

Eliminasi *Onion yellow dwarf virus* melalui Kultur *Meristem Tip* pada Bawang Merah (*Allium ascalonicum* L.)

Elimination of Onion yellow dwarf virus through Meristem Tip Culture in Shallot (Allium ascalonicum L.)

Aqlima¹, Bambang S. Purwoko², Sri Hendrastuti Hidayat³, dan Diny Dinarti^{2*}

Diterima 19 Oktober 2016/Disetujui 08 Februari 2017

ABSTRACT

Meristem tip culture is culture of isolated meristem with 1-2 leaf primordia on suitable medium. This method is generally used to obtain free virus plant. Optimization of plant growth regulators (PGRs) was done to accelerate explant growth without callus formation and to avoid somaclonal variation in meristem tip culture. The aims of this study were to achieve the best combination of PGR for meristem tip growth and to evaluate meristem tip culture potential for Onion yellow dwarf virus (OYDV) elimination in shallot. This study used combination of PGRs 0.25 mg L⁻¹ (2-ip, BAP, GA₃, kinetin) with or without 0.1 mg L⁻¹ IAA and medium without PGR. This research consisted of two experiments conducted separately. In experiment I, cv. Bima Brebes was used and experiment II cv. Tiron was used. Each experiment was arranged in completely randomized block design with single factor (PGR combination) that has 8 combination levels and 3 replications. The result showed that medium without PGR was the most efficient for meristem tip growth. Primary shoot was growing without callus formation. RT-PCR analysis showed that all of the tested samples were still infected by OYDV. Meristem tip culture method did not eliminate OYDV in both cultivars.

Keywords: Auxin, cytokinin, GA₃, OYDV, RT-PCR

ABSTRAK

Kultur *meristem tip* merupakan kultur meristem yang diisolasi 1-2 primordia daun dan pada media yang sesuai. Metode ini umum digunakan untuk mendapatkan tanaman bebas virus. Optimasi terhadap zat pengatur tumbuh (ZPT) dilakukan untuk mempercepat pertumbuhan eksplan tanpa disertai pembentukan kalus untuk menghindari terjadinya variasi somaklonal pada kultur *meristem tip*. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi ZPT terbaik bagi pertumbuhan *meristem tip* dan untuk mengevaluasi potensi kultur *meristem tip* dalam mengeliminasi virus *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) pada tanaman bawang merah. Penelitian ini menggunakan 0.25 mg L⁻¹ (2-ip, BAP, GA₃, kinetin) dengan penambahan atau tanpa 0.1 mg L⁻¹ IAA serta media tanpa ZPT. Penelitian ini terdiri atas 2 percobaan terpisah. Percobaan 1 menggunakan cv. Bima Brebes dan Percobaan 2 menggunakan cv. Tiron. Masing-masing percobaan disusun berdasarkan rancangan kelompok lengkap teracak (RKLT) dengan 1 faktor, yaitu kombinasi ZPT yang terdiri atas 8 taraf kombinasi dan 3 ulangan. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa media tanpa penambahan ZPT merupakan media yang paling efisien untuk pertumbuhan tunas *meristem tip*. Tunas utama tumbuh tanpa disertai pembentukan kalus. Hasil analisis RT-PCR menunjukkan bahwa seluruh sampel yang dideteksi masih terinfeksi OYDV. Metode kultur *meristem tip* belum dapat mengeliminasi virus OYDV pada kedua kultivar bawang merah.

Kata kunci: Auksin, GA₃, OYDV, RT-PCR, sitokinin

¹Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor Jl. Meranti, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

³Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

Email: dinydinarti@gmail.com (*penulis korespondensi)

PENDAHULUAN

Bawang merah (*Allium ascalonicum* L.) merupakan salah satu komoditas pertanian penting yang memiliki potensi hasil tinggi dan dibudidayakan di berbagai wilayah Indonesia. Perbanyakan bawang merah pada umumnya dilakukan secara vegetatif, karena dianggap lebih praktis. Perbanyakan secara vegetatif dapat menyebabkan berbagai infeksi virus terbawa oleh benih dan terakumulasi dari generasi ke generasi (Gunaeni *et al.*, 2011). *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) merupakan salah satu jenis virus yang sering ditemukan menginfeksi tanaman bawang (Shahraeen *et al.*, 2008). Virus ini berperan dalam penurunan ukuran umbi, memperpendek masa dormansi umbi dan menyebabkan kehilangan hasil panen (Brewster, 2008). Infeksi OYDV pada bawang bombay dan bawang putih di wilayah Giza dilaporkan menurunkan bobot umbi yang mencapai 42-58% (Elnagar *et al.*, 2009). Gunaeni *et al.* (2011) melaporkan bahwa 85% dari kultivar bawang merah yang diperoleh dari sentra produksi daerah Jawa Barat dan Jawa Tengah juga telah terinfeksi OYDV.

