

Aplikasi Suhu Rendah dan Senyawa Antiviral untuk Eliminasi *Chrysanthemum stunt viroid* dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan Kultur Ujung Tunas Krisan

Application of Low Temperature and Antiviral for Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* and Its Effect on the Growth of Shoot Tip Culture of Chrysanthemum

**Erniawati Diningsih, Safani Aryantika, Indijarto Budi Rahardjo,
Wakiah Nuryani, Hanudin, Ifa Manzila**

Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Organisasi Riset pertanian dan Pangan,
Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN). Jalan Raya Cibinong KM 46, Bogor, 16911

(diterima Agustus 2023, disetujui Oktober 2023)

ABSTRAK

Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) telah banyak dilaporkan menjadi salah satu faktor pembatas dalam usaha produksi bunga potong krisan. Penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan suhu rendah (5 °C) dan antiviral ribavirin terhadap pertumbuhan dan pembebasan CSVd pada planlet krisan yang dikultur dari ujung tunas. Tanaman terinfeksi CSVd diperoleh dari kebun percobaan milik pemerintah di Cianjur, Jawa Barat. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap, yaitu 1) pengambilan sampel tanaman, 2) deteksi viroid dengan metode RT-PCR, 3) inisiasi eksplan dan perbanyakkan bahan tanaman secara *in vitro*, 4) perlakuan suhu rendah 5 °C dengan tiga taraf waktu inkubasi (1, 3, dan 5 bulan), 5) perlakuan antiviral ribavirin dengan tiga taraf konsentrasi (25, 100, dan 125 ppm), dan 6) konfirmasi bahan tanaman bebas viroid dengan RT-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penyimpanan suhu rendah dan perlakuan ribavirin menurunkan laju pertumbuhan tinggi tunas dan jumlah daun. Sampai pada konsentrasi 125 ppm, walaupun menurunkan laju pertumbuhan tunas dan jumlah daun, ribavirin tidak menimbulkan toksisitas terhadap tanaman. Akan tetapi, kombinasi perlakuan suhu rendah (1, 3, dan 5 bulan) dengan ribavirin (25, 100, dan 125 ppm) belum mampu mengeliminasi CSVd dari jaringan pada semua taraf perlakuan.

Kata kunci: krisan, pembebasan viroid, *polymerase chain reaction*, ribavirin

ABSTRACT

Chrysanthemum stunt viroid has been widely reported to be a limiting factor in the production of chrysanthemum cut flowers. The aim of this study was to determine the effect of low temperature treatment (5 °C) and antiviral ribavirin on the growth and elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) in chrysanthemum plantlets cultured from shoot tips. CSVd infected plants were obtained from a government experimental garden in Cianjur, West Java. The research was carried out in several stages,

*Alamat penulis korespondensi: Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Organisasi Riset Pertanian dan Pangan. Badan Riset dan Inovasi Nasional. Jalan Raya Cibinong KM 46 Bogor, 16911.
Surel: diningsiherniawati@gmail.com.

namely 1) plant sampling, 2) viroid detection using RT-PCR method, 3) initiation of explants and propagation of plant material *in vitro*, 4) low temperature treatment 5 °C with three levels of incubation time at 1, 3, and 5 months, 5) ribavirin antiviral treatment with three levels of concentration (25, 100, and 125 ppm), and 6) confirmation of viroid-free plant materials by RT-PCR. The results showed that low temperature storage and ribavirin treatment reduced the rate of growth of shoot height and number of leaves. Ribavirin did not cause phytotoxicity up to concentration level of 125 ppm, although it caused inhibition on shoot growth and leaf number. However, the combination of low temperature treatment (1, 3, and 5 months) with ribavirin (25, 100, and 125 ppm) was not able to eliminate CSVd from tissues at all treatment levels.

Keyword: *Chrysanthemum*, *polymerase chain reaction*, ribavirin, viroid elimination

PENDAHULUAN

Krisan merupakan salah satu komoditas tanaman hias ekspor Indonesia, terutama ke Jepang dan Kuwait (BPS 2018). Ekspor krisan ke Jepang dan Kuwait pada tahun 2017 mencapai berturut-turut 49 345 kg dan 175 kg dengan nilai masing-masing sekitar USD 697 876 dan USD 1300. Pada 2018 luas lahan penanaman krisan ialah 1110.52 ha dengan produksi mencapai 488 juta tangkai. Penyumbang produksi bunga krisan terbesar adalah Jawa Barat, Jawa Timur, dan Jawa Tengah, yaitu berturut-turut sebesar 187 juta, 137 juta, dan 129 juta tangkai. Guna menjaga keberlanjutan ekspor krisan perlu dijamin ketersediaan benih krisan berkualitas. Namun demikian, ketersediaan benih krisan berkualitas saat ini terkendala dengan infeksi viroid pada tanaman.

Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) merupakan salah satu viroid yang menginfeksi tanaman krisan dan dilaporkan menjadi faktor pembatas dalam usaha produksi bunga potong krisan di dunia maupun di Indonesia (Palukaitis 2017; Temaja *et al.* 2010; Diningsih *et al.* 2013; Supakitthanakorn 2022). CSVd merupakan salah satu patogen penting pada tanaman krisan karena penularannya yang cepat dan dapat menyebabkan kerugian secara ekonomi (Osaka *et al.* 2021). Penularan CSVd terutama terjadi melalui materi perbanyak vegetatif (stek) dan biji (Chung dan Pak 2008), tepung sari, vektor biologi (serangga dan cendawan), dan kerusakan mekanik (Hadidi *et al.* 2022). Di Cianjur Jawa Barat, krisan yang terinfeksi CSVd menunjukkan gejala tanaman kerdil dan helaian daun yang pucat (Diningsih *et al.* 2013).

Infeksi viroid juga dapat menyebabkan daun tanaman krisan berwarna hijau muda, bercak klorosis, perkembangan akar terhambat, pembungaan terjadi lebih awal dengan bunga dan daun berukuran kecil, serta warna bunga memudar (Sugiura dan Hanada 1998; Doi dan Kato 2004; Hosokawa *et al.* 2004; Cho *et al.* 2013; Matsushita *et al.* 2013).

Pembebasan viroid dari materi tanaman terinfeksi merupakan salah satu upaya dalam menghasilkan benih sehat, terutama jika infeksi terjadi pada varietas komersial dan bernilai ekonomi tinggi yang tersedia dalam jumlah terbatas. Beberapa upaya yang telah dilakukan ialah perlakuan suhu rendah yang dikombinasikan dengan senyawa antiviral dan kultur meristem (Savitri 2013), perlakuan tunggal antiviral (Iraklis *et al.* 2016; Kovalskaya dan Hammond 2014), dan *cryotherapy/cryopreservation* (Zhang *et al.* 2014; Jeon 2016; Barba *et al.* 2017). Menurut Savitri (2013), penggunaan jaringan meristem pucuk dari tanaman yang diberi perlakuan suhu rendah (4 °C) selama 2 bulan dapat meningkatkan laju eliminasi CSVd sampai 42.8%. Hasil yang paling efektif didapatkan apabila perlakuan antiviral ribavirin dikombinasikan dengan perlakuan suhu rendah (4 °C) dan kultur ujung meristem. Pembebasan dengan *cryopreservation* menunjukkan bahwa laju eliminasi bervariasi bergantung pada kultivar dan daerah asal (Jeon 2016). Isolasi jaringan meristem sangat sulit dilakukan. Hal ini disebabkan ukurannya yang sangat kecil, yaitu sekitar 0.1–0.2 mm. Penelitian dilakukan dengan tujuan mengetahui pengaruh perlakuan suhu rendah (5 °C) dan antiviral ribavirin terhadap

pertumbuhan dan pembebasan CSVd pada planlet krisan terinfeksi yang ditumbuhkan dari ujung tunas berukuran 2 mm.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi, Laboratorium Biologi Molekuler, dan Laboratorium Kultur Jaringan Balai Penelitian Tanaman Hias Segunung (sekarang Balai Standardisasi Instrumen Pertanian Tanaman Hias) dari bulan Januari 2019 sampai dengan Desember 2020.

Pengambilan Sampel Tanaman

Sampel tanaman krisan yang dipilih ialah tanaman indukan krisan var. Dewi Ratih dan beberapa varietas lain seperti Cintia, Azzura, Nismara dan Merah Hayani yang diperoleh dari kebun pertanaman krisan di daerah Cipanas, Cianjur, Jawa Barat. Selain sampel tanaman bergejala di lapangan, digunakan pula sampel planlet tanaman yang berasal dari Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman, Unit Pengelola Benih Sumber (UPBS) Balithi. Sebagai kontrol positif terinfeksi viroid pada deteksi RT-PCR, digunakan var. Zimba yang diperoleh dari kebun krisan di daerah Cisarua, Jawa Barat. Sampel tanaman krisan bergejala disimpan di rumah kaca dan dilakukan perawatan sehingga tanaman tetap hidup.

Deteksi CSVd dengan Teknik *Reverse transcription polymerase chain reaction* (RT-PCR)

Konfirmasi status CSVd dalam jaringan tanaman bahan uji dilakukan dengan teknik RT-PCR mengikuti protokol Diningsih *et al.* (2013). Sampel daun tanaman ditimbang masing-masing sebanyak 0.1 g dan disimpan pada ruang penyimpanan yang bersuhu -20 °C sampai akan digunakan. Pengambilan sampel daun dari botol planlet dilakukan secara komposit dari beberapa individu planlet yang terdapat dalam botol dan dilakukan secara aseptik di dalam *laminar air flow*.

Ekstraksi RNA total dilakukan menggunakan *GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit* (Thermoscientific, USA).

Sebanyak 0.1 g sampel daun digerus dengan 500 µL bufer lisis (mengandung 1% merkaptoetanol) dalam mortar yang telah didinginkan sebelumnya pada suhu -20 °C sampai homogen. Tahapan selanjutnya mengacu pada protokol yang telah disediakan. Sebanyak 50 µL RNA total yang diperoleh disimpan di ruang penyimpanan pada suhu -20 °C sampai akan digunakan.

