

## **Pengaruh Elektroterapi dan Termoterapi secara *in Vitro* terhadap Eliminasi *Onion yellow dwarf virus***

### **The Effect of *in Vitro* Electrotherapy and Thermootherapy on Elimination of *Onion yellow dwarf virus***

**Siti Shofiya Nasution, Diny Dinarti, Sri Hendrastuti Hidayat\***  
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### **ABSTRAK**

*Onion yellow dwarf virus* (OYDV) pada tanaman bawang putih telah dilaporkan dapat menyebabkan masalah pada produksi bawang putih. Penggunaan benih bawang putih bebas virus diharapkan dapat menekan insidensi penyakit di lapangan. Tujuan penelitian ini ialah mengembangkan metode eliminasi OYDV pada bahan perbanyak umbi bawang putih melalui kombinasi perlakuan elektroterapi (0, 5, 10, 15, dan 20 mA selama 10 menit) dan termoterapi (23, 28, 33, dan 38 °C selama 4 minggu). Bawang putih kultivar Sangga Sembalun dan Lumbu Hijau digunakan sebagai bahan tanaman untuk eliminasi OYDV. Konfirmasi adanya infeksi virus dilakukan melalui metode *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa termoterapi pada suhu 33 °C merupakan perlakuan terbaik untuk mengeliminasi OYDV pada umbi bawang putih meskipun tingkat efisiensi berbeda pada setiap kultivar. Efisiensi eliminasi OYDV mencapai 60% pada kultivar Lumbu Hijau, dan 40% pada kultivar Sangga Sembalun. Perlakuan elektroterapi dan kombinasinya dengan termoterapi belum dapat menghasilkan planlet bebas OYDV.

Kata kunci: Lumbu Hijau, Sangga Sembalun, planlet bebas OYDV, RT-PCR

#### **ABSTRACT**

Infection of *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) are reported causing problems in garlic production. Planting virus-free bulbs might help reduce viral disease incidence in the field. This research was aimed to develop method for eliminating OYDV from garlic bulbs using combination of electrotherapy (0, 5, 10, 15, and 20 mA each for 10 minutes) and thermootherapy (23, 28, 33, 38 °C each for 4 weeks). Two garlic cultivars, i.e. Sangga Sembalun and Lumbu Hijau were used as seed bulbs for OYDV elimination tests. Virus infection was confirmed using *transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR). The result showed that thermootherapy at 33 °C was the best method to eliminate OYDV in garlic although the efficiency was not the same for all cultivars. The efficiency reached up to 60% for cv. Lumbu Hijau, whereas for cv. Sangga Sembalun only reached up to 40%. Electrotherapy alone or in combination with thermootherapy were not able to produce OYDV-free plantlets.

Key words: Lumbu Hijau, Sangga Sembalun, OYDV-free plantlets, RT-PCR

---

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jalan Kamper, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680  
Tel: 0251-8629364, Faks: 0251-8629362, Surel: srihendrastutihidayat@gmail.com

## PENDAHULUAN

Bawang putih (*Allium sativum*) merupakan salah satu komoditas hortikultura yang digunakan sebagai bumbu di sebagian besar masakan Indonesia. Bawang putih diperbanyak secara vegetatif sehingga diduga tidak ada klon atau benih yang bebas dari penyakit terbawa benih. Beberapa jenis patogen diketahui dapat menular melalui perbanyakan tanaman vegetatif, termasuk virus. Menurut Diekmann (1997), kelompok virus yang umum menginfeksi tanaman bawang putih berasal dari genus *Carlavirus*, *Potyvirus*, dan *Allexivirus*. Beberapa jenis virus yang menginfeksi bawang putih dapat menyebabkan kehilangan hasil, khususnya *Onion yellow dwarf virus* (OYDV).