Penggunaan bahan perbanyakan tanaman yang sehat merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mencegah kehilangan hasil panen akibat infeksi virus (Perotto *et al.*, 2010). Kultur *meristem tip* merupakan metode yang umum digunakan untuk mendapatkan tanaman bebas virus. Hal ini didasari oleh asumsi bahwa bagian kubah apikal bebas dari infeksi virus atau mengandung sedikit konsentrasi virus (Wang dan Hu, 1980). Metode ini telah diaplikasikan oleh Verbeek *et al.* (1995) dan Taşkin *et al.* (2013) pada bawang putih dan berhasil mendapatkan tanaman yang bebas dari infeksi OYDV. Penelitian Kasutjianingsih *et al.* (2011) menunjukkan bahwa aplikasi *in vitro* Rizobakteri sebagai agen hayati dapat menurunkan keparahan penyakit layu Fusarium. Namun sejauh ini, penelitian yang mengkaji eliminasi virus pada bawang merah masih terbatas, sehingga perlu dikembangkan.

Pemilihan dan penentuan konsentrasi zat pengatur tumbuh (ZPT) pada kultur *meristem tip* bergantung pada jenis dan ukuran eksplan yang digunakan (Bhojwani dan Dantu, 2013). Pemberian NAA dan GA₃ pada konsentrasi 0.3 mg L⁻¹ mampu mempercepat pertumbuhan tunas *meristem tip* bawang putih

(Ma *et al.*, 1994). GA₃ juga mampu menginduksi pertumbuhan tunas yang normal tanpa adanya multiplikasi pada tanaman anyelir (Ashnaya *et al.*, 2012). Pada umumnya, sitokinin digunakan dalam kultur *meristem tip*. Aplikasi sitokinin (2-ip, BA dan kinetin) pada konsentrasi tinggi dengan kisaran 0.5-2.0 mg L⁻¹ dilaporkan dapat menginduksi terjadinya multiplikasi tunas pada *meristem tip* bawang putih, baik pemberian dalam bentuk kombinasi auksin-sitokinin ataupun sitokinin tunggal (Taşkin *et al.*, 2013; Gull *et al.*, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan kombinasi ZPT yang paling baik untuk pertumbuhan *meristem tip* dan mengevaluasi potensi kultur *meristem tip* dalam mengeliminasi virus OYDV pada bawang merah.

BAHAN DAN METODE

Pesiapan Bahan Tanam dan Sterilisasi

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman 3, dan Laboratorium Mikroteknik, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB serta Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman IPB pada bulan Juni 2015 sampai Juni 2016. Percobaan ini menggunakan bawang merah kultivar Bima Brebes dan Tiron. Umbi bibit yang digunakan telah mengalami dua bulan penyimpanan dan diperoleh dari petani penyedia bibit bawang merah di Kabupaten Brebes dan Bantul.

Persiapan eksplan diawali dengan membuang kulit terluar dan mencuci bersih umbi bawang merah, selanjutnya umbi dicuci bersih menggunakan deterjen selama 7 menit sebanyak 2 kali, dan dibilas dengan air mengalir, kemudian umbi direndam dalam larutan 0.04% streptomisin sulfat dan 0.16% mankozeb selama semalam, dan dibilas dengan akuades steril sebanyak 2-3 kali. Umbi disterilisasi dengan 1.05% NaOCl selama 20 menit. Tahapan selanjutnya dilakukan di *laminar air flow* (LAF). Umbi dikupas 1-2 lapisan, kemudian disterilisasi dengan 0.525% NaOCl selama 25 menit. Eksplan dipotong hingga berukuran 0.5-1.0 cm dan dikulturkan pada media MS serta diinkubasi selama 1 hari (24 jam). Eksplan yang sudah dikulturkan pada media MS disterilisasi kembali menggunakan 0.263% NaOCl selama 5 menit.

Isolasi eksplan *meristem tip* berukuran kurang dari 1 mm dilakukan di bawah mikroskop binokular dengan bantuan pinset dan jarum diseksi.

