

## ELIMINASI *Potyvirus* PENYEBAB PENYAKIT MOSAIK PADA TANAMAN NILAM DENGAN KULTUR MERISTEM APIKAL DAN PERLAKUAN AIR PANAS PADA SETEK BATANG

### *Elimination of Potyvirus Causing Mosaic Diseases in Patchouli Plant Using Apical Meristem Culture and Hot Water Treatment on Stem Cutting*

RITA NOVERIZA<sup>1)</sup>, GEDE SUASTIKA<sup>2)</sup>, SRI HENDRASTUTI HIDAYAT<sup>2)</sup>, dan UTOMO KARTOSUWONDO<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat  
Jalan Tentara Pelajar No. 3, Bogor 16111

<sup>2)</sup> Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor  
Jalan Kamper, Kampus Dramaga, Bogor 16680  
e-mail: [rita\\_noveriza2000@yahoo.com](mailto:rita_noveriza2000@yahoo.com); [gedesuast@yahoo.com](mailto:gedesuast@yahoo.com)

(Diterima Tgl. 7 - 7 - 2011 - Disetujui Tgl. 2 - 7 - 2012)

#### ABSTRAK

Minyak nilam merupakan salah satu bahan baku parfum multifungsi yang bernilai tinggi. Budidaya dan pengembangan tanaman nilam terkendala oleh serangan *Potyvirus* yang menyebabkan penyakit mosaik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan benih nilam bebas virus dengan metode kultur meristem apikal dan perlakuan air panas pada setek batang. Penelitian dilaksanakan mulai Januari sampai Desember 2010 di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor dan Rumah Kasa Hama dan Penyakit, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) di Bogor. Bahan tanaman yang digunakan adalah tiga varietas nilam (Sidikalang, Lhokseumawe, Tapak Tuan). Penelitian terdiri atas (1) Eliminasi *Potyvirus* pada tanaman nilam menggunakan kultur meristem apikal dan (2) Eliminasi *Potyvirus* pada setek batang nilam dengan perlakuan air panas. Percobaan pertama disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan perlakuan 3 varietas nilam dan 2 tipe eksplan (meristem apikal dan batang terminal), dan diulang 10 kali. Parameter yang diamati adalah persentase pertumbuhan, waktu inisiasi, tinggi, dan warna tunas, serta persentase tanaman yang terinfeksi *Potyvirus*. Percobaan kedua menggunakan air panas pada tiga tingkatan suhu (50, 55, dan 60°C) dan tingkatan waktu perendaman (10, 20, dan 30 menit). Percobaan disusun menggunakan rancangan acak lengkap dengan 10 perlakuan dan 10 ulangan. Tanaman nilam dipelihara selama 8 minggu dan dilakukan pengamatan tinggi setek yang tumbuh dan daun yang bergejala mosaik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tanaman nilam, yang diperbanyak dari kultur meristem apikal ukuran 0,5-1 mm, menghasilkan 33,3-99,9% tanaman bebas virus. Perendaman setek batang nilam di dalam air panas pada suhu 50-60°C selama 10-30 menit tidak dapat mengeliminasi *Potyvirus* yang menginfeksi ketiga varietas nilam yang diuji. Setek batang nilam varietas Tapak Tuan dan Lhokseumawe lebih toleran terhadap air panas dibandingkan Sidikalang tetapi daya tumbuhnya semakin menurun seiring semakin lama waktu perendaman. Teknik kultur meristem apikal berpotensi untuk menghasilkan setek nilam yang bebas virus.

Kata kunci : kultur meristem apikal, perlakuan air panas, *Pogostemon cablin*, *Potyvirus*

#### ABSTRACT

Patchouli oil produced by patchouli plant is one of multifunctioning perfume's raw materials and has high economic value. One important constraint during its cultivation is infection by *Potyvirus* causing serious mosaic disease. This study was conducted to develop a technique to produce virus-free cutting seeds using apical meristem culture and hot

water treatment on stem cutting. The study was carried out from January to December 2010 in Plant Virology Laboratory of Bogor Agricultural University and Pest and Diseases screen house of Indonesian Medicinal and Aromatic Crops Research Institute (Balitro) in Bogor. Three varieties of patchouli plant, i.e. Sidikalang, Lhokseumawe, and Tapak Tuan, were used in this study. The study consisted of (1) Elimination *Potyvirus* in cuttings of patchouli through apical meristem culture and (2) Elimination *Potyvirus* in stem cuttings of patchouli with hot water treatment. The first experiment was arranged using completely randomized design with treatments of three patchouli varieties and two explant types (apical meristem and stem terminal), and it was replicated 10 times. Parameters observed were bud growth percentage, initiation time, height, and color, and also percentage of plant infected by *Potyvirus*. The second experiment applied hot water at three temperature levels (50, 55, and 60°C) and submersion periods (10, 20, and 30 minutes). It was arranged using randomized complete design, consisting of 10 treatments with 10 plants for each treatment. The patchouli plants were maintained for 8 weeks and observations were made for height of growing cuttings and leaves with mosaic symptoms. The results showed that the patchouli plants propagated from apical meristem culture of 0.5-1 mm in sizes yielded 33.3-99.9% virus-free plants. Submersion of patchouli stem cutting seeds in hot water of 50-60°C and soaking period of 10-30 minutes could not eliminated the infecting *Potyvirus* on patchouli the three tested varieties. Cutting seeds of Lhokseumawe and Tapak Tuan varieties were more tolerant to hot water than Sidikalang one. However, their ability to grow decreased in line with longer submersion time period. Apical meristem culture technique is potential to produce virus-free cutting seeds of patchouli.