Sintesis dan amplifikasi cDNA CSVd mengacu pada Diningsih *et al.* (2013). Produk hasil amplifikasi dielektroforesis dalam gel agarosa 1% dalam ½× TBE yang mengandung pewarna DNA (SmoBio, Taiwan) dengan konsentrasi 1 µL per 10 mL larutan gel. Elektroforesis dilakukan pada tegangan 75 Volt, kuat arus 400 mA selama 120 menit. Penanda DNA yang digunakan Tridye 100 pb (Thermoscientific, USA). Visualisasi pita DNA hasil amplifikasi dilakukan di bawah UV transiluminator (Bio Red, California).

Perbanyakkan Planlet Tanaman Terinfeksi

Tanaman sampel terkonfirmasi positif terinfeksi CSVd berdasarkan hasil deteksi RT-PCR digunakan sebagai eksplan untuk inisiasi kultur jaringan dan selanjutnya diperbanyak secara *in vitro* dengan perlakuan pembebasan CSVd. Tanaman sampel dengan hasil RT-PCR negatif digunakan sebagai kontrol negatif.

Sterilisasi, inisiasi dan perbanyakkan eksplan dilakukan menurut Shintiavira *et al.* (2014) yang dimodifikasi. Modifikasi dilakukan pada tahap awal sterilisasi dan jenis bakterisida serta fungisida yang digunakan. Pada tahap awal sterilisasi, eksplan direndam selama satu malam dalam larutan campuran bakterisida dan fungisida sistemik. Fungisida yang digunakan ialah difenokonazol 275 g L⁻¹ dengan dosis 100 uL per 200 mL; sedangkan bakterisida yang digunakan ialah Rifampicin (450) mg dengan dosis penggunaan 1 tablet (450 mg) per 200 mL air.

Perlakuan Pembebasan CSVd

Rancangan percobaan yang digunakan ialah rancangan acak lengkap dengan dua perlakuan, yaitu perlakuan suhu rendah 5 °C dalam *growth chamber* dan perlakuan antiviral ribavirin.

Perlakuan suhu rendah terdiri atas 3 taraf penyimpanan, yaitu selama 1, 3, dan 5 bulan; sedangkan perlakuan antiviral terdiri atas 3 taraf konsentrasi, yaitu 25, 100, dan 125 ppm yang diaplikasikan pada media *in vitro* ½MS0. Perlakuan antiviral diberikan setelah planlet diberi perlakuan suhu dingin. Setiap perlakuan terdiri atas 3 ulangan dan setiap ulangan terdiri atas 5 tanaman. Data pertumbuhan tinggi tunas dan jumlah daun dianalisis menggunakan uji T test pada taraf nyata 5 %.

Kultur ujung tunas (*shoot tip*). Kultur ujung tunas dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing satu tunas pada media ½MS0 dalam botol penicillin (botol kecil dengan diameter 2 cm dan tinggi 8 cm). Kultur ujung tunas diinkubasi pada suhu 18 °C, dengan periode pencahayaan 16 jam dan periode gelap 8 jam dan intensitas cahaya 1000 Lux. Kultur diinkubasi selama 2 minggu sebelum dilakukan perlakuan suhu rendah.

Perlakuan suhu rendah. Planlet yang telah diinkubasi diberi perlakuan suhu 5 °C dalam *growth chamber* dan sebagai kontrol perlakuan planlet disimpan pada suhu 18–20 °C. Setelah perlakuan suhu rendah sesuai periode waktu yang ditentukan planlet dikeluarkan dari *growth chamber* dan diinkubasi selama dua minggu pada suhu 18–20 °C.

Perlakuan ribavirin. Setelah diberi perlakuan suhu, plantlet yang sudah memiliki 2 daun (tinggi 1 cm) disubkultur pada media ½ MS yang mengandung ribavirin sesuai perlakuan, kemudian diinkubasi selama 6 minggu pada suhu 18–20 °C, dengan periode 16 jam terang, 8 jam gelap dan intensitas cahaya 1000 Lux. Pada akhir masa perlakuan ribavirin, planlet disubkultur ke media baru (½ MS0) tanpa ribavirin sebanyak 2 kali setiap 4–6 minggu.

Deteksi RT-PCR CSVd pada planlet setelah perlakuan. Deteksi CSVd dilakukan terhadap planlet-planlet hasil perlakuan. Kultur *in vitro* tanaman sehat dari varietas yang sama digunakan sebagai kontrol negatif, dan kultur *in vitro* tanaman terinfeksi tanpa perlakuan dari varietas yang sama digunakan sebagai kontrol positif.

Peubah Pengamatan. Pengamatan dilakukan terhadap keberhasilan tahap inisiasi dengan menghitung persentase pertumbuhan planlet terinfeksi pada media *in vitro*, persentase planlet yang bebas virus berdasarkan hasil deteksi RT-PCR pada akhir masa perlakuan, pengaruh perlakuan suhu dan ribavirin terhadap daya tahan hidup dan pertumbuhan planlet berdasarkan parameter tinggi tanaman dan jumlah daun. Pengamatan terhadap jumlah daun dan tinggi tanaman dilakukan dengan cara mengeluarkan plantlet dari *growth chamber*; tinggi tanaman dihitung mulai dari dasar tanaman sampai dengan titik tumbuh.