Rancangan Percobaan dan Pelaksanaan

Eksplan dikulturkan pada media *Murashige dan Skoog* (MS) yang mengandung zat pengatur tumbuh (ZPT) dan tanpa ZPT (kontrol) serta dengan penambahan 30 g L⁻¹ sukrosa dan 2 g L⁻¹ *Gelrite* dengan pH 5.8-6.0. ZPT yang digunakan, terdiri atas 0.25 mg L⁻¹ GA₃, 0.25 mg L⁻¹ (2-ip, BAP, kinetin) dikombinasikan dengan dan tanpa 0.1 mg L⁻¹ IAA. Eksplan diinkubasi di ruang kultur dengan intensitas cahaya 2000 lux selama 24 jam pada suhu 25 ± 1 °C. Penelitian ini terdiri atas 2 percobaan terpisah. Percobaan 1 menggunakan cv. Bima Brebes dan Percobaan 2 menggunakan cv. Tiron. Masing-masing percobaan disusun berdasarkan rancangan kelompok lengkap teracak (RKLT) dalam faktor tunggal, yaitu kombinasi ZPT untuk pertumbuhan tunas *meristem tip* yang terdiri atas 8 taraf kombinasi. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga terdapat 24 satuan percobaan. Satu satuan percobaan terdiri atas 4 tabung kultur dan masing-masing tabung ditanam satu eksplan.

Eksplan steril dikulturkan pada media perlakuan selama 3 minggu, selanjutnya tunas yang tumbuh dipindahkan ke media multiplikasi tunas berupa media MS + 2 mg L⁻¹ 2-ip + 0.3 mg L⁻¹ GA₃ dan disimpan di ruang kultur dengan kondisi yang sama. Subkultur dilakukan 3-4 minggu sekali sebanyak 3 kali. Tunas yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke media induksi umbi mikro (Dinarti, 2012), yaitu media MS + vitamin B5 + sukrosa 120 g L⁻¹ dan diinkubasi di ruang kultur dengan intensitas cahaya 2000 lux selama 24 jam pada suhu 30 ± 1 °C selama 8 minggu, hingga tunas menjadi planlet.

Tahapan persiapan dan aklimatisasi planlet. Planlet umbi lapis mikro dibersihkan dari sisa-sisa media dan direndam dalam larutan bakterisida dan fungisida masing-masing 2 g L⁻¹ selama 5 menit, kemudian dikeringkan dengan kertas tisu. Umbi lapis mikro ditanam dalam wadah gelas plastik yang telah diberi media dengan campuran tanah steril, arang sekam dan pupuk kandang (1:1:1). Penyiraman menggunakan media ½ MS

dilakukan 2 hari sekali dan pemberian pupuk daun (*Gandasil D*) 2 g L⁻¹ dilakukan 1 minggu sekali. Aklimatisasi dilakukan di kotak kasa yang ternaung dari sinar matahari langsung selama 2-3 minggu.

Ekstraksi RNA dan RT-PCR

Ekstraksi RNA dilakukan secara manual menggunakan metode CTAB (Doyle dan Doyle, 1987) yang telah modifikasi. Sintesis *complementary DNA* (cDNA) dilakukan dengan 10 µl volume yang mengandung 3 µl RNA, 1 µl primer poty, 2 µl 50 mM DTT, 2 µl 5x *buffer* RT, 1 µl 10 mM dNTP, 0.5 µl *Ribolock*, 0.35 µl M MuLV, 0.15 µl *Water free-nuclease*. Reaksi terdiri atas 65 °C (5 menit), 42 °C (60 menit) dan 70 °C (10 menit). Primer untuk amplifikasi PCR berdasarkan Mahmoud *et al.* (2007), dengan primer *forward* 5'- CGAAGCAAATTGCCAAGCAG -3' dan *reverse* 5'- CGATTAGCTGCCCCCTCTAAC -3'. Reaksi PCR dilakukan dengan 25 µl volume larutan yang mengandung 9.5 µl dH₂O, 12.5 µl *GTG master mix*, 1 µl untuk masing-masing primer (*forward-reverse*) dan 1 µl cDNA. Amplifikasi dilakukan sebanyak satu siklus pada 94 °C (3 menit), selanjutnya 35 siklus dengan tahapan denaturasi pada 94 °C (30 detik), *annealing* pada 52 °C (1 menit), dan sintesis pada 72 °C (1 menit), serta satu siklus pada 72 °C (7 menit). Amplifikasi DNA target dilakukan menggunakan mesin *GeneAMP PCR System 9700 (PE Applied Biosystems)*. Pada penelitian ini, kontrol positif menggunakan RNA tanaman yang positif terinfeksi OYDV, sedangkan kontrol negatif menggunakan *Water free nuclease*. DNA dielektroforesis menggunakan 1% gel agarosa yang dilarutkan dalam *buffer* 0.5x *Tris-Borate* EDTA (TBE) pada tegangan 50 volt selama 50 menit, kemudian direndam dalam larutan etidium bromida selama 30 menit. Penanda ukuran DNA yang digunakan adalah 1 kb DNA *Ladder (Thermo Scientific, USA)*. Visualisasi DNA dilakukan di bawah *UV transilluminator* dan didokumentasikan dengan kamera digital.