Key words: apical meristem culture, hot water treatment, *Pogostemon cablin*, *Potyvirus*

#### PENDAHULUAN

Tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) telah dilaporkan dapat terinfeksi oleh beberapa jenis virus yaitu *Patchouli mosaic virus* (PaMV), *Tobacco necrosis virus* (TNV), *Patchouli mild mosaic virus* (PaMMV), *Patchouli mottle virus* (PaMoV), *Patchouli virus X* (PatVX), dan *Peanut stripe virus* (PStV) (NATSUAKI *et al.*, 1994; FILHO *et al.*, 2002; HARTONO, 2008; SINGH *et al.*, 2009). Di India, serangan virus pada tanaman nilam mencapai 76% (SASTRY

dan VASANTHAKUMAR, 1981). Tiga varietas nilam yaitu Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan dilaporkan juga telah terinfeksi oleh *Potyvirus* yang menginduksi gejala mosaik yaitu *Telosma mosaic virus* (TeMV) (NOVERIZA *et al.*, 2012a).

*Potyvirus* adalah kelompok virus yang secara alami dapat ditularkan dan disebarakan oleh kutu daun (HAMPTON *et al.*, 2005). Namun demikian, cara penyebaran utama *Potyvirus* yang terjadi di lapangan adalah melalui bahan tanaman yang terinfeksi. Hal ini menyebabkan tingginya serangan penyakit mosaik pada tanaman nilam di daerah-daerah sentra produksi nilam di Indonesia (HARTONO dan SUBANDIYAH, 2006; NOVERIZA *et al.*, 2012a) sehingga penggunaan benih yang sehat menjadi sangat penting dalam pengendalian virus pada tanaman nilam. Bila menggunakan bahan tanaman yang bebas dari infeksi virus sebagai sumber benih, diharapkan tanaman yang dibudidayakan dapat berproduksi sesuai potensi genetiknya. Untuk mendapatkan tanaman benih bebas virus perlu dilakukan usaha eliminasi virus dari tanaman terinfeksi. Pada berbagai jenis tanaman dilaporkan telah berhasil dilakukan eliminasi virus melalui beberapa metode, di antaranya kultur meristem (SINGH *et al.*, 2009), perlakuan pemanasan (DAMAYANTI *et al.*, 2010), dan penggunaan antiviral sintetis (BUDIARTO *et al.*, 2008).

Bagian jaringan yang belum terinfeksi patogen, yaitu bagian apikal, dipilih dan ditumbuhkan menjadi tanaman lengkap yang sehat dalam media buatan pada metode kultur meristem. Teknik tersebut sudah berhasil diterapkan pada tanaman ubi jalar (BARAHIMA, 2003) dan *Impatiens hawkerii* (MILOSEVIC *et al.*, 2011) untuk mengeliminasi virus. Meristem apikal yang masih bebas patogen umumnya berukuran sangat kecil untuk beberapa jenis tanaman sehingga teknik kultur meristem merupakan teknik yang relatif sulit dilakukan. Upaya mengatasi hal tersebut dilakukan oleh GUNAENI dan KARJADI (2008) dengan menggabungkan teknik kultur meristem apikal dan penambahan bahan antivirus yaitu ribavirin (5 mg/l) dan berhasil mengeliminasi *Potato leaf roll virus* (PLRV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), dan *Potato virus S* (PVS) dari tanaman kentang terinfeksi.

Teknik eliminasi virus lain, yang relatif lebih mudah dan murah dilakukan dibandingkan dengan teknik kultur meristem apikal, adalah dengan perlakuan pemanasan. Metode pemanasan untuk tujuan eliminasi virus dapat diterapkan berdasarkan fakta bahwa multiplikasi virus sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan terutama suhu yang tinggi. Beberapa hasil penelitian menemukan bahwa laju multiplikasi virus mengalami penurunan pada kisaran suhu 32°C seperti *Plum pox virus* (GLASA *et al.*, 2003). Namun demikian, toleransi jaringan tanaman terhadap suhu tinggi akan menjadi faktor pembatas dalam aplikasi metode ini. Persentase tanaman hidup pasca terapi umumnya semakin kecil seiring dengan meningkatnya suhu pemanasan (LOZOYA-SALDANA dan MERLIN-LARA, 1984).

Namun, optimalisasi waktu, suhu, atau perendaman bisa membuat perlakuan air panas (*hot water treatment*/HWT) berguna untuk menghilangkan virus terutama untuk tanaman tahunan atau tanaman dengan perbanyak vegetatif seperti tebu dan krisan (DAMAYANTI *et al.*, 2010). Hasil pengujian pendahuluan menggunakan tanaman nilam varietas Sidikalang menunjukkan bahwa setek batang nilam masih dapat tumbuh setelah direndam dalam air bersuhu di atas 50°C tetapi tidak untuk setek pucuk (data tidak dipublikasikan).

Penelitian bertujuan untuk mendapat benih nilam bebas virus dengan metode kultur meristem apikal dan perlakuan air panas/HWT pada setek batang.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan mulai Januari sampai Desember 2010 di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Institut Pertanian Bogor dan Rumah Kasa Kelompok Peneliti Hama dan Penyakit, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik di Bogor. Penelitian terdiri atas dua kegiatan yaitu (1) Eliminasi *Potyvirus* pada tanaman nilam dengan kultur meristem apikal dan (2) Eliminasi *Potyvirus* pada setek batang nilam dengan HWT.

### Eliminasi *Potyvirus* pada Tanaman Nilam dengan Kultur Meristem Apikal

Eksplan yang digunakan adalah pucuk tanaman nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan yang terinfeksi *Potyvirus* berdasarkan adanya gejala mosaik pada daun nilam. Potongan pucuk meristem apikal nilam berukuran 3-5 mm dibersihkan berturut-turut dengan air mengalir (30 menit), air sabun (10 menit), larutan fungisida (30 menit), dan beberapa kali dengan akuades. Sterilisasi permukaan dilakukan dengan merendam pucuk apikal tersebut berturut-turut dalam larutan 70% etanol selama 3 menit, 0,2% HgCl selama 1 menit, 1% sodium hipoklorida selama 1 menit, dan dibilas dengan akuades steril.