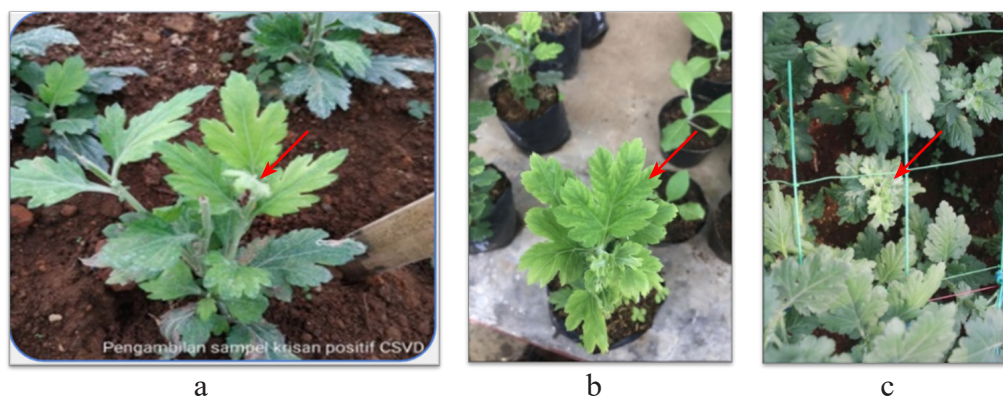
HASIL

Gejala Penyakit di Lapangan

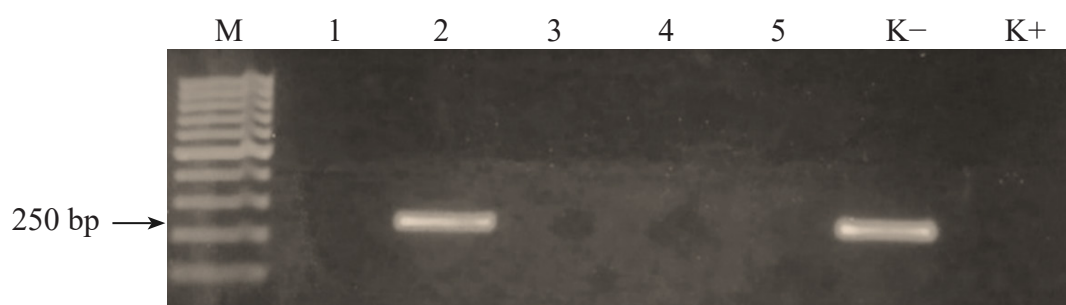
Gejala umum infeksi CSVd yang ditemukan di lapangan pada tanaman induk krisan ialah gejala kerdil yang disertai dengan daun menguning. Terdapat juga gejala belang atau mosaik pada daun dan gejala penebalan tulang daun (*vein banding*), yaitu daerah sekitar tulang daun berwarna lebih gelap dibanding daerah lainnya (Gambar 1). Infeksi viroid juga dapat menyebabkan daun tanaman krisan berwarna hijau muda, bercak klorosis, perkembangan akar terhambat, pembungaan terjadi lebih awal dengan bunga dan daun berukuran kecil, serta warna bunga memudar (Sugiura dan Hanada 1998; Doi dan Kato 2004; Hosokawa *et al.* 2004; Cho *et al.* 2013; Matsushita *et al.* 2013). Selain itu juga ditemukan gejala hawar daun yang diduga disebabkan oleh patogen lain selain virus atau viroid.

Infeksi CSVd pada Tanaman Induk Krisan

Hasil deteksi menunjukkan bahwa dari beberapa sampel uji terdapat dua sampel terkonfirmasi positif CSVd, yaitu var. Dewi Ratih (varietas lokal) dan var. Zimba (varietas introduksi) yang berasal dari lapangan (Gambar 2). Tanaman krisan var. Dewi Ratih dari lapangan tersebut selanjutnya digunakan untuk uji pembebasan viroid menggunakan perlakuan suhu rendah dan antiviral ribavirin,



Gambar 1 Gejala kerdil, klorosis dan mosaik daun, serta *vein banding* pada helaian tanaman induk krisan di lapangan. a, Var. Dewi Ratih; b, Var. Cintia; c, Var. Zimba.



Gambar 2 Amplifikasi cDNA *Chrysanthemum stunt viroid* berukuran 250 pb pada beberapa sampel krisan. M, Penanda DNA 100 pb; 1, Planlet var. Dewi Ratih; 2, Tanaman induk var. Dewi Ratih dengan gejala kerdil; 3, Planlet var. Azzura; 4, Planlet var. Nismara; 5, Planlet var. Merah Hayani; K+, Kontrol positif (var. Zimba); K-, Kontrol negatif (akuades). Data hasil deteksi tidak ditampilkan seluruhnya.

sedangkan tanaman krisan var. Zimba digunakan sebagai kontrol positif. Planlet krisan var. Dewi Ratih yang negatif CSVd digunakan sebagai tanaman kontrol negatif.