Deteksi Awal Infeksi Virus pada Umbi Bawang Merah

Deteksi awal hanya dilakukan pada bawang merah cv. Tiron, karena diasumsikan Bima Brebes telah terinfeksi OYDV yang

merujuk pada laporan Wulandari (2016), bahwa umbi yang dideteksi 100% telah terinfeksi virus. Deteksi awal menggunakan umbi Tiron yang diperoleh dari penangkar bawang merah di Kabupaten Bantul. Penanaman umbi dilakukan dengan cara mengambil 100 umbi secara acak dari 2 ikat benih umbi (satu ikat benih beratnya \pm 2 kg). Ujung umbi dipotong sekitar 1/3 bagian umbi yang bertujuan untuk mempercepat perkecambahan. Selanjutnya, umbi ditanam pada media air selama 2 minggu dengan bantuan *styrofoam* yang telah dilubangi sebagai penyangga umbi. Pengambilan sampel daun dari umbi yang ditanam dilakukan secara acak, yaitu sebanyak 49 dari 100 umbi yang ditanam. Pendeteksian sampel daun dilakukan dengan metode *dot immune binding assay* (DIBA) menggunakan antibodi OYDV berdasarkan metode Mahmoud *et al.* (1997) yang telah dimodifikasi.

Pengamatan dan Analisis Data

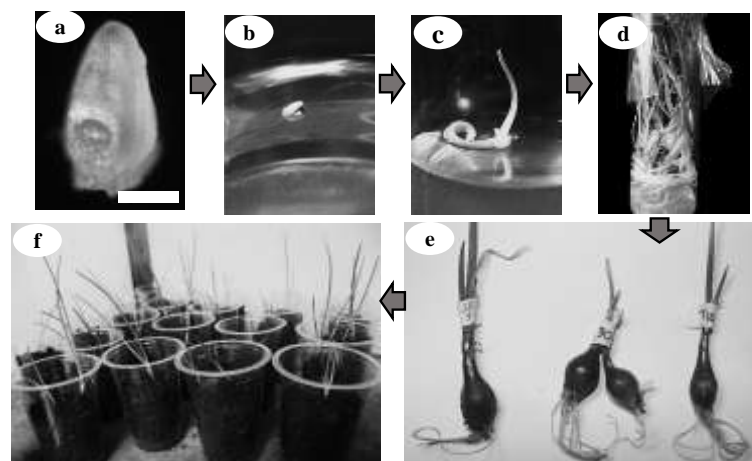
Pengamatan terhadap eksplan yang diberi perlakuan ZPT dilakukan setiap minggu hingga 3 minggu setelah tanam (MST). Peubah yang diamati dari percobaan ini meliputi persentase tumbuh eksplan, persentase eksplan berdaun, persentase eksplan abnormal, jumlah daun, tinggi tunas, dan persentase eliminasi virus. Data penelitian dianalisis menggunakan analisis ragam (ANOVA). Uji lanjut dilakukan terhadap perlakuan yang berpengaruh nyata

menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan awal *meristem tip* setelah dikultur pada media perlakuan memperlihatkan pemanjangan primordia daun dan pembengkakan bagian cakram umbi (*basal plate*) yang terlihat pada 1 MST. Keberhasilan tumbuh eksplan dilihat dari kemampuan eksplan untuk tumbuh dan membentuk daun (Gambar 1. a-c). Persentase tumbuh eksplan Bima Brebes yang paling tinggi diperoleh dari perlakuan kinetin serta kombinasi 2-ip dan IAA, dengan persentase tumbuh yang mencapai 100% (Gambar 2). Sementara itu, persentase tumbuh eksplan yang paling rendah (58%) terdapat pada perlakuan GA₃, serta kombinasi kinetin dan IAA. Persentase eksplan tumbuh yang paling tinggi pada Tiron yaitu 91% terdapat pada perlakuan BAP dan kombinasi kinetin dengan IAA.

Rata-rata persentase eksplan Bima Brebes dan Tiron yang mengalami gagal tumbuh masing-masing sebesar 19% dan 28%. Kegagalan pertumbuhan eksplan yang diisolasi dari *meristem tip* (0.6-1.0 mm) bawang putih sebesar 29% juga dilaporkan Verbeek *et al.* (1995). Gagalnya eksplan tumbuh tidak disebabkan oleh media, akan tetapi dipengaruhi oleh kontaminasi, perlakuan akibat isolasi eksplan maupun akibat proses sterilisasi.