Infeksi OYDV pada bawang putih menurunkan kualitas dan hasil panen di Meksiko (Moreno *et al.* 2014). Infeksi OYDV pada tanaman bawang putih dapat menyebabkan kehilangan hasil sebesar 60% (Lot *et al.* 1998). Elnagar *et al.* (2009) melaporkan infeksi OYDV menurunkan bobot umbi bawang putih di Mesir hingga 58.78%. Sampai saat ini belum pernah dilaporkan pengaruh infeksi virus terhadap kehilangan hasil panen pada bawang putih di Indonesia.

Umbi bebas virus dapat diperoleh melalui penerapan teknik kultur jaringan dan efisiensi bebas virus dapat ditingkatkan melalui kombinasi beberapa metode eliminasi virus seperti elektroterapi dan termoterapi. Soliman *et al.* (2012) mengeliminasi OYDV dari umbi bawang putih melalui elektroterapi dengan perlakuan aliran listrik 15 mA selama 10 menit dan tidak menyebabkan gangguan pertumbuhan planlet. Torres *et al.* (2000) berhasil mengeliminasi virus dari umbi bawang putih menggunakan udara panas bersuhu 37 °C selama 35 hari dan tidak menyebabkan gangguan pertumbuhan planlet. Pengaruh elektroterapi dan kombinasi antara elektroterapi dan termoterapi terhadap eliminasi virus belum pernah dilakukan di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode eliminasi OYDV pada bahan perbanyakan bawang putih yang efektif

melalui aplikasi kombinasi elektroterapi dan termoterapi secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

Sampel umbi bawang putih diperoleh dari penangkar umbi bawang putih. Bawang putih kultivar Sangga Sembalun berasal dari Nusa Tenggara Barat dan kultivar Lumbu Hijau berasal dari Jawa Timur. Pemilihan sampel umbi bawang putih berdasarkan pengujian menggunakan metode DIBA pada penelitian sebelumnya (Nasution *et al.* 2016).

### Eliminasi Virus dari Umbi Bawang Putih

**Elektroterapi.** Umbi bawang putih yang digunakan ialah umbi yang positif terinfeksi OYDV. Umbi dipecah menjadi siung individual kemudian direndam dengan larutan fungisida dan bakterisida 2 g L<sup>-1</sup>. Siung dibelah dan diambil bagian tunas adventif yang digunakan sebagai bahan perlakuan. Tunas adventif direndam dalam *chamber* elektroforesis yang berisi *tris borate EDTA* (TBE) 0.5×. Tunas tersebut diberi perlakuan arus elektroterapi pada 5 taraf perlakuan, yaitu 0, 5, 10, 15, dan 20 mA masing-masing selama 10 menit. Setelah perlakuan elektroterapi, tunas adventif digunakan sebagai bahan tanaman untuk kultur jaringan.

**Kultur Jaringan dan Termoterapi.** Tunas adventif yang telah diberi perlakuan elektroterapi disterilisasi menggunakan NaOCL 1% selama 10 menit, kemudian dipindah ke dalam NaOCl 0.5% selama 5 menit, setelah itu dibilas air steril. Tunas pada bagian basal dipotong sekitar 2 mm yang digunakan sebagai eksplan untuk dikulturkan pada medium *murashige-skoog* (MS) yang mengandung 2ip (2 mg L<sup>-1</sup>) dan GA<sub>3</sub> (0.3 mg L<sup>-1</sup>). Eksplan diinkubasi pada ruang kultur dan diberikan termoterapi dengan 4 taraf perlakuan, yaitu 23, 28, 33, dan 38 °C masing-masing selama 4 minggu. Setelah 4 minggu, tunas dipindahkan ke medium ½ MS yang mengandung NAA (1 mg L<sup>-1</sup>) untuk menginisiasi akar selama 2 minggu. Planlet yang terbentuk dan sudah berakar siap diaklimatisasi. Aklimatisasi dilakukan dengan

merendam planlet dalam larutan fungisida dan bakterisida  $2 \text{ g L}^{-1}$  selama 5 menit, kemudian planlet ditiriskan di atas kertas serap steril. Planlet ditanam pada medium arang sekam steril selama 2 minggu di laboratorium. Deteksi virus dilakukan pada tanaman bawang putih hasil aklimatisasi menggunakan metode *reverse-transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR).