Pertumbuhan Kultur *in Vitro* Tanaman Terinfeksi CSVd

Inisiasi kultur jaringan tanaman terinfeksi CSVd berhasil dilakukan pada eksplan tanaman krisan var. Dewi Ratih dengan metode perendaman stek pucuk saat sterilisasi (Gambar 3a). Eksplan berhasil tumbuh baik menjadi planlet dan dapat dilakukan perbanyakan secara *in vitro* untuk perlakuan suhu rendah dan antiviral. Tanaman krisan var. Dewi Ratih terinfeksi CSVd memiliki daun hijau dan segar (Gambar 3b), tidak seperti ketika tanaman ditanam di lapangan yang tumbuh kerdil dan daun berwarna kekuningan.

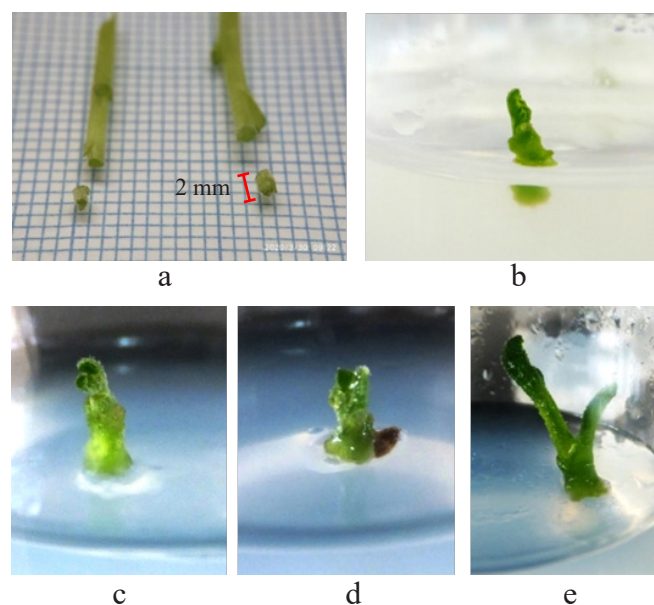
Pertumbuhan Planlet Krisan setelah Perlakuan Suhu Rendah dan Antiviral

Ujung tunas berukuran 2 mm digunakan sebagai eksplan (Gambar 4a) dan ditanam pada media $\frac{1}{2}$ MS0. Tunas mulai tumbuh pada 7 hari setelah tanam (HST) (Gambar 4b). Pada 14 HST ukuran tunas mencapai 0.7–0.9 cm (Gambar 4c–e). Tunas-tunas yang memiliki tinggi pucuk sekitar 0.5 cm digunakan untuk perlakuan suhu rendah.

Planlet krisan yang diberi perlakuan suhu 5 °C menunjukkan tinggi tunas yang nyata lebih rendah dan jumlah daun yang lebih sedikit dibandingkan dengan perlakuan kontrol (suhu 20 °C) (Tabel 1). Menurunnya laju pertumbuhan tunas dan jumlah daun pada perlakuan suhu rendah diduga disebabkan berkurangnya aktivitas metabolisme pada tanaman sehingga memperlambat pertumbuhan.



Gambar 3 Perbanyakkan tanaman krisan var. Dewi Ratih terinfeksi *Chrysanthemum stunt viroid* melalui kultur jaringan. a, Sterilisasi eksplan melalui perendaman batang tanaman dalam larutan campuran bakterisida dan fungisida sistemik; b, Perbanyakkan tanaman terinfeksi secara *in vitro*.



Gambar 4 Pertumbuhan planlet krisan pada medium 1/2 MSO. a, Potongan ujung tunas berukuran 2 mm sebagai eksplan; b, Eksplan berumur 7 hari setelah tanam; c, d, dan e, Eksplan berumur 14 hari setelah tanam.

Tabel 1 Pengaruh perlakuan suhu rendah terhadap pertambahan tinggi tunas dan jumlah daun

Perlakuan	Jumlah sampel (n)	Rata-rata pertambahan tinggi tunas per bulan*	Rata-rata pertambahan jumlah daun per bulan*
Suhu rendah (5 °C)	60	0.57 b	1.74 b
Kontrol (suhu ruang 20 °C)	60	1.40 a	4.40 a

*Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata berdasarkan uji T pada taraf nyata α 5%.

Walaupun pertumbuhannya lebih rendah, tanaman krisan tampak hijau, segar dan tidak mengalami etiolasi pada penyimpanan 5 bulan dalam *growth chamber*.