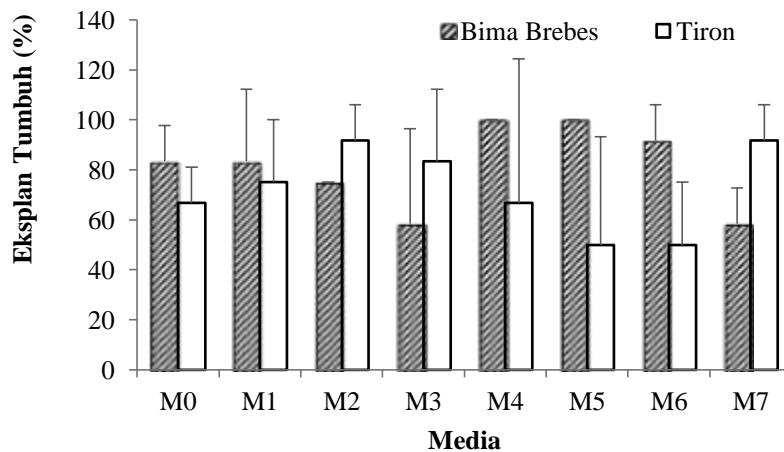


Gambar 1. Tahapan kultur *meristem tip*, pengumbian *in vitro*, dan aklimatisasi pada cv. Bima Brebes dan Tiron. a. Isolasi *meristem tip* yang disertai 1-2 primordia daun, bar = 200 μ m, b. Pertumbuhan *meristem tip* pada 1 MST, c. Pertumbuhan *meristem tip* 3 pada MST, d. Perbanyakan tunas, e. Umbi lapis mikro, dan f. Aklimatisasi

Eksplan Bima Brebes yang telah berhasil tumbuh dapat membentuk daun dengan rata-rata 100%, sedangkan persentase berdaun eksplan Tiron 13% lebih rendah dari Bima Brebes. Hasil analisis statistik terhadap persentase eksplan berdaun pada cv. Tiron menunjukkan bahwa perlakuan ZPT tidak memberikan pengaruh yang nyata.

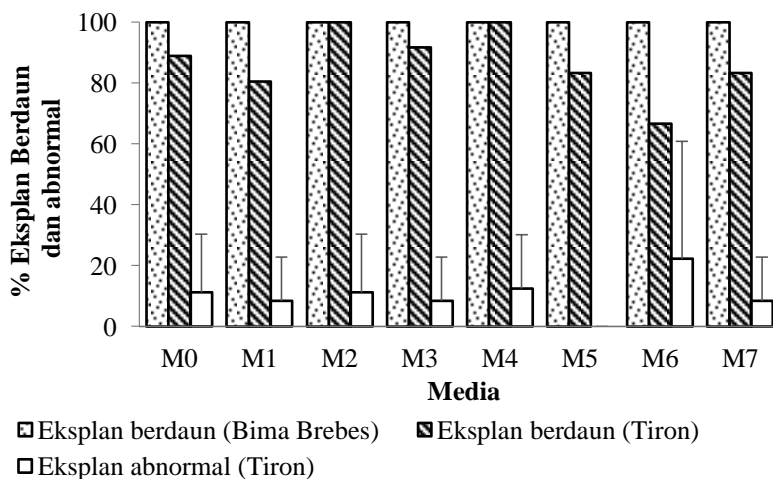
Selama tiga minggu pengamatan ditemukan eksplan dengan morfologi yang tidak normal, seperti daun atau tunas yang mengalami vitrifikasi maupun klorosis pada

cv. Tiron. Persentase eksplan abnormal antara 0-22%. (Gambar 3). Sebagian besar eksplan mengalami vitrifikasi atau disebut juga dengan *hyperhidricity* memperlihatkan morfologi daun yang tembus cahaya. Eksplan cenderung mengalami pertumbuhan yang lambat dan bahkan tidak mampu bertahan hidup. Wu *et al.* (2009) menyatakan bahwa tanaman yang mengalami *hyperhydric* memiliki kandungan air yang lebih tinggi, sehingga menyebabkan kandungan oksigen, protein dan klorofil pada tanaman rendah.



Keterangan: M0 = Kontrol, M1 = 0.25 mg L⁻¹ 2-ip, M2 = 0.25 mg L⁻¹ BAP, M3 = 0.25 mg L⁻¹ GA₃, M4 = 0.25 mg L⁻¹ kinetin, M5 = 0.25 mg L⁻¹ 2-ip + 0.1 mg L⁻¹ IAA, M6 = 0.25 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IAA, M7 = 0.25 mg L⁻¹ kinetin + 0.1 mg L⁻¹ IAA

Gambar 2. Persentase tumbuh eksplan pada dua kultivar bawang merah pada 3 MST



Keterangan: M0 = Kontrol, M1 = 0.25 mg L⁻¹ 2-ip, M2 = 0.25 mg L⁻¹ BAP, M3 = 0.25 mg L⁻¹ GA₃, M4 = 0.25 mg L⁻¹ kinetin, M5 = 0.25 mg L⁻¹ 2-ip + 0.1 mg L⁻¹ IAA, M6 = 0.25 mg L⁻¹ BAP + 0.1 mg L⁻¹ IAA, M7 = 0.25 mg L⁻¹ kinetin + 0.1 mg L⁻¹ IAA

