

Aplikasi Ribavirin Pada Shoot Tip Bawang Merah untuk Eliminasi Virus OYDV (Application of Ribavirin on Shoot Tip of Shallot for OYDV Eradication)

Aqlima¹⁾, Bambang Sapta Purwoko²⁾, Sri Hendrastuti Hidayat³⁾ dan Diny Dinarti²⁾

¹⁾Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Bogor, Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

²⁾Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Jln. Meranti, Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

³⁾Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor, Jln. Kamper, Dramaga, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680
E-mail: aqlima87@gmail.com

Diterima: 3 April 2018; direvisi: 7 Mei 2018; disetujui: 20 Juni 2018

ABSTRAK. Kemoterapi merupakan aplikasi senyawa kimia (ribavirin) yang memiliki aktivitas antiviral guna menghambat ataupun menghentikan multiplikasi virus pada jaringan tanaman. Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap pertumbuhan *shoot tip* bawang merah untuk mengeliminasi virus OYDV. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan 3, Departemen AGH IPB dan Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman IPB, sejak bulan Oktober 2015 hingga Juni 2016. Rancangan percobaan yang digunakan adalah kelompok lengkap teracak dengan dua faktor dan empat ulangan, setiap ulangan terdiri atas empat tabung kultur yang ditanam satu eksplan. Percobaan dilakukan secara terpisah pada dua kultivar bawang merah, yaitu Bima Brebes dan Tiron. Faktor pertama adalah konsentrasi ribavirin, yaitu 0, 5, 10, 15, dan 20 mg/L. Faktor kedua adalah ukuran eksplan (*shoot tip*), yaitu 1,1–2,0 mm dan 2,1–3,0 mm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ribavirin menekan tinggi tunas cv. Bima Brebes, waktu muncul daun, tinggi tunas, dan jumlah daun cv. Tiron. Ukuran *shoot tip* yang lebih besar (2,1–3,0 mm) dapat meningkatkan persentase tumbuh eksplan dan mempercepat waktu muncul daun pada cv. Bima Brebes dan Tiron. Konsentrasi ribavirin yang diaplikasikan pada dua ukuran *shoot tip* masih belum dapat mengeliminasi virus OYDV pada kedua kultivar bawang merah.

Katakunci: Bawang merah; *In vitro*; Ribavirin; *Shoot tip*

ABSTRACT. Chemotherapy is an application of chemistry compound (ribavirin) that has antiviral activity to inhibit virus multiplication in plant tissues. The objective of the experiment was to evaluate the effect of ribavirin concentrations on shoot tip growth of shallot for OYDV eradication. The experiment was conducted at Tissue Culture Laboratory 3, Agronomy Department and Plant Virology Laboratory, Plant Protection Department of IPB from October 2015 until June 2016. The experiment was arranged in a completely randomized block design with two factors and four replications. Each experimental unit consisted of four bottles with one explant in it. The first factor was ribavirin concentrations, i.e. 0, 5, 10, 15, and 20 mg/L. Second factor was shoot tip sizes, i.e. 1.1–2.0 mm and 2.1–3.0 mm. The experiment showed that increasing ribavirin concentrations suppressed the shoot length of cv. Bima Brebes, and it also inhibited the time of leaf to emerge, shoot length, and leaf number of cv. Tiron. Increasing shoot tip size (2.1–3.0 mm) influenced percentage of explant growth and speed the time of leaf emergence of cv. Bima Brebes and Tiron. Ribavirin concentrations used in this treatment did not eradicate OYDV in both shoot tip sizes of the two cultivars.

Keywords: Shallot ; *In vitro*; Ribavirin; Shoot tip

Bawang merah merupakan tanaman sayur unggulan Indonesia setelah kubis dan kentang dengan produksi pada tahun 2014 mencapai 1.233.989 ton. Bawang merah dibudidayakan hampir di seluruh provinsi di Indonesia. Sentra produksi utama bawang merah berada di pulau Jawa, yaitu Jawa Tengah (Badan Pusat Statistik 2016).

Masalah yang saat ini dihadapi adalah berbagai kultivar bawang merah yang dibudidayakan telah terinfeksi virus (Gunaeni et al. 2011; Swari, Subandiyah & Hartono 2015; Wulandari 2016). Sistem perbanyakan vegetatif menggunakan umbi bawang merah yang selama ini dilakukan petani menyebabkan akumulasi virus pada generasi berikutnya (Gunaeni et al. 2011).

Pengujian virus yang dilakukan oleh Wulandari (2016) menunjukkan bahwa kultivar Bima Brebes 100% terinfeksi *Onion yellow dwarf virus* (OYDV), sedangkan Tiron dilaporkan telah terinfeksi *Potyvirus* (Swari, Subandiyah & Hartono 2015). OYDV merupakan virus yang termasuk kelompok *Potyvirus* dan berkontribusi terhadap kehilangan hasil panen yang dilaporkan mencapai 60% (Brewster 2008).