### Metode RT-PCR

Metode RT-PCR diawali dengan mengisolasi total RNA dari 0.1 g jaringan daun komposit 4 botol kultur dalam 1 ulangan menggunakan bufer ekstraksi ditambahkan 1% merkaptoetanol (Doyle dan Doyle 1987). Sintesis *complementary DNA* (cDNA) dilakukan dengan menyiapkan 10  $\mu\text{L}$  reaksi yang mengandung 3  $\mu\text{L}$  RNA, 1  $\mu\text{L}$  primer *Potyvirus*, 2  $\mu\text{L}$  50 mM DTT, 2  $\mu\text{L}$  5x *buffer* RT, 1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP, 0.5  $\mu\text{L}$  ribolock, 0.35  $\mu\text{L}$  MMuLV, 0.15  $\mu\text{L}$  *water free nuclease*. Reaksi transkripsi balik (RT) dilakukan dalam mesin *automated thermal cycler* (Gene Amp PCR System 9700; PE *Applied Biosystem*, USA) yang diprogram untuk satu siklus pada suhu  $65^\circ\text{C}$  (5 menit),  $42^\circ\text{C}$  (60 menit), dan  $70^\circ\text{C}$  (10 menit). Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR merupakan primer spesifik OYDV dengan ukuran target 601 pb, OYDVF (5'-CGAAGCAAATTGCCAAGCAG-3') dan OYDVR (5'-CGATTAGCTGCCCCCTCT AAC-3') (Mahmoud *et al.* 2008). Reaksi amplifikasi (25  $\mu\text{L}$ ) terdiri atas 9.5  $\mu\text{L}$   $\text{dH}_2\text{O}$ , 12.5  $\mu\text{L}$  *GTG master mix*, 1  $\mu\text{L}$  masing-masing primer (*forward-reverse*) dan 1  $\mu\text{L}$  cDNA. Amplifikasi cDNA menggunakan mesin GeneAmp PCR System 9700 dengan kondisi reaksi denaturasi awal pada suhu  $94^\circ\text{C}$  selama 3 menit, sebanyak 35 siklus pada suhu denaturasi  $94^\circ\text{C}$  selama 30 detik; penempelan primer  $52^\circ\text{C}$  selama 1 menit; ekstensi  $72^\circ\text{C}$  selama 1 menit; dan ekstensi akhir  $72^\circ\text{C}$  selama 7 menit. Amplikon yang diperoleh dielektroforesis pada tegangan 50 volt selama 50 menit dalam 1% *tris borate* EDTA gel agarosa, selanjutnya gel agarosa direndam dalam etidium bromida (EtBr) lalu divisualisasi di bawah *UV transilluminator*.

### Rancangan Percobaan dan Analisis Data

Pengujian disusun dalam rancangan percobaan petak terbagi. Perlakuan termoterapi ( $23^\circ\text{C}$ ,  $28^\circ\text{C}$ ,  $33^\circ\text{C}$ , dan  $38^\circ\text{C}$ ) sebagai petak utama dan perlakuan elektroterapi (0, 5, 10, 15, dan 20 mA) sebagai anak petak. Masing-masing percobaan dilakukan dengan 3 ulangan, tiap ulangan terdiri atas 4 botol kultur dan tiap botol kultur terdapat 1 eksplan. Peubah yang diamati ialah ersentase hidup eksplan, jumlah daun, dan tinggi planlet. Data penelitian dianalisis ragam (ANOVA) dan perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lanjut dengan uji jarak berganda Duncan (DMRT) pada taraf 5%.