Gambar 3. Persentase eksplan berdaun dan abnormal pada cv. Bima Brebes dan Tiron

Tabel 1. Respon eksplan (*meristem tip*) terhadap perlakuan ZPT

ZPT	Bima Brebes		Tiron	
	Jumlah Daun (Helai)	Tinggi Tunas (cm)	Jumlah Daun (Helai)	Tinggi Tunas (cm)
Kontrol	2.11	2.46	1.89	1.58 a
0.25 mg L ⁻¹ 2-ip	1.75	2.18	1.67	1.32 ab
0.25 mg L ⁻¹ BAP	2.22	2.11	2.14	1.23 ab
0.25 mg L ⁻¹ GA ₃	1.75	2.74	1.83	1.20 ab
0.25 mg L ⁻¹ Kinetin	2.00	2.68	1.88	1.45 a
0.25 mg L ⁻¹ 2ip + 0.1 mg L ⁻¹ IAA	2.00	1.73	1.50	0.68 bc
0.25 mg L ⁻¹ BAP + 0.1 mg L ⁻¹ IAA	2.17	1.43	1.33	0.56 c
0.25 mg L ⁻¹ kinetin + 0.1 mg L ⁻¹ IAA	1.89	1.97	1.47	0.86 abc
KK (%)	12.80	18.37	5.12	16.63
Uji F	tn	tn	tn	*

Keterangan: tn = tidak berbeda nyata, * = berbeda nyata, angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada kolom yang sama artinya tidak berbeda nyata berdasarkan uji DMRT pada taraf $\alpha = 0.05$.

Eksplan cv. Bima Brebes dan Tiron yang dikulturkan pada media dengan perlakuan ZPT tidak memperlihatkan pengaruh yang berbeda nyata pada jumlah daun. Perlakuan ZPT berpengaruh nyata pada tinggi tunas cv. Tiron (Tabel 1). Eksplan yang dikulturkan pada media tanpa ZPT (kontrol) memiliki tinggi tunas yang nyata lebih tinggi dibandingkan dengan eksplan pada media yang mengandung 2-ip + IAA dan BAP + IAA, namun tinggi tunas eksplan kontrol tidak berbeda nyata dengan eksplan yang dikulturkan pada media yang diberi 2-ip, BAP, GA₃, kinetin, dan kombinasi kinetin + IAA. Gull *et al.* (2014) melaporkan bahwa *meristem tip* bawang putih yang dikulturkan pada media MS tanpa ZPT tetap dapat tumbuh dan membentuk tunas. Bhojwani dan Dantu (2013) menyatakan bahwa eksplan dapat tumbuh dan berkembang menjadi planlet disebabkan oleh *meristem tip* memiliki 1-2 primordia daun yang dapat mensuplai auksin dan sitokinin untuk mendukung pertumbuhan eksplan yang normal.

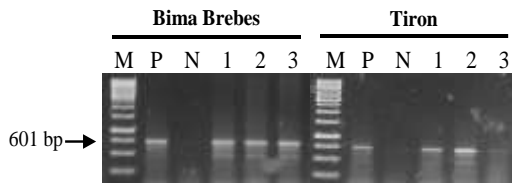
Tinggi tunas Bima Brebes pada semua perlakuan ZPT tidak berbeda nyata. Penambahan IAA dalam kombinasi ZPT diperkirakan dapat menghambat pemanjangan tunas. Ma *et al.* (1994) menyatakan bahwa pemberian auksin dengan konsentrasi rendah pada kombinasi auksin-sitokinin pada bawang putih dapat mendukung pertumbuhan tunas, akan tetapi menyebabkan tunas menjadi pendek dan tebal.

Eksplan yang dikulturkan pada komposisi ZPT yang berbeda mampu menginduksi pertumbuhan tunas utama tanpa diikuti proses pembentukan kalus. Ashnayi *et al.* (2012) melaporkan bahwa aplikasi GA₃ 0.5 mg L⁻¹ pada kultur *meristem tip* tanaman anyelir dapat mempercepat pertumbuhan tunas. Tunas yang dihasilkan tumbuh normal tanpa disertai multiplikasi, diduga karena konsentrasi ZPT yang diberikan cukup rendah. Menurut Gull *et al.* (2014), aplikasi sitokinin berpotensi menginduksi multiplikasi tunas pada konsentrasi 0.5 mg L⁻¹.