Protokol eliminasi virus pada tanaman *Allium* telah banyak dilaporkan dan berhasil mendapatkan tanaman bebas virus secara *in vitro*, akan tetapi secara umum metode yang digunakan berupa kultur *meristem tip* yang dikombinasikan dengan metode lainnya. Taşkin et al. (2013) menyatakan bahwa isolasi bagian *meristem*

tip merupakan hal yang sulit dilakukan, membutuhkan banyak waktu, dan keahlian khusus. Oleh karena itu, pada penelitian ini metode yang digunakan berupa kultur tunas pucuk (*shoot tip culture*) yang dikombinasikan dengan metode kemoterapi dengan tujuan mendapatkan persentase eliminasi virus yang tinggi.

Kemoterapi merupakan aplikasi senyawa kimia yang bertujuan menghentikan laju infeksi pada tanaman yang terinfeksi virus (Sastry & Zitter 2014). Ribavirin (*1-β-D-ribofuranosil-1,2,4-trizole-3-carboxamide*) merupakan senyawa yang memiliki kemampuan aktivitas antiviral, yang dapat menghambat proses sintesis RNA dan DNA virus (Streeter *et al.* 1973). Penggunaan senyawa kimia antiviral secara *in vitro* dapat memberikan efek fitotoksik pada eksplan yang diberi perlakuan. Oleh karena itu, diperlukan konsentrasi yang paling efektif dalam mengeliminasi virus dan mendapatkan eksplan yang mampu bertahan hidup (Verma, Ram & Zaidi 2005).

Konsentrasi ribavirin yang diujikan memberikan pengaruh yang beragam pada masing-masing tanaman. Neelamathi, Manuel & George (2014) melaporkan bahwa *meristem tip* tebu yang dikulturkan pada konsentrasi ribavirin rendah (2,5, 5,0, dan 7,5 mg/L) tidak memperlihatkan adanya penghambatan pada pertumbuhan dan multiplikasi eksplan, akan tetapi konsentrasi tersebut tidak mampu mengeliminasi virus. Sementara itu, ribavirin dengan konsentrasi yang tinggi dapat menimbulkan efek fitotoksik sehingga dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan eksplan. Andriani, Ermavitalini & Nurmalasari (2013) berhasil memperoleh tebu yang bebas dari virus *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) melalui kultur *meristem tip* dan penambahan ribavirin dengan konsentrasi optimum 30 mg/L dan 40 mg/L tanpa menghambat pertumbuhan secara permanen. Ribavirin juga diaplikasikan oleh Fletcher, Fletcher & Lewthwaite (1998) dengan konsentrasi 50 mg/L pada bawang merah yang dikombinasikan dengan termoterapi. Namun, ukuran *basal disc* yang digunakan tersebut cukup besar sehingga pada penelitian ini menggunakan ekplan *shoot tip*.

Penelitian bertujuan mengetahui pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap pertumbuhan *shoot tip* bawang merah untuk mengeliminasi virus OYDV.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2015 hingga Juni 2016 di Laboratorium Kultur Jaringan 3, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB serta

Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman. Penelitian menggunakan bawang merah kultivar Bima Brebes dan Tiron yang telah mengalami pemecahan dormansi dan umbi bibit diperoleh dari petani penyedia bibit bawang merah di Kabupaten Brebes dan Bantul.

Pesiapan Bahan Tanam dan Sterilisasi

Persiapan eksplan diawali dengan membuang kulit bawang merah terluar dan umbi dicuci bersih. Umbi kemudian direndam dan dikocok dengan larutan deterjen selama 7 menit sebanyak dua kali, dan dibilas dengan air mengalir. Umbi disterilisasi dengan 0,04% streptomisin sulfat dan 0,16% mankozeb, dan dikocok selama semalam, selanjutnya dibilas dengan akuades steril sebanyak 2–3 kali. Sterilisasi umbi dilanjutkan dengan perendaman dan pengocokan dalam 1,05% NaOCl selama 20 menit. Tahapan berikutnya 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 tunas pucuk atau *shoot tip* (1,1–3,0 mm) dengan dua hingga tiga primordia daun dilakukan di bawah mikroskop binocular menggunakan pinset dan jarum diseksi.

Eksplan yang diisolasi dibagi menjadi dua kelompok ukuran, yaitu D1 (1,1–2,0 mm) dan D2 (2,1–3,0 mm) dan dikulturkan pada media MS yang mengandung 2 ppm 2ip + 0,3 ppm GA₃ + ribavirin. Perlakuan ribavirin yang diaplikasikan pada eksplan terdiri atas lima taraf konsentrasi, yaitu 0, 5, 10, 15, dan 20 mg/L. Konsentrasi yang digunakan lebih kecil (0–20 mg/L) dibandingkan penelitian sebelumnya. Hal ini dikarenakan eksplan *shoot tip* yang digunakan pada penelitian ini berukuran lebih kecil dibandingkan *basal disc* yang digunakan Fletcher, Fleteher & Lawthwaite (1998).