Pemberian antiviral ribavirin tidak berpengaruh terhadap daya tahan hidup

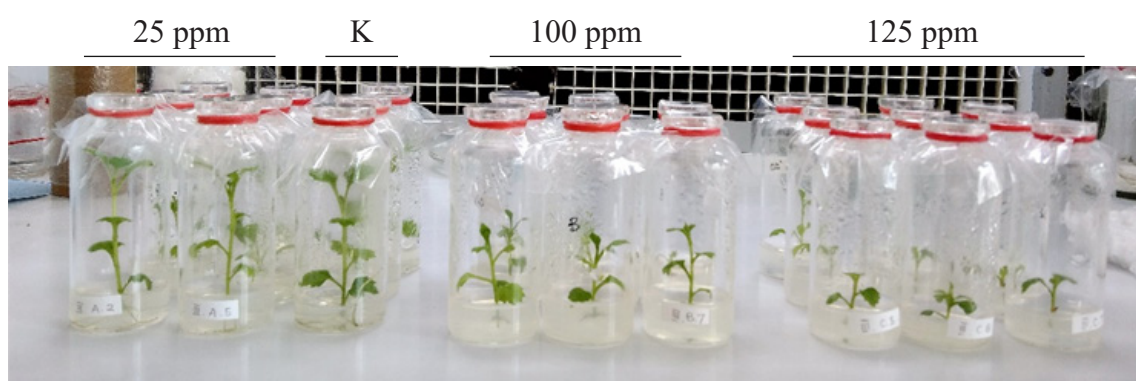
planlet krisan; semua planlet yang diberi perlakuan pada konsentrasi 25, 100, maupun 125 ppm menunjukkan kemampuannya untuk tetap bertahan hidup. Penampilan planlet pada media perlakuan cukup baik, yaitu planlet tetap berwarna hijau segar seperti

pertumbuhan pada planlet tanaman kontrol (antiviral 0%) (Gambar 5). Hal ini menandakan bahwa ribavirin tidak menyebabkan toksik terhadap planlet tanaman krisan. Planlet tidak mengalami *browning* (pencokelatan) sehingga tidak ada planlet yang mati sampai akhir penelitian. Akan tetapi, hasil pengamatan menunjukkan bahwa antiviral ribavirin berpengaruh terhadap laju pertumbuhan planlet krisan dan bergantung pada konsentrasi yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi, pertumbuhan planlet semakin terhambat. Pada konsentrasi 25 ppm, laju pertumbuhan planlet

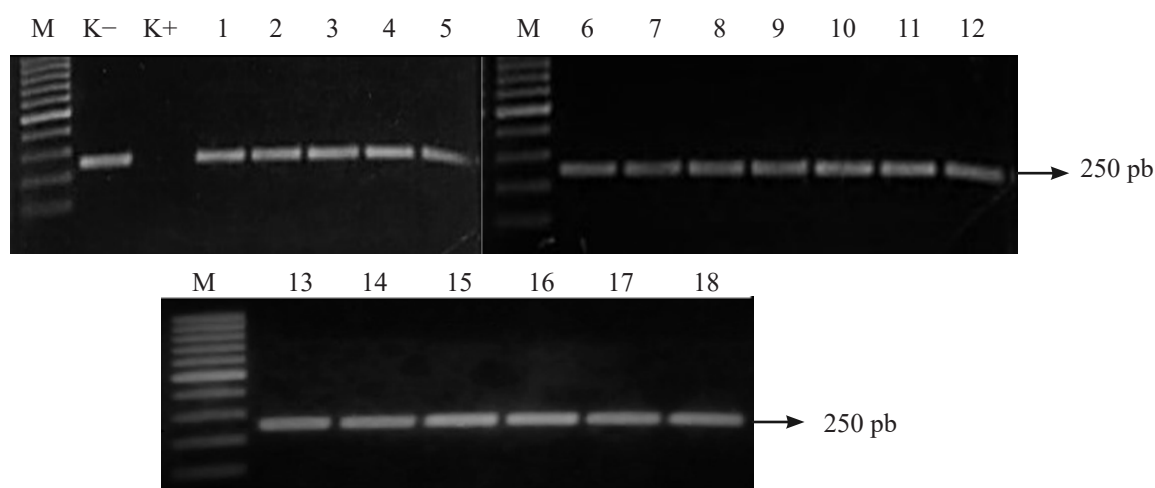
tidak berbeda dengan pertumbuhan tanaman kontrol, namun pertumbuhan terhambat pada konsentrasi ribavirin 100 dan 125 ppm. Pada umur kultur yang sama, tinggi planlet yang diberi perlakuan ribavirin konsentrasi 100 dan 125 ppm berturut-turut hanya setengah dan sepertiga dari tinggi planlet tanaman kontrol (Gambar 5).

Deteksi CSVd pada Planlet Pasca Perlakuan

Konfirmasi keberadaan CSVd pada planlet-planlet uji dengan RT-PCR menunjukkan bahwa DNA CSVd teramplifikasi pada target



Gambar 5 Pertumbuhan planlet krisan var. Dewi Ratih terinfeksi *Chrysanthemum stunt viroid* pada tiga konsentrasi ribavirin yang berbeda (25,100, dan 125 ppm) dan suhu rendah setelah penyimpanan selama 1 bulan. K, planlet tanpa perlakuan ribavirin sebagai kontrol.



Gambar 6 Deteksi *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) pada planlet krisan yang diberi kombinasi perlakuan suhu rendah pada penyimpanan 1, 3, dan 5 bulan dan antiviral ribavirin (konsentrasi 25, 100, dan 125 ppm). Pita DNA CSVd terdeteksi pada ~250 pb pada semua sampel uji. M, Penanda DNA 100 pb; K+, Kontrol positif; K-, Kontrol negatif; 1–3, Penyimpanan 1 bulan dan konsentrasi 25 ppm; 4–6, Penyimpanan 1 bulan dan konsentrasi 100 ppm; 7–9, Penyimpanan 1 bulan dan konsentrasi 125 ppm; 10–12, Penyimpanan 5 bulan dan konsentrasi 25 ppm; 13–15, Penyimpanan 5 bulan dan konsentrasi 100 ppm; dan 16–18, Penyimpanan 5 bulan dan konsentrasi 125 ppm. Data hasil deteksi tidak ditampilkan seluruhnya.