## HASIL

### Termoterapi dan Elektroterapi pada Persentase Hidup Eksplan, Jumlah Daun dan Tinggi Planlet

Pertumbuhan eksplan sampai dengan 4 minggu setelah tanam (MST) pada kultivar Lumbu Hijau dan Sangga Sembalun mencapai 100%, kecuali pada perlakuan suhu  $38^\circ\text{C}$  (Tabel 1). Eksplan yang diberi perlakuan suhu  $38^\circ\text{C}$  berubah warna menjadi putih dan mati. Hasil analisis menunjukkan bahwa termoterapi berpengaruh nyata terhadap persentase hidup eksplan bawang putih, sedangkan elektroterapi dan interaksi kedua perlakuan tidak berbeda nyata terhadap persentase hidup eksplan bawang putih.

Jumlah daun (Tabel 2) dan tinggi planlet (Gambar 1) pada kedua kultivar dipengaruhi oleh termoterapi dan elektroterapi. Peningkatan suhu menyebabkan penurunan jumlah daun dan tinggi planlet. Pada kultivar Lumbu Hijau elektroterapi memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah daun dan tinggi planlet, sedangkan interaksi antara kedua faktor tidak berpengaruh nyata terhadap kedua parameter tersebut. Kondisi yang berbeda terjadi pada kultivar Sangga Sembalun. Elektroterapi tidak berpengaruh nyata terhadap jumlah daun dan tinggi planlet, tetapi interaksi kedua perlakuan memberikan pengaruh nyata terhadap jumlah daun dan tinggi planlet.

Tabel 1 Pengaruh elektroterapi dan termoterapi terhadap eksplan dua kultivar bawang putih yang hidup (%)

Termoterapi (°C)	Elektroterapi (mA)					Rata-rata
	0	5	10	15	20	
Kultivar Lumbu Hijau						
23	100	100	100	100	100	100 a
28	100	100	100	100	100	100 a
33	100	100	100	100	100	100 a
38	0	0	0	0	0	0 b
Kultivar Sangga Sembalun						
23	100	100	100	100	100	100 a
28	100	100	100	100	100	100 a
33	100	100	100	100	100	100 a
38	0	0	0	0	0	0 b

Angka pada kolom dan kultivar yang sama diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada  $\alpha$  5%.

Tabel 2 Pengaruh elektroterapi dan termoterapi terhadap jumlah daun planlet dua kultivar bawang putih pada 4 MST

Termoterapi (°C)	Elektroterapi (mA)					Rata-rata*
	0	5	10	15	20	
Kultivar Lumbu Hijau						
23	2.41	2.75	3.16	3.33	2.67	2.86 a
28	2.41	2.67	2.91	3.00	2.33	2.67 a
33	1.58	1.50	2.08	1.75	1.67	1.71 b
38	-	-	-	-	-	-
Rata-rata*	2.13 c	2.31 abc	2.72 a	2.69 ab	2.22 bc	
Kultivar Sangga Sembalun**						
23	2.58 BCD	2.83 BC	3.67 A	3.67 A	2.67 BCD	3.08 a
28	2.92 B	2.83 BC	2.50 BCD	2.83 BC	2.67 BCD	2.75 b
33	2.17 BCDE	2.00 DE	1.92 DE	1.75 E	2.08 CDE	1.98 c
38	-	-	-	-	-	-
Rata-rata	2.56	2.55	2.70	2.75	2.47	

\*Angka pada kolom atau baris berdasarkan kultivar yang sama diikuti huruf nonkapital yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada  $\alpha$  5%.

\*\*Angka pada kolom dan baris berdasarkan kultivar yang sama diikuti huruf kapital yang sama menunjukkan respon interaksi elektroterapi dan termoterapi tidak berbeda nyata menurut uji DMRT pada  $\alpha$  5%.