Ribavirin disterilisasi menggunakan *syringe filter* 0,22 μm (*Omricon scientific*) kemudian ditambahkan ke dalam larutan media yang telah disterilisasi dengan *autoclave*. Eksplan diinkubasi di ruang kultur dengan intensitas cahaya ± 2.000 lux selama 24 jam pada suhu 37 ± 2°C selama 4 minggu. Eksplan selanjutnya disubkultur pada media yang sama tanpa ribavirin dengan kondisi ruang kultur yang sama selama 5 minggu. Eksplan kemudian dipindahkan ke ruang kultur dengan suhu 25 ± 1°C untuk perbanyak tunas. Tunas yang tumbuh selanjutnya dipindahkan ke media induksi umbi mikro (Dinarti 2012), yaitu media MS + vitamin B5 + sukrosa 120 g/L dan diinkubasi di ruang kultur dengan intensitas cahaya ± 2.000 lux selama 24 jam pada suhu 30 ± 1°C selama 8 minggu.

Planlet umbi lapis mikro dibersihkan dan direndam dalam larutan bakterisida dan fungisida masing-masing 2 g/L selama 5 menit dan 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 2–3 hari sekali dan pemberian pupuk daun (*Gandasil D*) 2 g/L dilakukan 1 minggu sekali. Aklimatisasi dilakukan di kotak kaca yang ternaung dari sinar matahari langsung selama 2–3 minggu.

Rancangan Percobaan

Percobaan dilakukan secara terpisah pada dua kultivar bawang merah dan disusun menggunakan rancangan kelompok lengkap teracak (RKLK) dengan dua faktor, yaitu lima konsentrasi ribavirin (0, 5, 10, 15, dan 20 mg/L) dan 2 ukuran eksplan, yaitu D1 (1,1–2,0 mm) dan D2 (2,1–3,0 mm). Setiap kombinasi perlakuan diulang sebanyak empat kali sehingga terdapat 40 satuan percobaan. Satu satuan percobaan terdiri atas empat botol kultur, dan masing-masing botol ditanam satu eksplan sehingga setiap kultivar terdapat 160 satuan pengamatan.

Analisis RT-PCR

Total RNA diisolasi dari 0,1 g jaringan daun (tanaman yang telah diaklimatisasi) menggunakan metode CTAB (Doyle & Doyle 1987) yang telah dimodifikasi. 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 MMuLV, dan 0,15 µL *water free-nuclease*. Reaksi terdiri atas 65°C (5 menit), 42°C (60 menit), dan 70°C (10 menit). Primer yang digunakan untuk amplifikasi PCR berdasarkan Mahmoud et al. (2007). Primer *forward* yang digunakan 5'- CGAAGCAAATTGCCAAGCAG -3' dan primer *reverse* berupa 5'- CGATTAGCTGCCCCTCTAAC -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). 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*). Visualisasi DNA dilakukan di bawah *UV transluminator* dan didokumentasikan dengan kamera digital.

Pengamatan terhadap eksplan yang diberi perlakuan konsentrasi ribavirin dilakukan setiap minggu hingga 4 minggu setelah tanam (MST). Peubah yang diamati dari percobaan ini, meliputi persentase tumbuh eksplan, waktu muncul daun, jumlah tunas, jumlah daun, tinggi tunas, persentase eksplan *hyperhydric*, dan persentase eksplan bertunas.

Analisis Data

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

Pengaruh Ukuran *Shoot Tip* Terhadap Persentase Tumbuh Eksplan dan Waktu Muncul Daun

Perlakuan konsentrasi ribavirin dan ukuran *shoot tip* berpengaruh secara tunggal, tidak terdapat interaksi antara kedua faktor. Ukuran eksplan *shoot tip* berpengaruh terhadap persentase tumbuh eksplan dan

Tabel 1. Persentase tumbuh eksplan dan waktu muncul daun pada dua kultivar bawang merah (*Percentage of explant growth and time of leaf emergence of two shallot cultivars*)

Kultivar (<i>Cultivars</i>)	Ukuran eksplan (<i>Explant sizes</i>)	Persentase tumbuh eksplan (<i>Percentage of explant growth</i>)	Waktu muncul daun (<i>Time of leaf emergence</i>), MST (<i>WAP</i>)
Bima Brebes	D1	95,00 b	1,89 a
	D2	100,00 a	1,01 b
Uji F		*	**
Tiron	D1	94,58 b	1,43 a
	D2	100,00 a	1,12 b
Uji F		*	**

D1 = 1,1–2,0 mm, D2 = 2,1–3,0 mm

Tabel 2. Pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap persentase tumbuh eksplan dan waktu muncul daun (Influence of ribavirin concentrations on percentage of explant growth and time of leaf emergence)