~250 pb di semua sampel planlet (Gambar 6). Hal ini menunjukkan bahwa CSVd belum mampu dibebaskan dari jaringan tanaman sakit dengan perlakuan suhu rendah (1, 3, dan 5 bulan) dan antiviral ribavirin (25, 100, dan 125 ppm).

PEMBAHASAN

Planlet krisan bebas CSVd sangat dibutuhkan untuk penyediaan tanaman induk krisan dengan kualitas dan kuantitas produksi yang tinggi. Pada saat produksi bunga potong, tanaman terinfeksi CSVd tingginya hanya mencapai sepertiga sampai seperlima dari tinggi tanaman sehat. Oleh karena itu benih krisan bebas CSVd sangat diperlukan. Berdasarkan fakta di lapangan, tanaman terinfeksi CSVd masih mampu memproduksi sepanjang dilakukan pemeliharaan dan pemupukan yang baik. Namun, bunga potong yang dihasilkan masuk ke dalam *grade* yang lebih rendah dengan harga jual yang lebih murah. Hal ini tentu mengurangi jumlah produksi bunga potong yang sesuai standar.

Dalam mendukung perbanyakan cepat benih krisan bebas virus/viroid, upaya pembebasan viroid dari tanaman terinfeksi secara *in vitro* perlu terus dilakukan. Berbagai metode eliminasi perlu dicoba dengan menggunakan teknik-teknik yang lebih baik, efektif dan efisien. CSVd dilaporkan dapat menginvasi jaringan meristem (Zhang *et al.* 2014), penggunaan jaringan meristem sebagai materi pengujian tetap dilakukan dengan memberikan perlakuan, misalnya perlakuan suhu rendah dan atau perlakuan antiviral

Planlet bebas CSVd tidak berhasil diperoleh pada penelitian yang dilakukan menggunakan kombinasi suhu 5 °C dan antiviral ribavirin. Salah satu faktor yang menjadi kendala keberhasilan tersebut ialah jenis dan ukuran eksplan yang digunakan, yaitu ujung tunas berukuran 2 mm. Sebaiknya digunakan jaringan meristem (0.1–0.2 mm) sebagai eksplan. Faktor lain ialah jeda waktu antara tahap perlakuan suhu rendah dengan perlakuan ribavirin. Pada penelitian ini,

planlet/tunas pasca perlakuan suhu rendah yang dikeluarkan dari ruang penyimpanan suhu rendah 5 °C terlebih dahulu disimpan di ruang inkubasi dengan suhu yang lebih tinggi (18–20 °C) sebelum di sub kultur pada media *in vitro* yang mengandung ribavirin. Hal ini kemungkinan memberi peluang kepada CSVd untuk berkembang kembali pada suhu yang lebih tinggi. Suhu rendah dapat menurunkan konsentrasi viroid, tetapi konsentrasi dapat meningkat kembali setelah jaringan tanaman dibiarkan/dipindahkan selama 8 bulan pada kondisi normal (30 °C) (Chung *et al.* 2006). Berdasarkan hal tersebut, untuk mencegah berkembangnya lagi CSVd dalam jaringan sebaiknya setelah perlakuan suhu rendah 5 °C planlet krisan langsung ditanam pada media yang mengandung antiviral ribavirin dan kondisi lingkungan di sekitar planlet tetap dijaga pada suhu rendah 5 °C.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa perlakuan suhu rendah (5 °C) dan antiviral ribavirin sampai 125 ppm aman untuk pertumbuhan tanaman krisan karena tidak menyebabkan toksisitas terhadap tanaman, walaupun pada konsentrasi yang tinggi laju pertumbuhan planlet terhambat. Akan tetapi, penggunaan tunas ujung (2 mm) yang dipadukan dengan perlakuan suhu rendah (5 °C) dan ribavirin (25, 100, dan 125 ppm) bukan merupakan kombinasi yang baik untuk mendapatkan planlet tanaman krisan bebas CSVd. Dengan demikian perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari teknik eliminasi CSVd dari stek krisan yang efektif dan juga perlu mengeksplorasi cara eliminasi CSVd dari biji untuk mendapatkan induk sehat yang akan menjadi tantangan di masa depan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (saat ini Balai Besar Standardisasi Instrumen Pertanian/BBSIP), Kementerian Pertanian atas dukungan dana dan fasilitas penelitian melalui DIPA 2019–2020.