### Persentase Tanaman Bebas OYDV

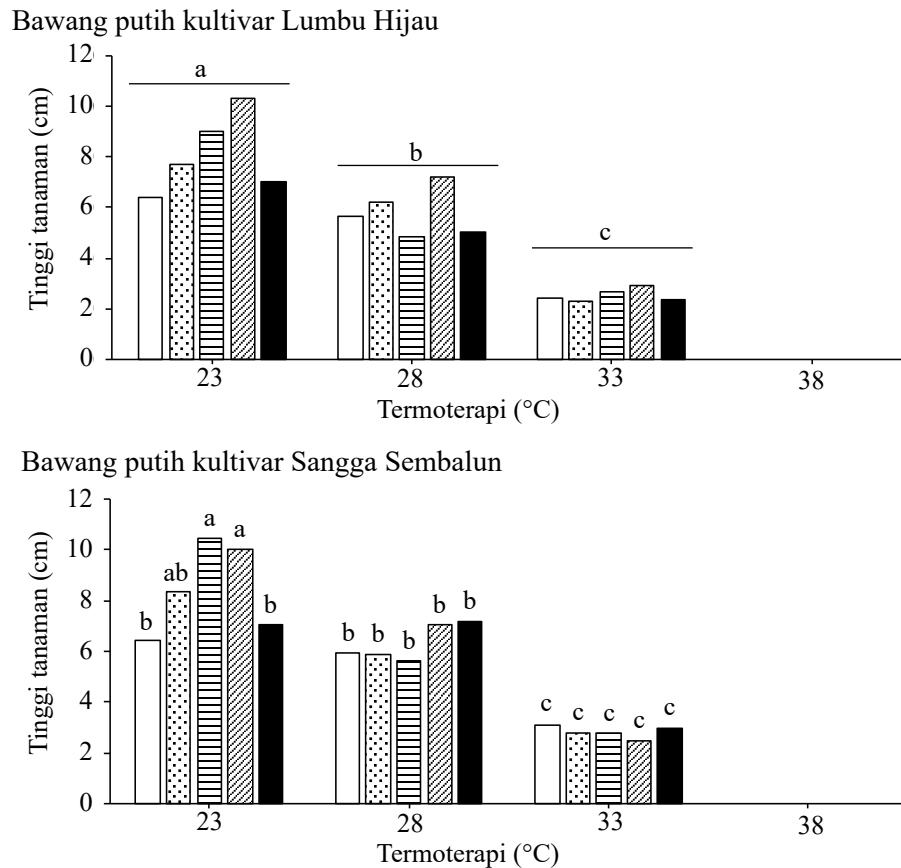
Deteksi virus dilakukan secara komposit, yaitu 4 botol kultur dalam satu ulangan. Perlakuan suhu memberikan pengaruh nyata terhadap persentase tanaman bebas OYDV (Tabel 3), sedangkan perlakuan elektroterapi dan interaksi kedua perlakuan tidak memberikan pengaruh yang nyata terhadap persentase tanaman bebas OYDV.

Deteksi virus setelah perlakuan termoterapi dan elektroterapi dilakukan menggunakan metode RT-PCR. Tanaman yang diperoleh melalui teknik kultur jaringan memiliki

konsentrasi virus yang sangat rendah (Gambar 2). Oleh karena itu, deteksi virus pada tanaman kultur jaringan membutuhkan metode sensitif seperti RT-PCR.

### PEMBAHASAN

Bawang putih kultivar Lumbu Hijau adalah kultivar unggul yang banyak ditemukan di Jawa Timur, sementara kultivar Sangga Sembalun banyak terdapat di Nusa Tenggara Barat. Kedua kultivar ini terinfeksi berbagai jenis virus seperti OYDV, *Garlic common*



Gambar 1 Pengaruh elektroterapi dan termoterapi terhadap tinggi planlet dua kultivar bawang putih pada 4 MST secara *in vitro*. □, 0 mA; ▤, 5 mA; ▥, 10 mA; ▧, 15 mA; ■, 20 mA. Huruf yang sama di atas balok data menunjukkan tidak berbeda nyata pada tiap kelompok termoterapi menurut uji DMRT pada  $\alpha$  5%.