### Kultur meristem apikal secara *in vitro*

Meristem apikal dikulturkan berdasarkan metode SUGIMURA *et al.* (1995). Isolasi meristem dilakukan secara aseptik di bawah mikroskop untuk memotong eksplan dengan ukuran 0,5-1 mm. Regenerasi plantlet dari meristem apikal secara *in vitro* dilakukan dengan beberapa tahapan. Inisiasi pucuk dilakukan dengan menginkubasi eksplan pada media MS yang ditambahkan *6-benzylaminopurine* (BAP) 0,5 mg/l selama 4 minggu (HADIPOENTYANTI *et al.*, 2007). Tahapan proliferasi pucuk dilakukan dengan memindahkan kultur pada media MS yang ditambahkan BAP 0,5 mg/l kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama

8-10 minggu di bawah cahaya (1.000-1.500 lux) secara terus-menerus. Bahan yang digunakan dalam perlakuan adalah 3 varietas nilam (Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan) dan 2 tipe eksplan (meristem apikal dan batang terminal). Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 6 perlakuan dan masing-masing perlakuan diulang 10 kali. Parameter yang diamati adalah persentase pertumbuhan, waktu inisiasi, tinggi, dan warna tunas, serta persentase tanaman yang terinfeksi *Potyvirus*. Untuk pertumbuhan akar, kultur dipindahkan pada media MS tanpa zat pengatur tumbuh dan diinkubasi selama 3 minggu di bawah cahaya (1.000-1.500 lux) terus-menerus. Plantlet yang dihasilkan diaklimatisasi dalam pot yang berisi campuran sekam dan kompos (1:1) yang sudah disterilkan dan diinkubasi pada ruangan dengan kelembapan tinggi selama 3 minggu kemudian dipindahkan ke polibag selama 2 bulan. Tanaman nilam hasil kultur jaringan dikonfirmasi bebas *Potyvirus* dengan uji serologi *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

#### **Verifikasi infeksi Potyvirus pada tanaman nilam hasil kultur jaringan**

Deteksi *Potyvirus* pada sampel daun dari tanaman nilam hasil kultur jaringan dilakukan dengan *Indirect-ELISA* menggunakan antiserum *Potyvirus* mengikuti metode DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*) (CLARK dan ADAMS, 1977). Pertama-tama, cairan ekstrak tanaman sakit disiapkan dengan menggerus daun nilam 0,2 g dalam *buffer coating* 1 ml yang mengandung M DIECA 0,05. Sebanyak 100 µl cairan ekstrak diisikan pada lubang plat mikrotiter dan diinkubasi pada suhu 4°C selama semalam. Setelah dicuci dengan PBS-T (bufer fosfat ditambah Tween-20) sebanyak 5 kali, lubang plat selanjutnya diisi dengan larutan 2% skim milk 100 µl dalam PBS-T dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Selanjutnya lubang plat mikrotiter diisi antiserum *Potyvirus* (DSMZ) 100 µl, dengan pengenceran 1/1.000 dalam bufer konjugat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-4 jam. Setelah dicuci dengan PBS-T, lubang plat diisi konjugat RaM-AP 100 µl yang diencerkan 1/1.000 dalam bufer konjugat, dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Setelah dicuci dengan PBS-T, lubang plat diisi substrat p-nitrophenyl fosfat dan diinkubasi selama 30-60 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, hasil ELISA diukur nilai absorbansinya menggunakan *micro-plate reader* pada panjang gelombang 405 nm.

#### **Eliminasi Potyvirus pada Setek Batang Nilam dengan HWT**

Penelitian menggunakan setek batang nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan yang terinfeksi *Potyvirus* (diverifikasi dengan ELISA), diambil dari Kebun

Cimanggu-Bogor, berukuran ± 10 cm (1 buku) dan diameter batang ± 0,4 cm.

Perlakuan air panas (HWT) diuji dengan cara merendam setek nilam di dalam air panas pada 3 tingkatan suhu (50, 55, dan 60°C) dan 3 tingkatan waktu perendaman (10, 20, dan 30 menit). Setek batang tanaman sakit tanpa HWT digunakan sebagai pembanding.

Setelah perlakuan, setek ditanam di dalam polibag yang berisi campuran media tanah dan pupuk kandang dengan perbandingan 2:1. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 10 perlakuan. Masing-masing perlakuan terdiri dari 10 tanaman. Tanaman nilam tersebut dipelihara selama 8 minggu. Pengamatan terhadap pertumbuhan tinggi setek dan daun yang bergejala mosaik dilakukan setiap minggu. Keberadaan *potyvirus* dalam tanaman yang tidak bergejala mosaik dikonfirmasi dengan uji serologi menggunakan teknik *Indirect ELISA* seperti diuraikan sebelumnya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### **Eliminasi Potyvirus pada Tanaman Nilam dengan Kultur Meristem Apikal**

Kultur meristem apikal tanaman nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan berhasil dilakukan pada media MS yang ditambah BAP 0,5 mg/l. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian HADIPOENTYANTI *et al.* (2008), yang melaporkan bahwa media MS dengan penambahan BAP 0,5 mg/l merupakan media terbaik untuk induksi tunas nilam. Dengan media ini, sekitar 40 tunas berwarna hijau dapat terinduksi dalam waktu 21 hari. Menurut TJANDRA (2000), BAP merupakan zat pengatur tumbuh sitokinin yang mempengaruhi proses proliferasi tunas dan pemecahan dormansi, serta meningkatkan pembelahan sel, tetapi menghambat pembentukan akar.