Deteksi Virus

Hasil deteksi virus terhadap sampel daun bawang merah cv. Tiron menunjukkan bahwa infeksi virus OYDV mencapai 100%. Deteksi virus terhadap tanaman hasil kultur *in vitro* menggunakan metode RT-PCR dikarenakan tingkat sensitivitasnya tinggi, sehingga dapat mendeteksi jaringan tanaman dengan konsentrasi virus yang sedikit. Hasil RT-PCR tanaman yang terinfeksi oleh OYDV ditunjukkan oleh amplifikasi pita yang panjangnya 601 bp. Sampel daun yang digunakan untuk deteksi virus berasal dari tanaman kultur *in vitro* yang telah melewati tahapan aklimatisasi (Gambar 1. d-f). Deteksi virus dilakukan pada cv. Bima Brebes dan Tiron. Setiap kultivar diambil tiga sampel daun komposit dan masing-masing komposit mewakili 3 tanaman. Hasil analisis RT-PCR memperlihatkan fragmen DNA virus teramplifikasi pada seluruh sampel daun

komposit yang berasal dari kedua kultivar bawang merah (Gambar 4). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman hasil kultur *meristem tip* masih mengandung virus OYDV.



Gambar 4. Amplifikasi fragmen cDNA dengan RT-PCR menggunakan spesifik primer OYDV terhadap tanaman hasil kultur *meristem tip*. M = 1 kb DNA Ladder, P = kontrol positif, N = kontrol negatif, 1-3 = sampel komposit (setiap komposit terdiri dari 3 sampel tanaman) hasil kultur *meristem tip*

Hasil ini mengindikasikan bahwa metode kultur *meristem tip* masih belum dapat mengeliminasi virus OYDV pada cv. Bima Brebes maupun Tiron. Eksplan *meristem tip* berukuran kurang dari 1 mm yang digunakan pada penelitian ini diduga masih mengandung virus. *Meristem tip* merupakan bagian tanaman yang aktif membelah dan belum memiliki jaringan pembuluh yang menjadi jalur cepat penyebaran virus pada tanaman (Wang dan Hu, 1980). Namun, virus dapat menginvasi sel melalui plasmodesmata yang terdapat pada sel-sel *meristem tip* (Ayabe dan Sumi, 2001) dan penyebaran virus juga dilaporkan berasosiasi dengan kemampuan plasmodesmata dalam mendukung pergerakan virus (Wang *et al.*, 2008).

Keberhasilan eliminasi virus juga dapat dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti ukuran *meristem tip* (Verbeek *et al.*, 1995; Ashnayi *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012), konsentrasi virus di dalam jaringan tanaman (Pramesh dan Baranwal, 2015), genotipe tanaman, jenis ZPT yang digunakan pada kultur *in vitro* (Ashnayi *et al.*, 2012) dan metode eliminasi (Bhojwani dan Dantu, 2013). Termoterapi merupakan salah satu metode yang cukup efisien digunakan untuk eliminasi virus. Pramesh dan Baranwal (2015) melaporkan bahwa eliminasi virus OYDV dan virus lainnya pada tanaman bawang putih berhasil dilakukan. Termoterapi yang digunakan, yaitu aplikasi udara panas dan panas matahari yang dipaparkan secara

langsung pada umbi bawang, kemudian dilanjutkan dengan kultur *meristem tip*. Bhojwani dan Dantu (2013) menyatakan bahwa aplikasi termoterapi secara *in vivo* berguna untuk menekan replikasi virus, menghambat *coat protein* (CP) dan bagian virus yang mengkode *movement protein* pada virus, yang berguna untuk pergerakan virus dari sel ke sel. Oleh karena itu, efisiensi eliminasi virus menggunakan kultur *meristem tip* dapat ditingkatkan dengan cara mengkombinasikan kultur *meristem tip* dengan metode lainnya, agar dapat mengeliminasi OYDV secara efektif pada tanaman yang terinfeksi.

KESIMPULAN

Media tanpa penambahan ZPT merupakan media yang paling efisien untuk pertumbuhan tunas meristem tip. Tunas utama tumbuh tanpa disertai pembentukan kalus. Hasil analisis RT-PCR menunjukkan bahwa seluruh sampel yang dideteksi masih terinfeksi virus OYDV. Hal ini menunjukkan bahwa kultur *meristem tip* belum dapat mengeliminasi virus OYDV pada kedua kultivar bawang merah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Virologi Tumbuhan (IPB) yang telah banyak membantu dan mendukung pendeteksian virus OYDV pada tanaman bawang merah. Penulis juga mengucapkan terima kasih Laboratorium Pemuliaan Tanaman (IPB) atas izin penggunaan kotak kasa bebas serangga.