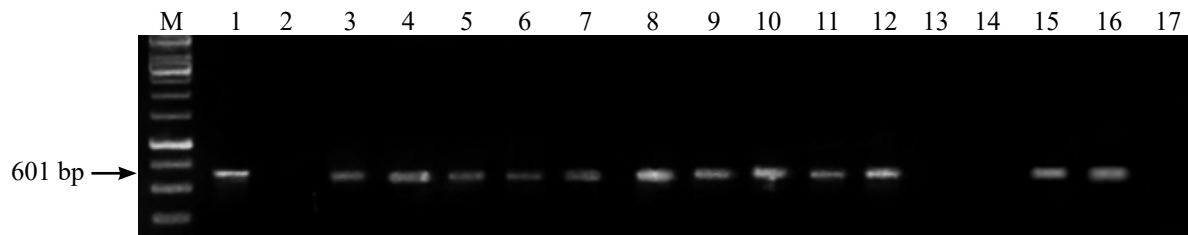
Tabel 3 Pengaruh elektroterapi dan termoterapi terhadap dua kultivar bawang putih bebas OYDV (%)

Termoterapi (°C)	Elektroterapi (mA)					Rata-rata*
	0	5	10	15	20	
Kultivar Lumbu Hijau						
23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b
28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b
33	50.0	100.0	0.0	50.0	100.0	60.0 a
38	-	-	-	-	-	-
Rata-rata	16.7	33.3	0.0	16.7	33.3	
Kultivar Sangga Sembalun						
23	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b
28	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0 b
33	0.0	50.0	0.0	100.0	50.0	40.0 a
38	-	-	-	-	-	-
Rata-rata	0.0	16.7	0.0	33.3	16.7	

\*Angka pada kolom dan kultivar yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata pada uji DMRT pada  $\alpha$  5%.

*latent virus*, dan *Shallot latent virus*. OYDV merupakan virus utama yang menginfeksi kedua kultivar tersebut dengan insidensi penyakit mencapai 100% (Nasution *et al.* 2016).

Kultur *shoot tip* telah digunakan secara luas untuk memperoleh tanaman bebas virus. Efisiensi teknik ini dapat ditingkatkan melalui kombinasi teknik lain seperti termoterapi



Gambar 2 Hasil amplifikasi *Onion yellow dwarf virus* dari tanaman bawang putih setelah perlakuan elektroterapi dan termoterapi. M, Penanda DNA 1 kb; 1, Kontrol positif; 2, Kontrol negatif; 3–7, Suhu 23 °C dan 0, 5, 10, 15, 20 mA; 8–12, Suhu 28 °C: 0, 5, 10, 15, 20 mA dan 13–17, Suhu 33 °C dan 0, 5, 10, 15, 20 mA.

dan elektroterapi. Termoterapi memberikan pengaruh nyata terhadap persentase hidup eksplan. Perlakuan suhu terlalu tinggi berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan eksplan. Suhu 38 °C dapat menghambat pertumbuhan eksplan. Hasil yang sama dilaporkan oleh Conci *et al.* (2005) yang melakukan penelitian pada tanaman bawang putih, eksplan meristem yang diberi perlakuan suhu 36 °C selama 30–40 hari dapat tumbuh sekitar 55–57% dibandingkan dengan eksplan yang tidak diberi perlakuan dapat tumbuh sekitar 80–90%. Mahmoud *et al.* (2009) melaporkan bahwa tingkat regenerasi semakin menurun pada tanaman kentang yang diberi perlakuan suhu 37 °C selama 40 hari secara *in vitro*.