Keberhasilan pertumbuhan tunas kultur meristem apikal yang tertinggi terjadi pada varietas Tapak Tuan (90%), diikuti berturut-turut oleh varietas Sidikalang (71,43%) dan Lhokseumawe (69,23%). Demikian pula, periode inisiasi tunas tercepat terjadi pada varietas Tapak Tuan (14 hari), diikuti berturut-turut oleh varietas Lhokseumawe (17 hari) dan Sidikalang (21 hari). Berdasarkan pengukuran tinggi tunas, terjadi perbedaan yang nyata antara varietas Tapak Tuan dengan kedua varietas lainnya (Tabel 1). Secara visual, pertumbuhan tunas dari eksplan meristem apikal pada varietas Tapak Tuan terlihat lebih cepat dan lebih baik dibandingkan kedua varietas lainnya (Gambar 1). NURYANI *et al.* (2003) dan NURYANI (2005) melaporkan bahwa pertumbuhan dan produktivitas tanaman nilam varietas Tapak Tuan di lapangan lebih tinggi bila dibandingkan dengan varietas Lhokseumawe dan Sidikalang. Selain itu, ketiga varietas tersebut mempunyai keunggulan yang berbeda-beda, yaitu varietas Tapak Tuan

unggul dalam hal produksi dan kadar *patchouli* alkohol, Lhokseumawe mengandung kadar minyak tinggi, dan Sidikalang toleran terhadap penyakit layu bakteri dan nematoda.

Hasil yang berbeda diperoleh bila jenis eksplan yang digunakan berasal dari batang terminal (bukan meristem apikal). Pertumbuhan tunas hanya terjadi pada varietas Sidikalang sedangkan kedua varietas lainnya tidak tumbuh sama sekali (Tabel 1). Secara visual terlihat bahwa awalnya

jaringan eksplan menjadi berwarna coklat kemu-dian lama kelamaan membusuk dan akhirnya mati. Hal ini mengindikasikan bahwa kultur jaringan yang berasal dari batang terminal varietas Sidikalang lebih mudah tumbuh jika dibandingkan dengan kedua varietas lainnya.

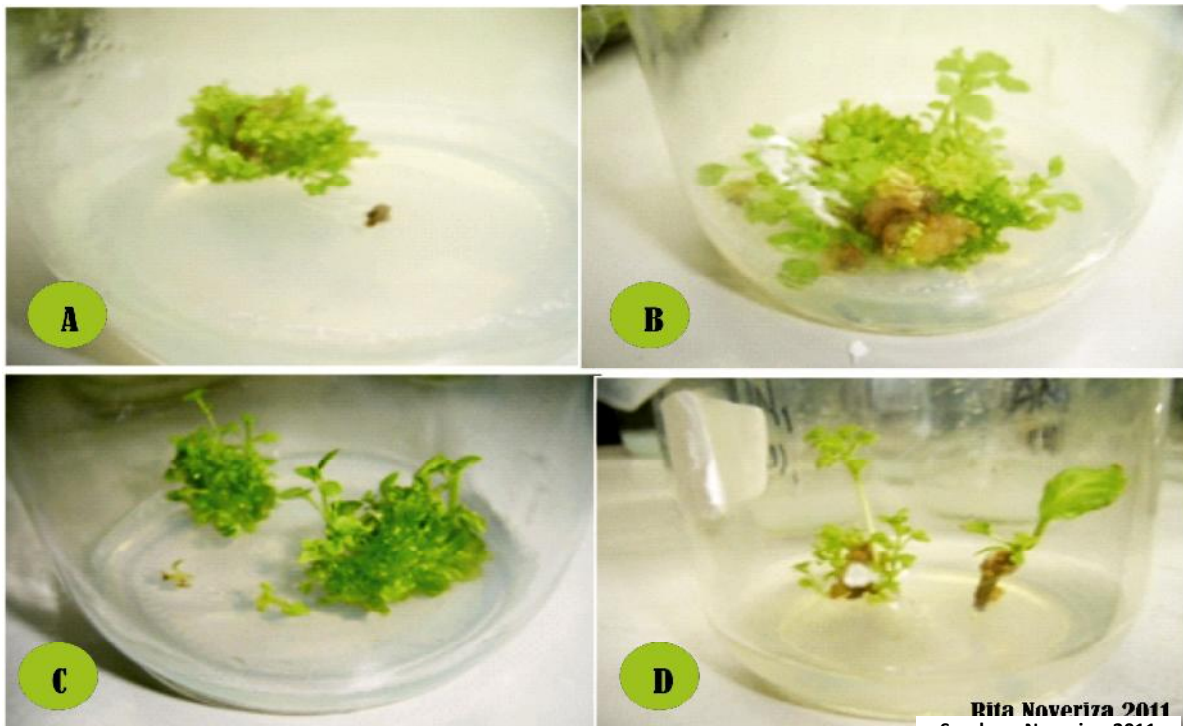
Tanaman nilam hasil kultur meristem apikal yang berukuran 0,5-1mm masih mengandung *Potyvirus* berkisar antara 9 sampai 66,7% (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa teknik tersebut masih perlu ditingkatkan dengan

Tabel 1. Persentase pertumbuhan, periode inisiasi, tinggi, dan warna tunas kultur meristem apikal dan batang terminal tiga varietas nilam (Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan) pada media MS yang ditambah BAP 0,5 mg/l

Table 1. Percentage of shoot growth, initiation period, height, and color of apical meristem and terminal stem culture of three varieties patchouli (Sidikalang, Lhokseumawe, Tapak Tuan) on MS medium with added BAP 0.5 mg/l

Jenis eksplan Type of explants	Varietas Varieties	Pertumbuhan tunas Shoot growth (%)	Periode inisiasi tunas Shoot initiation period (hari day)	Tinggi tunas Shoot height (cm)	Warna tunas Shoot color
Meristem apikal Apical meristem	Sidikalang	71,43 (10/14)*	21	0,52 c**	Hijau Green
	Lhokseumawe	69,23 (9/13)	17	0,91 c	Hijau Green
	Tapak Tuan	90,00 (18/20)	14	1,81 b	Hijau Green
Batang terminal Terminal stem	Sidikalang	15,38 (2/13)	21	2,90 a	Hijau Green
	Lhokseumawe	0,00 (0/10)	0	0 d	
	Tapak Tuan	0,00 (0/10)	0	0 d	