Kultivar (Cultivars)	Konsentrasi ribavirin (Ribavirin concentrations), mg/L	Persentase tumbuh eksplan (Percentage of explant growth)	Waktu muncul daun (Time of leaf emergence), MST (WAP)
Bima Brebes	0	100,00 a	1,31 a
	5	100,00 a	1,28 a
	10	95,83 a	1,41 a
	15	100,00 a	1,46 a
	20	91,67 a	1,78 a
KK (CV), %		6,69	15,36
Uji F		tn	tn
Tiron	0	96,88 a	1,13 b
	5	100,00 a	1,08 b
	10	100,00 a	1,26 ab
	15	96,88 a	1,34 ab
	20	92,71 a	1,57 a
KK (CV), %		8,14	10,88
Uji F		tn	*

waktu muncul daun cv. Bima Brebes dan Tiron (Tabel 1). Eksplan dengan ukuran yang lebih besar (D2) memiliki persentase tumbuh 100% dan nyata lebih tinggi dibandingkan eksplan D1 dengan ukuran yang lebih kecil. Hal ini disebabkan kemampuan tumbuh eksplan meningkat sesuai dengan besarnya ukuran eksplan yang diisolasi (Oana *et al.* 2009).

Perlakuan ukuran eksplan juga memperlihatkan respon yang sama terhadap waktu muncul daun. Eksplan berukuran lebih besar (D2) memperlihatkan waktu muncul daun sangat nyata lebih cepat (1,01–1,12 MST) dibandingkan eksplan D1 (1,43–1,89 MST) pada kedua kultivar bawang merah.

Pertumbuhan dan Perkembangan Eksplan Pada Media Ribavirin

Eksplan *shoot tip* cv. Bima Brebes dan Tiron yang diberi perlakuan ribavirin memperlihatkan persentase tumbuh yang tinggi. Penambahan ribavirin pada media tidak berpengaruh nyata terhadap persentase tumbuh eksplan dari kedua kultivar bawang merah (Tabel 2). Pada cv. Bima Brebes, pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap waktu muncul daun secara statistik tidak berbeda nyata antara kontrol dengan konsentrasi lainnya. Peningkatan konsentrasi ribavirin (10–20 mg/L) cenderung menghambat pertumbuhan dan perkembangan eksplan sehingga rata-rata waktu muncul daun menjadi lebih lama dibandingkan kontrol. Hasil percobaan ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa kemampuan ribavirin dalam menghambat pertumbuhan eksplan sangat bergantung pada konsentrasi ribavirin (Klein & Livingston 1983) dan ukuran eksplan yang digunakan (Oana *et al.* 2009).

Perlakuan ribavirin 20 mg/L pada eksplan Bima Brebes diketahui menghambat waktu muncul daun 0,47 MST dibandingkan dengan kontrol. Sementara pada cv. Tiron, ribavirin memberikan pengaruh yang nyata terhadap waktu muncul daun. Penghambatan terhadap pertumbuhan eksplan Tiron juga memiliki pola yang hampir sama dengan Bima Brebes. Ribavirin dengan konsentrasi 20 mg/L diketahui secara nyata menghambat waktu muncul daun 0,44 MST dibandingkan dengan kontrol.

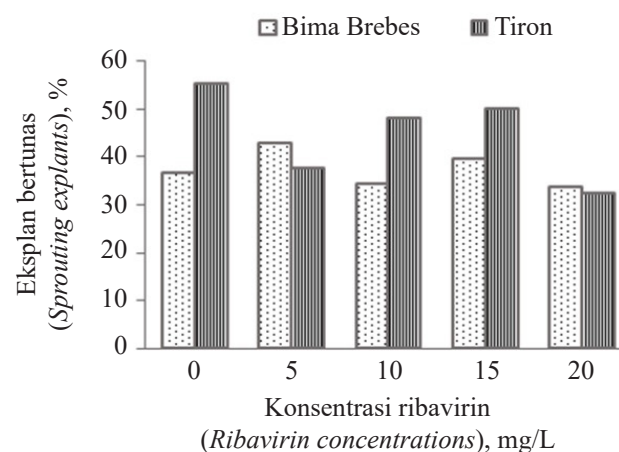
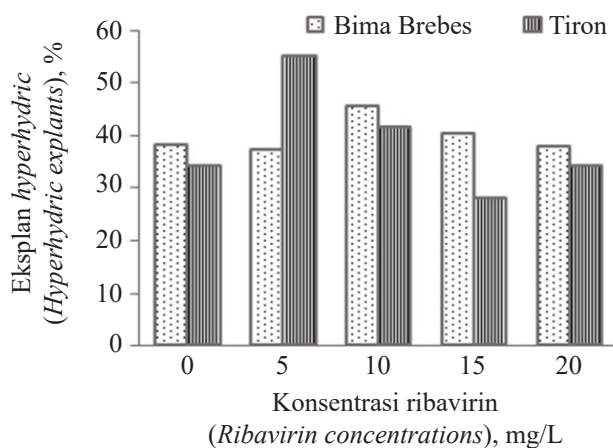
Pengaruh Ribavirin Terhadap Persentase Tumbuh Eksplan *Shoot Tip* dan Waktu Muncul Daun