DAFTAR PUSTAKA

- Barba M, Hosakawa M, Wang QC, Taglienti A, Zhang Z. 2017. Viroid elimination by thermotherapy, cold therapy, tissue culture, in vitro micrografting, or cryotherapy. Di dalam: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P, editor. *Viroids and Satellite*. New York: Academic Press. hlm 425–435. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00040-1>.
- [BPS] Biro Pusat Statistik. 2018. Statistik tanaman hias (statistics of ornamental plants) Indonesia 2018. <https://www.bps.go.id/> [diakses 15 Juni 2022]
- Cho WK, Jo Y, Jo KM, Kim KH. 2013. A current overview of two viroids that infect chrysanthemums: *Chrysanthemum stunt viroid* and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*. *Viruses*. 5(4):1099–1113. DOI: <https://doi.org/10.3390/v5041099>.
- Chung BN, Joo HE, Kim JS. 2006. Effect of temperature on the concentration of *Chrysanthemum stunt viroid* in CSVd-infected Chrysanthemum. *The Plant Pathology Journal*. 22(2):152–154. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.2006.22.2.152>.
- Chung BN, Pak HS. 2008. Seed transmission of *Chrysanthemum stunt viroid* in chrysanthemum (*Dendranthemum grandiflorum*) in Korea. *The Plant Pathology Journal*. 24(1):31–35. DOI: <https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.1.031>.
- Diningsih E, Suastika G, Sulyo Y, Winarto B. 2013. Deteksi dan identifikasi *Chrysanthemum stunt viroid* pada tanaman krisan menggunakan teknik *reverse transcriptase polymerase chain reaction*. *Jurnal Hortikultura*. 23(1):1–8. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v23n1.2013.p1-8>.
- Doi M, Kato K. 2004. Nucleotide sequence of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) occurred in Shizuoka prefecture and symptoms of chrysanthemum cultivar. *Annual Report of the Kansai Plant Protection Society*. 46:1–14. DOI: <https://doi.org/10.4165/kapps.46.11>.
- Hadidi A, Sun L, Randles JW. 2022. Modes of viroid transmission. *Cells*. 11(4):719. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells11040719>.
- Hosokawa M, Ueda M, Ohishi K, Otake A, Yazawa S. 2004. *Chrysanthemum stunt viroid* disturbs the photoperiodic response for flowering of chrysanthemum plants. *Planta*. 220:64–70. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1318-2>.
- Iraklis B, Kanda H, Nabeshima T, Onda M, Ota N, Koeda S, Hosokawa M. 2016. Digestion of *Chrysanthemum stunt viroid* by leaf extracts of *Capsicum chinense* indicates strong RNA-digesting activity. *Plant Cell Reports*. 35:1617–1628. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1977-z>.
- Jeon SM, Naing AH, Kim HH, Chung MY, Lim KB, Kim CK. 2016. Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* and *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* from infected chrysanthemum by cryopreservation. *Protoplasma*. 253:1135–1144. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0874-6>.
- Kovalskaya N, Hammond RW. 2014. Molecular biology of viroid-host interactions and disease control strategies. *Plant Science*. 228:48–60. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>.
- Matsushita Y. 2013. *Chrysanthemum stunt viroid* (A Review). *Japan Agricultural Research Quarterly*. 47(3):237–242. DOI: <https://doi.org/10.6090/jarq.47.237>.
- Osaka M, Itabashi T, Chiba N, Sumitomo K, Matsushita Y. 2021. The effects on adventitious root formation caused by *Chrysanthemum stunt viroid* in *Chrysanthemum morifolium* and *C. seticuspe*. *Journal of Phytopathology*. 169(11–12):710–715. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.13042>.
- Palukaitis P. 2017. *Chrysanthemum stunt viroid*. Di dalam: Hadidi A, Flores R, Randles JW, Palukaitis P, editor. *Viroids and Satellite*. New York: Academic Press. hlm 181–190. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00017-6>.

- Savitri WD, Park KI, Jeon SM, Chung MY, Han JS, Kim CK. 2013. Elimination of *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) from meristem tip culture combined with prolonged cold treatment. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 54:177–182. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0141-8>.
- Shintiavira H, Rahmawati F, Winarto B. 2014. Aplikasi modifikasi media generic dalam produksi bibit krisan (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) berkualitas melalui kultur *in vitro*. *Jurnal Hortikultura*. 24(3):220–229. DOI: <https://doi.org/10.21082/jhort.v24n3.2014.p220-229>.
- Supakitthanakorn S, Vichitrangoontavorn K, Kunasakdakul K, Ruangwong OU. 2022. Phylogenetic analysis and molecular characterization of *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* and *Chrysanthemum stunt viroid* from chrysanthemum in Thailand. *Journal of Phytopathology*. 170(10):700–710. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.13134>.
- Sugiura H, Hanada K. 1998. *Chrysanthemum stunt viroid*, a disease of large flowered chrysanthemum in Niigata Prefecture. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 67(3):432–438. DOI: <https://doi.org/10.2503/jjshs.67.432>.
- Temaja IGRM. 2012. Karakterisasi *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) yang menginfeksi krisan di Indonesia. *Agritrop*. 29 (1). Tersedia pada: <<https://ojs.unud.ac.id/index.php/agritrop/article/view/3076>>. [diakses 01 September 2023].
- Zhang ZB, Haugslie S, Clark JL, Spetz C, Blystad DR, Wang QC, Lee Y, Sivertsen A, Skjeseth G. 2014. Cryotherapy could not eradicate *Chrysanthemum stunt viroid* from infected *Argyranthemum maderense* ‘Yellow Empire’. *Acta Horticulturae*. 1039:201–208. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1039.26>.