Keterangan : \* Rasio antara jumlah eksplan bertunas terhadap jumlah eksplan yang ditumbuhkan  
 Note : \* Ratio between number of explants with shoot growth and total number of grown explants  
 \*\* Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada DMRT 5%  
 \*\* Numbers followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% DMRT



Rita Noveriza 2011  
 Sumber : Noveriza, 2011

Gambar 1. Pertumbuhan tunas meristem apikal dan batang terminal nilam (9 minggu setelah transplantasi pada media MS yang ditambah BAP 0,5 mg/l) A. varietas Sidikalang, B. varietas Lhokseumawe, C. varietas Tapak Tuan, dan D. Kontrol (varietas Sidikalang yang berasal dari eksplan batang terminal)

Figure 1. Growth of apical meristem shoot and terminal stems of patchouli (9 weeks after transplantation on MS medium with added BAP 0.5 mg/l) A. Sidikalang variety, B. Lhokseumawe variety, C. Tapak Tuan variety, and D. Control (Sidikalang variety derived from stem explant terminal)

memperkecil ukuran eksplan meristem apikal untuk mendapatkan tanaman nilam hasil kultur meristem apikal yang 100% bebas virus. VISESSUWAN *et al.* (1988) menyatakan bahwa dengan ukuran meristem apikal tebu 0,2-0,5 mm diperoleh 88% tanaman bebas virus. Ukuran meristem apikal yang optimal dalam menghasilkan tanaman tebu bebas virus adalah 2 mm atau lebih besar dari 0,5 mm (RAMGAREEB *et al.*, 2010). LANGHANS *et al.* (1977) menyarankan bahwa ukuran eksplan meristem apikal 0,3-0,5 mm merupakan paling optimal dalam menghasilkan eksplan bebas virus pada tanaman krisan. SUGIMURA *et al.* (1995) mengemukakan bahwa untuk mendapatkan nilam bebas virus PaMMV adalah dengan ukuran meristem apikal yang optimum yaitu 0,5-1 mm, sedangkan menurut SINGH *et al.* (2009) jaringan meristem berukuran 0,2-0,5 mm adalah paling baik untuk menghasilkan tanaman nilam bebas PStV. Untuk melakukan teknik kultur meristem apikal tanaman nilam dengan ukuran yang lebih kecil dari 0,5 mm cukup sulit dan dapat mempengaruhi daya tumbuh plantlet yang dihasilkan. AHMED *et al.* (2012) melaporkan bahwa semakin kecil ukuran meristem apikal yang digunakan maka semakin kecil daya tumbuh plantlet tanaman anyelir yang dihasilkan. Persentase pertumbuhan plantlet anyelir yang dihasilkan adalah 20, 35, 65, dan 80% dengan ukuran meristem berturut-turut sebesar 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4 mm. Begitu juga dengan tanaman tebu yang ditumbuhkan dengan kultur meristem suhu 40°C. Ukuran meristem yang optimal merupakan kunci keberhasilan dalam menghasilkan tanaman yang bebas virus (RAMGAREEB *et al.*, 2010). Walaupun demikian, hasil kultur meristem apikal sebagai tanaman induk atau sumber benih sudah dapat dimanfaatkan untuk pengembangan tanaman nilam yang bebas virus. Tanaman nilam bebas virus yang sudah diperbanyak harusnya disimpan pada rumah kawat kedap serangga karena berdasarkan hasil penelitian NOVERIZA *et al.* (2012b) bahwa *Aphis gossypii* terbukti sangat efisien menularkan *Potyvirus* pada tanaman nilam secara non-persisten.

Tabel 2. Deteksi *Potyvirus* tanaman nilam hasil kultur meristem apikal dan batang terminal dengan metode ELISA

Table 2. Detection of *Potyvirus* on patchouli plant from culture of apical meristem and terminal stems using ELISA method

Jenis eksplan <i>Type of explants</i>	Varietas <i>Varieties</i>	Jumlah sampel yang diuji <i>Number of samples tested</i>	Hasil ELISA <i>ELISA result</i>	
			Reaksi positif <i>Positive reaction</i>	Reaksi negatif <i>Negative reaction</i>
Meristem apikal <i>Apical meristem</i>	Sidikalang	12	4 (33,3)*	8 (66,7)*
	Lhokseumawe	11	1 (9,0)	10 (99,9)
	Tapak Tuan	27	18 (66,7)	9 (33,3)
Batang terminal <i>Terminal stem</i>	Sidikalang	7	7 (100,0)	0 (0,0)
	Lhokseumawe	0	0	0
	Tapak Tuan	0	0	0

Keterangan: \* Rasio antara jumlah sampel yang positif/negatif dan jumlah sampel tanaman yang diuji dalam persen

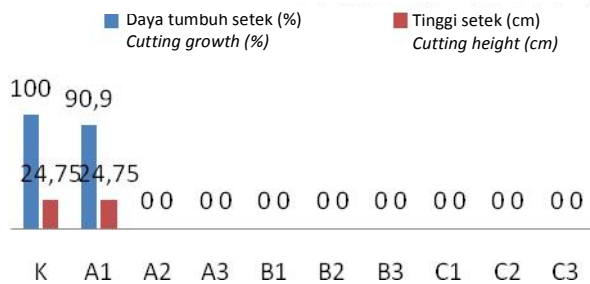
Note : \* Ratio between number of positive/negative samples and number of samples tested

Plantlet yang diperoleh dari eksplan batang terminal (bukan meristem apikal) menunjukkan gejala mosaik dan hasil ELISA membuktikan bahwa tanaman tersebut 100% terinfeksi *Potyvirus*. Hasil tersebut membuktikan bahwa infeksi *Potyvirus* pada tanaman nilam bersifat sistemik. Virus menyebar di dalam tanaman dari sel ke sel melalui plasmodesmata (jarak pendek) dan melalui jaringan pembuluh floem (jarak panjang). Pada tanaman yang rentan, virus akan sangat cepat menyebar dari jaringan yang terinfeksi ke seluruh bagian tanaman melalui floem. Penggunaan metode kultur meristem apikal sangat potensial sebagai upaya untuk mengeliminasi virus yang menginfeksi secara sistemik karena proliferasi sel-sel meristem apikal lebih cepat dibandingkan penyebaran virus. Selain itu, pada sel-sel meristem apikal belum ada plasmodesmata (NURHAJATI MATTJIK, komunikasi pribadi). Hal ini sesuai dengan pernyataan BARAHIMA (2003), regenerasi tunas meristem apikal menghasilkan plantlet bebas virus dapat terjadi karena proliferasi sel-sel meristem tunas apikal lebih cepat dibandingkan dengan penyebaran partikel virus sehingga setiap saat terdapat sel-sel yang belum terinfeksi virus. Plantlet yang dihasilkan dari sel-sel yang tidak terinfeksi virus menghasilkan plantlet bebas virus.