Peningkatan konsentrasi ribavirin menekan laju pertumbuhan dan perkembangan eksplan *shoot tip*, pengaruh tersebut terlihat pada penurunan jumlah daun dan tinggi tunas (Tabel 3). Tunas Bima Brebes yang tumbuh pada media dengan ribavirin 20 mg/L memiliki jumlah daun 36% lebih rendah dibandingkan kontrol, meskipun secara statistik tidak berbeda nyata. Hal ini diduga akibat pertumbuhan planlet yang tidak seragam sehingga berpengaruh terhadap jumlah daun yang terbentuk. Sementara itu, perlakuan ribavirin 20 mg/L nyata menurunkan 34% jumlah daun yang terbentuk pada tunas cv Tiron. Perlakuan ribavirin diduga menghambat pembentukan daun, hal ini terlihat dari jumlah daun yang terbentuk semakin berkurang setelah penambahan ribavirin 5 hingga 20 mg/L

Hasil analisis statistik terhadap tinggi tunas menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ribavirin sangat nyata menghambat pemanjangan tunas pada kedua kultivar (Tabel 3). Perlakuan ribavirin 10 hingga 20 mg/L pada Bima Brebes menghasilkan tinggi tunas

Tabel 3. Pengaruh konsentrasi ribavirin terhadap jumlah daun, jumlah tunas, dan tinggi tunas pada dua kultivar (*Influence of ribavirin concentrations on number of leaf, number of shoot, and shoot length of two cultivars*)

Kultivar (Cultivars)	Konsentrasi ribavirin (Ribavirin concentrations), mg/L	Jumlah daun (No. of leaf)	Jumlah Tunas (No. of shoot)	Tinggi tunas (Plant height), cm
Bima Brebes	0	1,62 a	0,36	2,48 a
	5	1,56 a	0,43	2,47 a
	10	1,24 a	0,34	1,37 b
	15	1,25 a	0,40	1,68 b
	20	1,03 a	0,34	1,33 b
KK (CV), %		8,98	8,80	12,18
Uji F		tn	tn	**
Tiron	0	1,99 a	0,55	3,13 a
	5	1,43 b	0,38	2,18 b
	10	1,60 ab	0,48	2,25 b
	15	1,3 b	0,50	1,86 bc
	20	1,31 b	0,31	1,50 c
KK (CV), %		13,56	8,07	10,56
Uji F		*	tn	**



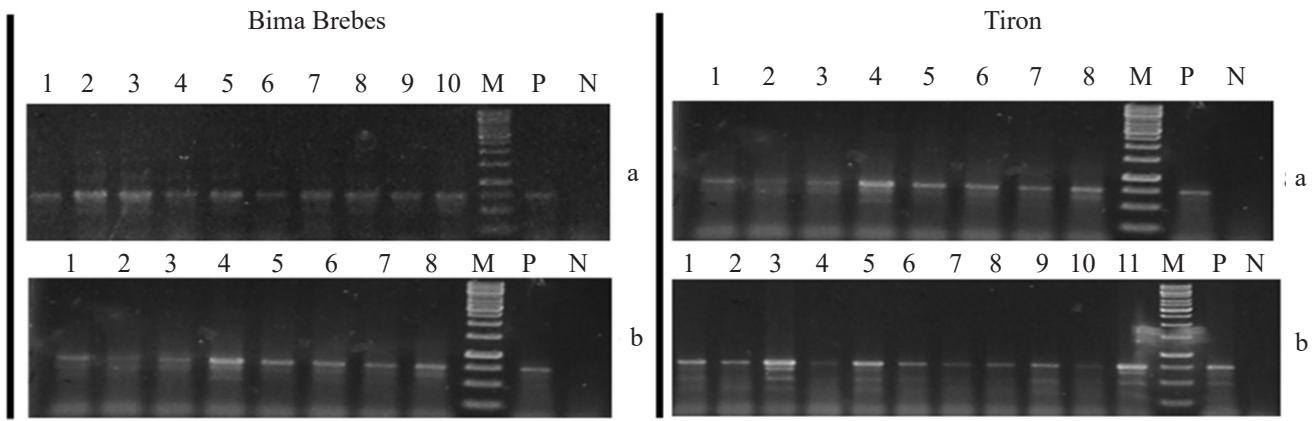
Gambar 1. Persentase eksplan *hyperhydric* dan bertunas pada bawang merah cv. Bima Brebes dan Tiron (*Percentage of hyperhydric and sprouting explants on shallot cv. Bima Brebes and Tiron*)

yang nyata lebih rendah dibandingkan kontrol. Tinggi tunas pada perlakuan ribavirin 20 mg/L (1,33 cm) tidak berbeda nyata dengan tunas pada 10 dan 15 mg/L.

