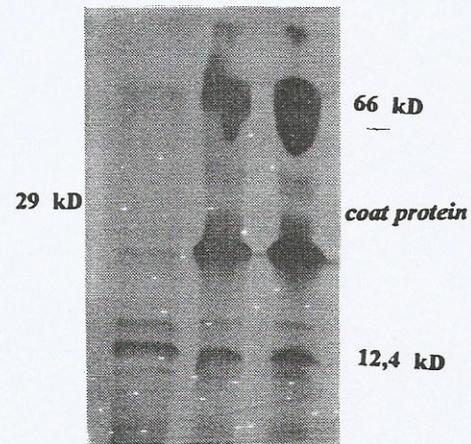
SEDIAAN VIRUS MURNI

4. Pengamatan hasil pemurnian

a. *Absorpsi ultra violet* - Sediaan SMV murni menunjukkan kurve absorpsi ultraviolet yang mencirikan virus bentuk benang, dengan absorpsi maksimum pada 260 nm dan minimum pada 248 nm. Nisbah A_{280}/A_{260} berkisar antara 0,691 sampai 0,780 dengan rata-rata 0,734, dan A_{maks}/A_{min} berkisar antara 1,071 - 1,199 dengan rata-rata 1,175; yang mengindikasikan bahwa partikel virus berbentuk batang atau benang (*flexuous*). Berdasar nilai koefisien ekstinsi pada 260 nm untuk 1 ng/ml = 2,4 maka hasil pemurnian diperoleh 3,0607 mg tiap kg daun terinfeksi.

b. *Elektroforesis dalam gel poliakrilamida - SDS (SDS - PAGE)*

Penentuan berat molekul *coat protein* dengan elektroforesis dalam gel poliakrilamida diperoleh satu jenis protein dengan berat molekul 29,7 kD (Gambar 1).



Gambar 1. Hasil elektroforesis protein virus

Coat protein sebagian besar strain SMV yang telah diketahui mengandung 265 residu asam amino dengan berat molekul 29,5 kD (Sukla *et al.*, 1994), sehingga hasil yang diperoleh berada dalam kisaran yang telah ada.

Dari hasil penelitian di atas dapat disimpulkan bahwa pemurnian SMV isolat Yogyakarta, dengan hasil yang mempunyai infektifitas dan hasil yang tinggi, dapat dilakukan berdasar cara pemurnian SMV yang telah ada dengan modifikasi berikut:

- a. sebelum ekstraksi bahan tanaman dibekukan pada suhu -70°C ,
- b. presipitasi partikel virus dengan PEG pada konsentrasi final 6%,
- c. kedalam bufer fosfat sebagai bufer untuk resuspensi hasil presipitasi maupun hasil ultrasentrifugasi ditambahkan Na-EDTA dengan konsentrasi final 0,005 M.
- d. Isolat virus yang dikaji menunjukkan absorpsi ultra violet dan berat molekul *coat protein* yang dekat dengan strain atau isolat SMV yang telah diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Bos, L. 1972. Description of plant viruses no. 93, Common W. Mycol, Inst. Assoc. Appl. Biol, Kew Surrey England.
- Gibbs, A. and B. Harrison. 1976. Plant virology. Edward Arnold. London, 292 pp.
- Hebert, T.T. (1963) Precipitation of plant viruses by polyethylene glycol. *Phytopathology*, 53, 362
- Iwai, H. and S. Wakimoto. 1985. An improved method for purification of soybean mosaic virus. Reprinted from *Ann Phytopath Society of Japan*. Vol 51, No.4, October, 1985. 465-474 p.
- Matthews, R.E.F. 1992. Fundamentals of plant virology. Academic press, Inc. New York, 403 pp.
- Ross, J.P. 1967. Purification of soybean mosaic virus for antiserum production. *Phytopathology* 57, 465 - 467.
- Shukla, D.D., C.W. Ward, A.A Brunt. 1994. The potyviridae. Printed and bound in the UK at the University press. Cambridge 500 pp.
- Sinclair, J.B. 1993. Compendium of soybean disease. Second edition the American phytopathological society. 3rd ed. 2nd printing. St. Paul. MN. 106 p.
- Sumardiyono, Y.B. 1989. Tanggapan kedelai varietas Wilis terhadap inokulasi mekanik SMV. *Prosiding Konggres Nasional X dan Seminar Ilmiah, Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. hal. 112-114.
- Sumardiyono, Y.B., Sudjadi, Sismindari, Sri Sulandari 1994. Makalah untuk Presentasi Poster Dalam rangka Ulang Tahun X Dewan Riset Nasional.
- Sumardiyono, Y.B., Wuye Ria Andayani, Susanto. 1995. Karakterisasi dan serologi Soybean Mosaik Virus. *Prosiding Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Mataram, 25 - 27 September 1995.
- Van Regenmortel M.H.V. 1982. Serology and immunochemistry of plant viruses. Academic press. New York, 302 pp.