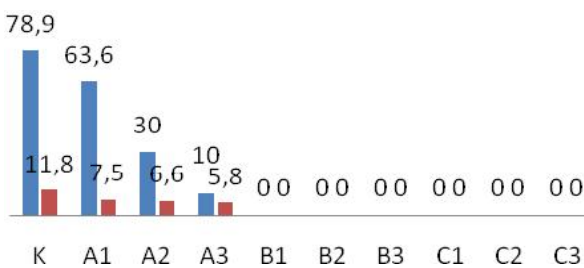
### Eliminasi *Potyvirus* pada Setek Batang Nilam dengan HWT

Pengujian pendahuluan menggunakan setek batang dan pucuk varietas Sidikalang dengan HWT menunjukkan bahwa setek batang tersebut masih dapat tumbuh setelah direndam pada suhu di atas 50°C tetapi setek pucuk tidak dapat tumbuh. Pada penelitian ini digunakan setek batang nilam yang memperlihatkan gejala mosaik yang disebabkan oleh *Potyvirus*. Dengan HWT pada tiga tingkatan suhu dan tingkatan waktu perendaman, terlihat bahwa setek batang nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan yang terinfeksi oleh *Potyvirus* dapat bertahan hidup setelah direndam dalam air panas pada suhu 50°C, namun tidak mampu bertahan hidup pada suhu yang lebih tinggi. Varietas Sidikalang tidak dapat tumbuh jika waktu perendaman lebih dari 10 menit, sedangkan kedua varietas lainnya masih dapat tumbuh setelah dilakukan perendaman pada suhu 50°C selama 20 dan 30 menit. Daya tumbuh setek nilam semakin menurun seiring dengan semakin lamanya waktu perendaman (Gambar 2). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan tingkat toleransi tanaman terhadap suhu tinggi. Dari ketiga varietas nilam yang diuji, Sidikalang mempunyai tingkat toleransi yang lebih rendah. SASTRY dan VASANTHAKUMAR (1981) menyatakan bahwa setek berakar (*rooted cutting*) nilam (*P. patchouli* Pellet) cultivar Malaysia masih dapat bertahan hidup pada HWT dengan suhu berkisar antara 40-45°C dan perlakuan udara panas 50°C. Menurut SUTRAWATI *et al.* (2010), derajat toleransi tanaman terhadap suhu tinggi merupakan faktor pembatas dalam aplikasi metode HWT.

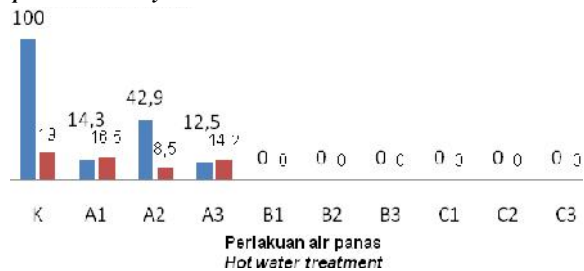
**Varietas Sidikalang**  
*Sidikalang variety*



**Varietas Lhokseumawe**  
*Lhokseumawe variety*



**Varietas Tapak Tuan**  
*Tapak Tuan variety*



Gambar 2. Daya tumbuh dan tinggi setek batang nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan setelah perlakuan perendaman air panas pada tiga tingkatan suhu

A = 50°C      B = 55°C      C = 60°C  
1 = 10 menit      2 = 20 menit      3 = 30 menit

Sebagai pembandingan adalah setek batang nilam tanpa perlakuan air panas (K). Pengukuran dilakukan 2 bulan setelah perlakuan air panas

Figure 2. Cutting growth and height of three patchouli varieties of Sidikalang, Lhokseumawe, and Tapak Tuan after hot water treatment (HWT) at three treatments levels

A = 50°C      B = 55°C      C = 60°C  
1 = 10 minutes      2 = 20 minutes      3 = 30 minutes

As control is stem cuttings of patchouli without hot water treatment (K). Measurements were taken 2 months after HWT

Meskipun demikian, HWT sudah lama digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman. Menurut COPEs dan BLYTHE (2009), perendaman setek batang azalea (*Rhododendron*) pada air panas suhu 50°C selama 21 menit efektif untuk mengeliminasi *Rhizoctonia* AG P (*anastomosis group P*). Selain itu, HWT pada suhu 50°C selama 30 menit efektif mengeliminasi cendawan patogen dan endofit pada jaringan setek anggur (CROUS *et al.*, 2001).

Pencucian dengan larutan klorin dan HWT suhu 45°C selama 8 menit dapat mempertahankan kualitas buah anggur selama 4 minggu (KOU *et al.*, 2009). Berdasarkan hasil penelitian SUTRAWATI *et al.* (2010), HWT pada suhu 58°C selama 40 menit dapat menonaktifkan *Pineapple mealybug wilt-associated virus* yang menginfeksi tanaman nanas. Daya tumbuh setek daun dan batang nanas masih tetap dapat dipertahankan 60%.