Pada kultivar Tiron, penghambatan pemanjangan tunas terlihat pada pemberian ribavirin 5 hingga 20 mg/L. Tinggi tunas pada konsentrasi ribavirin 20 mg/L tidak berbeda nyata dengan tinggi tunas pada ribavirin 15 mg/L, namun berbeda nyata dengan perlakuan ribavirin (0–10 mg/L). Penghambatan pertumbuhan tinggi tunas terjadi karena ribavirin merupakan senyawa dengan struktur yang mampu beranalog dengan nukleotida purin (adenin dan guanisin). Ribavirin memungkinkan untuk menargetkan virus dan enzim

inang yang berkaitan dengan nukleotida purin (Wu, Lin & Hong 2003). Mekanisme kerja ribavirin tersebut dapat mengakibatkan efek toksik terhadap sel inang (Parker 2005). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ribavirin dapat menghambat pertumbuhan tunas dan pada konsentrasi tertentu menyebabkan kematian eksplan (Klein & Livingston 1983).

Pengamatan terhadap jumlah tunas menunjukkan bahwa konsentrasi ribavirin tidak berpengaruh nyata. Rendahnya jumlah tunas cv. Bima Brebes dan Tiron diduga akibat suhu inkubasi ekplan yang cukup tinggi ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) sehingga menghambat pembentukan dan regenerasi tunas.



Gambar 2. Elektroforesis agarose gel hasil deteksi RT-PCR menggunakan spesifik primer OYDV. (*The electrophoresis of agarose gel of RT-PCR detection using OYDV specific primer*). a = shoot tip (1,1–2,0 mm), b = shoot tip (2,1–3,0 mm), 1–11 = sampel daun yang teramplifikasi fragmen DNA 601 bp (*leaf samples amplified by 601 bp DNA fragment*), M = 1 kb DNA Ladder (*1 kb Ladder DNA*), P = kontrol positif (*positive control*), N = kontrol negatif (*negative control*)

Selain itu, *hyperhydricity* merupakan salah satu masalah yang dihadapi pada penelitian ini. Planlet yang mengalami *hyperhydric* memperlihatkan pertumbuhan dan morfologi tanaman yang abnormal, seperti memiliki daun yang kaku dan tebal, transparan, mengandung air, dan ujung daun menguning atau putih. Pembentukan daun menjadi terhambat dan berdasarkan pengamatan bahwa daun yang dihasilkan antara satu hingga dua helai. Wu, Chen & Long (2009) juga memaparkan bahwa tanaman *hyperhydric* memiliki anatomi daun yang abnormal, kemampuan berfotosintesis menurun, multiplikasi tunas terhambat, dan pada kondisi yang parah mengakibatkan tanaman mati.

Persentase eksplan yang mengalami *hyperhydric* antara 37–46% pada cv. Bima Brebes dan 28–55% pada Tiron (Gambar 1). Persentase *hyperhydricity* yang tinggi berpengaruh terhadap rendahnya persentase eksplan bertunas. Rata-rata persentase eksplan bertunas pada cv. Bima Brebes 34–43% dan pada Tiron 32–55%.

Deteksi Virus

Pendeteksian awal virus hanya dilakukan pada cv. Tiron untuk membuktikan bahwa sampel yang digunakan terinfeksi virus (data tidak ditampilkan), sedangkan cv. Bima Brebes diasumsikan telah terinfeksi OYDV yang merujuk pada laporan Wulandari (2016). Pendeteksian virus OYDV menggunakan metode RT-PCR dilakukan pada sampel tanaman (yang telah diaklimatisasi) cv. Bima Brebes dan Tiron dari seluruh kombinasi perlakuan, kecuali pada cv. Bima Brebes perlakuan ribavirin 20 mg/L dengan ukuran *shoot tip* 1,1–2,0 mm. Hal ini disebabkan oleh sedikitnya jumlah tanaman yang tumbuh normal pada perlakuan tersebut dan kematian eksplan yang terjadi akibat hal teknis

selama perbanyakan tanaman. Sampel daun komposit dari setiap kultivar diambil dengan mengoleksi daun tanaman dari setiap kombinasi perlakuan pada ulangan yang sama. Tanaman yang terinfeksi OYDV ditunjukkan oleh amplifikasi fragmen DNA yang panjangnya 601 bp.

Hasil pengujian virus menunjukkan bahwa seluruh tanaman dari dua kultivar masih mengandung virus OYDV (Gambar 2). Hasil yang didapat memperlihatkan bahwa perlakuan kemoterapi yang diberikan pada dua ukuran *shoot tip* (1,1–2,0 mm dan 2,1–3,0 mm) belum dapat mengeliminasi virus pada tanaman secara total. Konsentrasi ribavirin (5–20 mg/L) yang diaplikasikan pada *shoot tip* selama 4 minggu dan didukung dengan suhu inkubasi eksplan $37 \pm 2^\circ\text{C}$ belum mampu mematikan virus OYDV yang terdapat pada jaringan tanaman.