Jumlah daun dan tinggi planlet dipengaruhi oleh termoterapi dan elektroterapi pada kedua kultivar. Suhu rendah memberikan pengaruh baik terhadap perkembangan planlet, sementara suhu tinggi dapat menghambat perkembangan planlet. Eksplan yang diberi perlakuan elektroterapi 10 mA pada suhu 23 °C memiliki jumlah daun dan tinggi tanaman lebih baik dibandingkan dengan eksplan yang tidak diberikan perlakuan elektroterapi. Hal ini sesuai dengan penelitian Soliman *et al.* (2012) bahwa elektroterapi pada 10 mA selama 10 menit dapat meningkatkan tingkat regenerasi planlet bawang putih. Tanaman kentang yang diberi perlakuan elektroterapi 10 mA selama 10 menit dapat meningkatkan regenerasi tanaman *in vitro* (Mahmoud *et al.* 2009). Aliran listrik dilaporkan dapat memacu diferensiasi tanaman *in vitro* (Goldsworthy 1987). Regenerasi eksplan *in vitro* oleh elektroterapi bergantung pada besarnya aliran listrik dan kultivar tanaman yang digunakan

(Badarua dan Chiru 2014). Menurut Dovas *et al.* (2001), RT-PCR merupakan metode sensitif dalam deteksi OYDV. Sensitivitas RT-PCR  $10^2$ – $10^4$  kali lebih tinggi dibandingkan dengan metode *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Percobaan eliminasi menggunakan metode elektroterapi pada berbagai tingkat arus listrik memperlihatkan bahwa perlakuan elektroterapi tidak berpengaruh nyata terhadap persentase tanaman bebas virus. Hal ini mungkin disebabkan konsentrasi virus yang tinggi dan ukuran tunas adventif terlalu besar. Lassois *et al.* (2013) menyatakan bahwa ketersediaan tanaman bebas virus selain bergantung pada teknik yang dikembangkan juga perlu memperhatikan karakteristik virus, tipe jaringan yang diberikan perlakuan, dan jenis tanaman yang digunakan. Dewi dan Slack (1994) menambahkan bahwa efisiensi protokol untuk mengeliminasi virus akan menurun jika eksplan yang digunakan mengandung konsentrasi virus yang tinggi atau telah terinfeksi oleh berbagai jenis virus.

Menurut Conci *et al.* (2005), efisiensi untuk mendapatkan tanaman bebas virus bergantung dari jenis virus target dan kultivar bawang putih yang digunakan. Ghaemizadeh *et al.* (2014) berhasil memperoleh tanaman bebas OYDV dengan efisiensi 77% melalui perlakuan suhu 36 °C dikombinasikan dengan kultur *stem-disc*. Suhu yang tinggi dapat menekan multiplikasi virus, yaitu dengan meningkatkan degradasi RNA virus (Wang dan Valkonen 2008). Perlakuan suhu tinggi dapat mengakibatkan pecahnya ikatan hidrogen dan disulfida protein penyambung virus, diikuti dengan ikatan kovalen fosfodiester asam nukleat yang dapat mengakibatkan

kemunduran infektivitas dan penghambatan replikasi virus (Panattoni *et al.* 2013).

Perlakuan terbaik untuk mendapatkan tanaman bebas OYDV ialah perlakuan suhu 33 °C karena mampu menghasilkan tanaman bebas OYDV hingga 60% pada kultivar Lumbu Hijau dan 40% pada kultivar Sangga Sembalun.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada ACIAR atas dukungannya melalui kegiatan penelitian: *Increasing Productivity of Allium and Solanaceous Vegetable Crops in Indonesia and Sub-Tropical Australia* (Hort/2009/056).