Perlakuan perendaman setek batang nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan, yang terinfeksi oleh *Potyvirus* pada suhu 50°C selama 10 menit, belum mampu mengeliminasi virus, tetapi dapat mempertahankan daya tumbuh (viabilitas) setek nilam 63,6-90,9%. Hal tersebut ditunjukkan dengan munculnya gejala mosaik pada daun setek batang nilam sampai tanaman berumur 2 bulan setelah persemaian. Munculnya gejala mosaik lebih lama dibandingkan setek batang pada tanpa HWT. Hal ini menunjukkan bahwa HWT mampu memperlambat munculnya gejala mosaik pada tanaman nilam. Jadi, kemungkinan titik inaktivasi *Potyvirus* nilam lebih tinggi dari suhu 50°C. Hal ini sesuai dengan penelitian DAMAYANTI *et al.* (2010), titik inaktivasi suhu untuk *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV) adalah antara 55 sampai 60°C dan lebih tinggi dari titik suhu kematian tanaman tebu. Semua perlakuan panas tidak sepenuhnya menghilangkan SCSMV, namun HWT pada suhu 53°C selama 10 menit secara drastis mengurangi keparahan penyakit dan tetap menjaga viabilitas tanaman 100%. Panas juga bisa menyebabkan inaktivasi virus pada awal fase yang mengakibatkan penurunan titer *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). HWT pada suhu 55°C dengan lama waktu perendaman antara 20 sampai 30 menit merupakan perlakuan terbaik untuk mendapatkan sumber kultur meristem dengan keparahan terendah. Jadi, penurunan awal titer virus dapat dimanfaatkan untuk mendapatkan tanaman bebas virus dengan kultur meristem (BALAMURALIKHRISHNAN *et al.*, 2003).

Selain itu, HWT juga telah lama digunakan untuk mendapatkan tanaman hasil propagasi yang bebas penyakit. KIM *et al.* (2003) melaporkan bahwa HWT pada 75°C selama 72 jam dan pada 85°C selama 24 jam mampu menonaktifkan *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) pada biji mentimun. Kombinasi antara teknik kultur jaringan dan kemoterapi dengan HWT terbukti efektif mengeliminasi hampir semua patogen. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa teknik perbanyakan nilam menggunakan eksplan meristem apikal dapat dijadikan sebagai metode standar untuk menghasilkan bibit nilam bebas virus.

KESIMPULAN

Kultur meristem apikal ketiga tanaman nilam varietas Sidikalang, Lhokseumawe, dan Tapak Tuan berhasil

dilakukan pada media MS yang ditambah BAP 0,5 mg/l. Tanaman nilam yang diperbanyak dari kultur meristem apikal menghasilkan 33,3-99,9% tanaman bebas virus dengan ukuran meristem apikal 0,5-1 mm. Perendaman setek batang nilam menggunakan air panas pada suhu 50-60°C dan lama waktu perendaman 10-30 menit tidak dapat mengeliminasi *Potyvirus* yang menginfeksi ketiga varietas nilam yang diuji. Setek nilam varietas Tapak Tuan dan Lhokseumawe lebih toleran terhadap air panas dibandingkan Sidikalang, tetapi daya tumbuhnya semakin menurun seiring waktu perendaman. Hasil ini mengindikasikan bahwa teknik kultur meristem apikal berpotensi untuk menghasilkan setek nilam yang bebas virus.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Kepala Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (Balitro) Bogor, yang telah memberikan kesempatan untuk mendapatkan bantuan dana penelitian dari APBN Balitro tahun 2010. Selanjutnya, penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada Deni, Jose, Ibu Amalia, dan Bapak Yanto yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- AHMED, A.A., E.A.H. KHATAB, R.A. DAWOOD, and A.M. ISMEIL. 2012. Evaluation of tip culture and thermotherapy for elimination of *Carnation latent virus* (CLV) and *Carnation vein mottle virus* (CVMV) from carnation plants. *International J. Virol.* 8(2): 234-239.
- BALAMURALIKHRISHNAN, M., S. DORAISAMY, T. GANAPATHY, and R. VISWANATHAN. 2003. Impact of serial thermotherapy on *Sugarcane mosaic virus* and regeneration in sugarcane. *Arch. Phytopathol. and Plant Protect.* 36: 173-178.
- BARAHIMA, W.P. 2003. Eliminasi *Sweet Potato Feathery Mottle Virus* (SPFMV) pada empat kultivar ubi jalar unggul lokal asal Papua melalui teknik kultur meristem. *Bul. Agron.* 31(3): 81-88.
- BUDIARTO, K., Y. SULYO, I.B. RAHARDJO, dan S. PRAMANIK. 2008. Pengaruh durasi pemanasan terhadap keberadaan *Chrysanthemum Virus-B* pada tiga varietas Krisan terinfeksi. *J. Hort.* 18(2): 185-192.
- CLARK, M.F. and A.N. ADAMS. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology.* 34: 475-483.
- COPEs, W.E. and E.K. BLYTHE. 2009. Chemical and hot water treatments to control *Rhizoctonia* AG P infesting stem cuttings of azalea. *HortScience.* 44(5): 1370-1376.
- CROUS, P.W., L. SWART, and S. COERTZE. 2001. The effect of hot water treatment on fungi occurring in apparently healthy grapevine cuttings. *Phytopathol. Mediterr.* 40(S): 464-466.
- DAMAYANTI, T.A., L.K. PUTRA, and GIYANTO. 2010. Hot water treatment of cutting cane infected with *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). *J. ISSAAS* 16(2): 17-25.
- FILHO, M.P.E., R. de O. RESENDE, M.I. LIMA, and E.W. KITAJIMA. 2002. Patchouli virus X, a new potexvirus from *Pogostemon cablin*. *Ann. Appl. Biol.* 141: 267-274.
- GLASA, M., G. LABONNE, and J.B. QUIOT. 2003. Effect of temperature on *Plum pox virus* infection. *Acta Virol.* 47(1): 49-52.
- GUNAENI, N. dan A.K. KARJADI. 2008. Kultur meristem dan antiviral ribavirin pada tanaman kentang. *J. Agrivigor.* 7(2): 105-112.
- HADIPOENTYANTI, E., AMALIA, and N. SIRAIT 2007. Effect of growth regulator 2,4 D and BAP to in vitro callus and shoots induce on patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) var. Sidikalang. p. 78-86. *Proceeding International Seminar on Essential Oil.* Jakarta.
- HADIPOENTYANTI, E., AMALIA, N. SIRAIT, S.Y. HARTATI, dan S. SUHESTI. 2008. Perakitan varietas tahan nilam terhadap penyakit layu bakteri. Hlm.17-29. *Prosiding Konferensi Minyak Atsiri.* Surabaya.
- HAMPTON, R.O., A. JENSEN, and G.T. HAGEL. 2005. Attributes of *Bean yellow mosaic potyvirus* transmission from clover to snap beans by four species of aphids (Homoptera: Aphididae). *J. Econ. Entomol.* 98(6): 1816-1823.
- HARTONO, S. dan S. SUBANDIYAH. 2006. Pemurnian dan deteksi serologi *Patchouli mottle virus* pada tanaman nilam. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia.* 12 (2): 74-82.
- HARTONO, S. 2008. Karakterisasi virus mottle pada tanaman nilam di Indonesia. *Prosiding Seminar Nasional Pengendalian Terpadu Organisme Pengganggu Tanaman Jahe dan Nilam, Bogor, 4 Nopember 2008.* (In press).
- KIM, S.M., S.H. NAM, J.M. LEE, K.O. YIM, and K.H. KIM. 2003. Destruction of *Cucumber green mottle mosaic virus* by heat treatment and rapid detection of virus inactivation by RT-PCR. *Molecules and Cells.* 16: 338-342.
- KOU, L., Y. LUO, W. DING, X. LIU, and W. CONWAY. 2009. Hot water treatment in combination with rachis removal and modified atmosphere packaging maintains quality of table grapes. *Hort. Science.* 44(7): 1947-1952.
- LANGHANS, R.W., R.K. HORST, and E.D. EARLE. 1977. Diseases-free plants via tissue culture propagation. *HortScience.* 12: 149-150.
- LOZOYA-SALDANA, H. and O. MERLIN-LARA. 1984. Thermotherapy and Tissue Culture for Elimination of *Potato*