Keberhasilan metode kemoterapi dalam mengeliminasi virus dipengaruhi oleh konsentrasi ribavirin, diduga konsentrasi tersebut belum dapat mengeliminasi virus sehingga tidak mampu membebaskan tanaman dari infeksi virus. Ribavirin diketahui sebagai senyawa antiviral yang mampu menginduksi mutasi pada genom selama proses replikasi RNA di dalam sel dan menyebabkan genom virus menjadi rusak (Crotty *et al.* 2000). Sistem kerja ribavirin yang demikian dilaporkan dapat menekan infeksi virus pada tanaman (Quecini *et al.* 2008).

Konsentrasi ribavirin yang digunakan pada percobaan ini juga diperkirakan masih rendah sehingga tidak mampu mengeliminasi virus secara total. Persentase eliminasi virus dapat ditingkatkan dengan menaikkan konsentrasi ribavirin (Hu *et al.* 2012; Oana *et al.* 2009) dan memperlama periode kemoterapi,

namun tingkat efektivitasnya bergantung pada genotipe tanaman (Hauptmanová & Polák 2011). Efisiensi eradikasi virus juga dapat didukung dengan aplikasi termoterapi yang dilakukan secara *in vitro* (Hu et al. 2012) maupun *in vivo* (Pramesh & Baranwal 2015). Selain itu, eliminasi virus juga bisa diterapkan dengan menggunakan kombinasi metode yang dilaksanakan dalam dua tahapan. Tahapan pertama berupa perlakuan kemoterapi pada eksplan dan tahapan kedua dilanjutkan dengan isolasi bagian meristem (Budiarto et al. 2011).

Ukuran eksplan merupakan faktor penting yang dapat memengaruhi efektivitas eliminasi virus. Oana et al. (2009) melaporkan bahwa persentase eliminasi virus mengalami peningkatan dengan mengkulturkan eksplan meristem apikal maupun meristem yang disertai satu primordia daun. Ashnayi et al. (2012) juga menyatakan bahwa pada umumnya eksplan yang berukuran besar telah terinfeksi virus.

KESIMPULAN DAN SARAN

Peningkatan konsentrasi ribavirin secara nyata menekan pertumbuhan tinggi tunas cv. Bima Brebes, serta waktu muncul daun, tinggi tunas, dan jumlah daun cv. Tiron.

Ukuran *shoot tip* yang lebih besar (2,1–3,0 mm) meningkatkan persentase tumbuh eksplan dan mempercepat waktu muncul daun pada cv. Bima Brebes dan Tiron.

Konsentrasi ribavirin yang diaplikasikan pada dua ukuran *shoot tip* masih belum dapat mengeliminasi virus OYDV pada cv. Bima Brebes maupun Tiron.

RT-PCR merupakan metode yang umum digunakan dalam pendeteksian virus karena menggunakan spesifik primer dan lebih sensitif dibandingkan dengan metode serologi. Penelitian ini menggunakan sampel daun yang dikompositkan dari beberapa tanaman sehingga dikhawatirkan hasil deteksi menjadi kurang akurat apabila di antara tanaman yang dikompositkan terdapat sampel yang bebas dari infeksi virus. Oleh karena itu, pendeteksian virus sebaiknya menggunakan sampel daun yang dikoleksi dari masing-masing individu tanaman.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Virologi Tumbuhan (Institut Pertanian Bogor) dan Sari Nurulita, M. Si yang telah banyak membantu dan mendukung pendeteksian virus. Penulis

juga mengucapkan terima kasih kepada Laboratorium Pemuliaan Tanaman (Institut Pertanian Bogor) atas izin penggunaan kotak kaca bebas serangga.