DAFTAR PUSTAKA

- Ashnayi, M., M. Kharrazi, A. Sharifi, M. Mehrvar. 2012. *Carnation etched ring virus* elimination through shoot tip culture. J. Biol. Environ. Sci. 6(17): 175-180.
- Ayabe, M., S. Sumi. 2001. A novel and efficient culture method 'stem-disc dome culture' for producing virus-free

- garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep. 20: 503-507.
- Brewster, J.L. 2008. Interactions with other organisms. p. 171-249. In: Onions and Other Vegetable Alliums. 2nd Edition. UK, Cabi.
- Bhojwani, S.S., P.K. Dantu. 2013. Production of virus-free plants. p. 227-243. In: S.S. Bhojwani, P.K. Dantu (Eds). Plant Tissue Culture: an Introduction Text. ID, Springer India. doi:10.1007/978-81-322-1026-9.
- Dinarti, D. 2012. Perbanyak dan induksi umbi lapis mikro bawang merah secara *in vitro*. [Disertasi]. Sekolah Pasca sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 94 hal.
- Doyle, J.J., J.J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation of procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19: 11-19.
- Elnagar, S., M.A.K. El-Sheikh, A.S. Abdel-Wahed. 2009. Effect of natural infection with *Onion yellow dwarf virus* (OYDV) on yield of onion and garlic crops in Egypt. p. 34-39. 4th Conference on Recent Technologies in Agriculture. www.conf2009.agr.cu.edu.eg/res/5.pdf. [17 Maret 2016].
- Gunaeni, N., A.W. Wulandari, A.S. Duriat, A. Muharam. 2011. Penyakit tular virus umbi pada tiga belas varietas bawang merah asal Jawa Barat dan Jawa Tengah. J. Hort. 21(2): 164-172.
- Gull, I., A. Noreen, M.S. Aslan, M.A. Athar. 2014. Comperative effect of different pytohormones on the micropropagation *Allium sativum*. Pak. J. Biochem. Mol. Biol. 47(1-2): 121-124.
- Hu, G.J., N. Hong, L.P. Wang, H.J. Hu, G.P. Wang. 2012. Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. Crop Protection. 37: 20-25.
- Kasutjaningati, R. Poerwanto, Widodo, N. Khumaida, D. Efendi. 2011. Efektifitas aplikasi *in vitro* Rizobakteri sebagai agen antagonis layu fusarium pada pisang Rajabulu/AAB di rumah kaca. J. Hort. Indonesia. 2(1): 34-42.
- Ma, Y., H.L. Wang, C.J. Zhang, Y.Q. Kang. 1994. High rate of virus-free planlet regeneration via garlic scape-tip culture. Plant Cell Report. 14: 65-68.
- Mahmood, T., G.L. Hein, R.C. French. 1997. Development of serological procedures for rapid and reliable detection of *Wheat streak mosaic virus* in a single Wheat curl. mite. Plant Dis. 81: 250-253.
- Mahmoud, S.Y.M., S.A. Abo-El Maaty, A.M. El-Borollosy, M.H. Abdel-Ghaffar. 2007. Identification of *onion yellow dwarf Potyvirus* as one of the major viruses infecting garlic in Egypt. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci. 2(6): 746-755.
- Pramesh, D., V.K. Baranwal. 2015. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) through meristem tip culture after solar or hot air treatment of cloves. J. Hort. Sci. & Biotech. 90(2): 180-186.
- Perotto, M.C., E.E. Cafrune, V.C. Conci. 2010. The effect of additional viral infection on garlic plants initially infected with *Allexivirus*s. Eur. J. Plant Pathol. 126: 489-495.
- Shahraeen, N., D.E. Lesemann, T. Ghotbi. 2008. Survey for viruses infecting onion, garlic, and leek crops in Iran. Bull. OEPP/EPPO Bull. 38: 131-135.
- Taşkin, H., G. Baktemur, M. Kurul, S. Büyükalaca. 2013. Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR. Research Article. The Scientific World Journal. Hindawi. 1-5.
- Verbeek M., P. van Dijk, M.A. van Well. 1995. Efficiency of eradication of four viruses from garlic (*Allium sativum*) by

- meristem-tip culture. *European J. Pathol.* 101:231-239.
- Wang, P.J., C.Y. Hu. 1980. Regeneration of virus-free plants through *in vitro* culture. *Advances in BioMed. Engineer.* 18: 61-99.
- Wang, Q., W.J. Cuellar, M-L. Rajämaki, Y. Hirata, J.P.T. Valkonen. 2008. Combined thermotherapy and cryotherapy for efficient virus eradication: relation of virus distribution, subcellular changes, cell survival and viral RNA degradation in shoot tips. *Mol Plant Pathol.* 9(2): 237-250.
- Wu, Z., L.J. Chen, Y.J. Long. 2009. Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell. Dev.-Plant.* 45: 438-490.
- Wulandari, A.W. 2016. Deteksi dan eliminasi virus pada umbi bawang merah. [Tesis]. Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Bogor. 38 hal.