- Virus X* (PVX) in Mexican Potato Cultivars Resistant to Late Blight. *Am. Potato J.* 61: 735-739.
- MILOSEVIC, S., A. SUBOTIC, A. BULAJIC, I. DJEKIC, S. JEVREMOVIC, A. VUCUROVIC, and B. KRSTIC. 2011. Elimination of TSWV from *Impatiens hawkerii* Bull. and regeneration of virus-free plant. *Electronic J. Biotech.* 14(1):1-5. <http://www.ejbiotechnology.info>
- NATSUAKI, K.T., K. TOMARU, S. USHIKU, Y. ICHIKAWA, Y. SUGIMURA, T. NATSUAKI, S. OKUDA, and M. TERANAKA. 1994. Characteristic of two viruses isolated from patchouli in Japan. *Plant Dis.* 78:1094-1097.
- NOVERIZA, R., G. SUASTIKA, S.H. HIDAYAT, and U. KARTO-SUWONDO. 2012a. Identification of a *Potyvirus* associated with mosaic disease on patchouli plants in Indonesia. *Journal of ISSAAS. (Unpublish).*
- NOVERIZA, R., G. SUASTIKA, S.H. HIDAYAT, dan U. KARTO-SUWONDO. 2012b. Penularan *Potyvirus* penyebab penyakit mosaic pada tanaman nilam melalui vektor *Aphis gossypii*. *Jurnal Fitopatologi Indonesia. (In press).*
- NURYANI, Y., HOBIR, dan C. SYUKUR. 2003. Status pemuliaan tanaman nilam (*Pogostemon cablin* Benth.) Perkembangan Teknologi Tanaman Rempah dan Obat. *XV(2): 57-67.*
- NURYANI, Y. 2005. Pelepasan varietas unggul nilam. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri.* 11 (1): 1-3.
- RAMGAREEB, S., S.J. SNYMAN, T. VAN ANTWERPEN, and R.S. RUTHERFORD. 2010. Elimination of virus and rapid propagation of disease free sugarcane (*Saccharum* spp. cultivar NCo376) using apical meristem culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 100: 175-181.
- SASTRY, K.S. and T. VASANTHAKUMAR. 1981. Yellow mosaic of patchouli (*Pogostemon patchouli*) in India. *Current Science.* 50 (17): 767-768.
- SINGH, M.K., V. CHANDEL, V. HALLAN, R. RAM, and A.A. ZAID. 2009. Occurrence of *Peanut stripe virus* on patchouli and raising of virus-free patchouli plants by meristem tip culture. *Journal of Plant Diseases and Protection.* 116 (1): 2-6.
- SUGIMURA, Y., B.F. PADAYHAG, M.S. CENIZA, N. KAMATA, S. EGUCHI, T. NATSUAKI, and S. OKUDA. 1995. Essential oil production increased by using virus free patchouli plants derived from meristem-tip culture. *Plant Pathology.* 44: 510-515.
- SUTRAWATI, M., G. SUASTIKA, dan SOBIR. 2010. Eliminasi *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) dari tanaman nenas dengan *hot water treatment*. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia.* 12(1): 19-25.
- TJANDRA, A. 2000. Pengaruh konsentrasi BAP dan Calcium panthothenate terhadap *Calla lily* (*Zantedeschia rehmanii*) secara *in vitro* dan presentase tumbuh planlet di lapangan. *Skripsi Fakultas Pertanian IPB Bogor. Hlm.* 21-25.
- VISESSUWAN, R., W. KORPRADITSKUL, S. ATTATHOM, and S. KLINGKONG. 1988. Production of virus-free sugarcane by tissue culture. *Kasetsart J. (Nat. Sci. Suppl.).* 22: 30-60.