DAFTAR PUSTAKA

1. Andriani, M, Ermavitalini, D & Nurmalasari 2013, 'Eliminasi sugarcane mosaic virus melalui kemoterapi pada tebu (*Saccharum officinarum*) varietas NXI-2T secara *in vitro*', *J. Sains & Seni Pomitis*, vol. 2, no. 2, pp. 2337–3520.
2. Ashnayi, M, Kharrazi, M, Sharifi, A & Mehrvar, M 2012, 'Carnation etched ring virus elimination through shoot tip culture', *J. Biol. Environ. Sci.*, vol. 6, no. 17, pp. 175–180.
3. Badan Pusat Statistik 2016, *Produksi tanaman sayuran*, diunduh 6 Juni 2016, <<http://www.bps.go.id>>.
4. Brewster, JL 2008, *Onions and other vegetable Alliums*, 2nd ed., CABI, King's Lynn.
5. Budiarto, K, Marwoto, B, Sanjaya, L, Soedarjo, M & Rahardjo, I 2011, 'Elimination of CVB (*Chrysanthemum virus B*) from a range of *Chrysanthemum* varieties by apical meristem culture following antiviral agent and heat treatments', *Biotropia*, vol. 18, no. 2, pp. 94–101.
6. Crotty, S, Maag, D, Arnold, J, Zhong, W, Lau, J, Hong, Z, Andino, R & Cameron, C 2000, 'The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen', *Nature Medicine*, vol. 6, no. 12, pp. 1375–1379.
7. Dinarti, D 2012, 'Perbanyakan dan induksi umbi lapis mikro bawang merah secara *in vitro*', Disertasi, Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
8. Doyle, J & Doyle, J 1987, 'A rapid DNA isolation of procedure for small quantities of fresh leaf tissue', *Phytochem Bull.*, vol. 19, pp. 11–19.
9. Fletcher, P, Fletcher, J & Lewthwaite, S 1998, 'In vitro elimination of Onion yellow dwarf and Shallot latent viruses in shallots (*Allium cepa* var. *ascalonicum* L.)', *New Zealand J. Crop. and Hort. Sci.*, vol. 26, pp. 23–26.
10. Gunaeni, N, Wulandari, A, Duriat, A & Muharam, A 2011, 'Penyakit tular virus umbi pada tigabelas varietas bawang merah asal Jawa Barat dan Jawa Tengah', *J. Hort.*, vol. 21, no. 2, pp. 164–172.
11. Hauptmanová, A & Polák, J 2011, 'The elimination of plum pox virus in plum cv. Bluefree and apricot cv. Hanita by chemotherapy of in vitro cultures', *Hort. Sci. (Prague)*, vol. 2, pp. 49–53.
12. Hu, GJ, Hong, N, Wang, L, Hu, H & Wang, GP 2012, 'Efficacy of virus elimination from in vitro-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy', *Crop Protection*, vol. 37, pp. 20–25.
13. Klein, R & Livingston, C 1983, 'Eradication of viruses x and s from potato shoot-tip cultures with ribavirin', *Phytopathology*, vol. 73, pp. 1049–1050.
14. Mahmoud, SYM, Maatty, SAAE, El-Borollosy, A & Abdel-Ghaffar, M 2007, 'Identification of onion yellow dwarf potyvirus as one of the major viruses infecting garlic in Egypt', *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, vol. 2, no. 6, pp. 746–755.
15. Neelamathi, D, Manuel, J & George, P 2014, 'Influence of apical meristem and chemotherapy on production free sugarcane plants', *Res. J. Recent Sci.*, vol. 3, no. (ISC-2013), pp. 305–309.

16. Oana, D, Erdei, L, Livia, V, Danci, M, Anca, B, David, I & Berbentea, F 2009, 'Influence of ribavirin on potato plants regeneraion and virus eradication', *J. Hort. Forestry and Biotech*, vol. 13, pp. 421–425.
17. Parker, W 2005, 'Metabolism and antiviral activity of ribavirin', *Virus Research*, vol. 107, pp. 165–171.
18. Pramesh, D & Baranwal, VK 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*, vol. 90, no. 2. pp. 180-186.
19. Quecini, V, Lopes, M, Pacheco, F & Ongarelli, M 2008, 'Ribavirin, a guanosine analogue mammalian antiviral agent, impairs Tomato spotted wilt virus multiplication in tobacco cell cultures', *Archives of Phytopath. and Plant Protection*, vol. 41, no. 1, pp. 1–13.
20. Sastry, K & Zitter, T 2014, 'Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics', In: Sastry KS, Zitter TA, Plant virus and viroid diseases in the tropics', *Epidemiology and Management, Springer*, vol. 2, pp. 149–480.
21. Streeter, D, Witkowski, J, Khare, G, Sidwell, R, Bauer, R, Robinson, R & Simon, L 1973, 'Mechanism of action of 1-β-d-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad-spectrum antiviral agent', in *Proc. Nat. Acad Sci, USA*, pp. 1174–1178.
22. Swari, F, Subandiyah, S & Hartono, S 2015, 'Deteksi dan identifikasi virus-virus yang menginfeksi bawang merah di Kabupaten Bantul, Yogyakarta', *Pros. Sem. Nas. Masy. Biodiv. Indon.*, vol. 1, no. 5, pp. 961–968.
23. Taşkin, H, Bakteşmur, G, Kurul, M & Büyükalaca, S 2013, 'Use of tissue culture techniques for producing virus-free plant in garlic and their identification through real-time PCR', *The Scientific World Journal. Hindawi*, vol. 2013, pp. 1–5.
24. Verma, N, Ram, R & Zaidi, A 2005, 'In vitro production of prunus necrotic ringspot virus-free begonians through chemo- and thermotherapy', *Scientia Hort.*, vol. 103, pp. 239–247.
25. Wu, J, Lin, C & Hong, Z 2003, 'Ribavirin, viramidine and adenosine-deaminase-catalysed drug activation: implication for nucleoside prodrug design', *J. Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 52, pp. 543–546.
26. Wu, Z, Chen, L & Long, Y 2009, 'Analysis of ultra structure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots', *In vitro cell. Dev. Biol. -plant.*, vol. 45, pp. 483–490.
27. Wulandari, A 2016, 'Deteksi dan eliminasi virus pada umbi bawang merah', Tesis, Institut Pertanian, Bogor.