### DAFTAR PUSTAKA

- Badarua CL, Chiru N. 2014. Effect of some therapies on potato plantlets infected with *Potato Virus X* (PVX). In: *Proceeding of Bioatlas 2014 Conference*; 2014 May 15–17; Brasov (RO): BIOATLAS Conference. Hlm 11–17.
- Conci VC, Perotto MC, Cafrne E, Lunello P. 2005. Program for intensive production of virus-free garlic plants. In: *Proceeding IV<sup>th</sup> IS on Edible Alliaceae*; 2004 April 21–26; Beijing (CN): Acta Hort. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.688.25>.
- Dewi IS, Slack A. 1994. Therapy cycling to eliminate high-titered, multiple virus infection in vitro potato plantlets. *Bul Agron.* 22(2):35–43.
- Diekmann M. 1997. *FAO/IPGRI Technical Guidelines for the Safe Movement of Germplasm. No. 18. Allium spp.* Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome (IT): International Plant Genetik Resources Institute.
- Dovas CI, Hatziloukas E, Salomon R, Barg E, Shibolet Y, Katis NI. 2001. Comparison of methods for virus detection in *Allium* spp. *J Phytopathol.* 149(11–12):731–737. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00705.x>.
- Doyle JJ, Doyle JJ. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19:11–19.
- Elnagar S, El-Sheikh MAK, Wahab ASA. 2009. Effect of natural infection with *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt. In: *4<sup>th</sup> Conference on Recent Technologies in Agriculture*; 2009 November 3–5; Cairo (EG): Faculty of Agriculture Cairo University. hlm 34–39.
- Ghaemizadeh F, Dashti F, Khodakaramian G, Sarikhani H. 2014. Combination of stem-disc dome culture and thermotherapy to eliminate *Allexiviruses* and *Onion yellow dwarf virus* from garlic (*Allium sativum* cv. Hamedan). *Arc Phytol Plant Protection.* 4(47):499–507. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.813123>.
- Goldsworthy A. 1987. Electrical stimulation of tissue culture growth and morphogenesis. *Agricell Repory.* 8:14–14.
- Lassois L, Lepoivre P, Swennen R, Houwe IVD, Panis P. 2013. Thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. In: Lambardi M, Ozudogru EA, Jain SM, editor. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants.* Methods in Molecular Biology. New York (US): Humana Press. Hlm 419–433.
- Lot H, Chovelon V, Souche S, Delecalle B. 1998. Effects of *Onion yellow dwarf* and *Leek yellow stripe viruses* on symptomatology and yield loss of three french garlic cultivars. *Plant Dis.* 82(12):1381–1385. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.12.1381>.
- Mahmoud SYM, Hosseney MH, Abdel-Ghaffar MH. 2009. Evaluation of some therapies to eliminate *Potato Y Potyvirus* from potato plants. *Inter J Virol.* 5(2):64–76. DOI: <https://doi.org/10.3923/ijv.2009.64.76>.
- Moreno PL, Jaramill SLI, Celedon MB, Malagon RR, Palenius NHG. 2014. Effect of natural virus infection on quality and yield of garlic elite lines. *J Experimen Biol Agric Sci* 2(2S):243–250.
- Nasution SS, Hidayat SH, Dinarti D. 2016. Deteksi dan identifikasi virus pada bawang putih di Indonesia. Di dalam: *Prosiding Pengendalian Penyakit pada Tanaman*

- Ramah Lingkungan II*; 2016 Agustus 27; Yogyakarta (ID): Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar. Hlm 315
- Panattoni A, Luvisi A, Triolo E. 2013. Elimination of viruses in plants: twenty years progress. *Spanish J Agric Res.* 11(1):173–188. DOI: <https://doi.org/10.5424/sjar/2013111-3201>.
- Soliman AM, Mahmoud SYM, Dawood RA. 2012. Molecular characterization of *Onion yellow dwarf virus* (garlic isolate) with production of virus-free plantlets. *Int J Virol.* 8(1):61–70. DOI: <https://doi.org/10.3923/ijv.2012.61.70>.
- Torres AC, Fajardo TV, Dusi AN, Resende RO, Buso JA. 2000. Shoot tip culture and thermotherapy for recovering virus-free plants of garlic. *Hort Bras.* 18(3):192–195. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-05362000000300010>.
- Wang Q, Valkonen JPT. 2008. Cryotherapy of shoot tips: novel pathogen eradication method. *Trends Plant Science.* 14(3):119–122. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.010>.