

Eliminasi *Carnation Mottle Virus* Menggunakan Senyawa Antiviral pada Kultur Jaringan Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.)

[Elimination of *Carnation Mottle Virus* by Using Antiviral on Tissue Culture of *Carnation (Dianthus caryophyllus* L.)]

Diningsih, E¹⁾, Suastika, G²⁾, Damayanti, TA²⁾, dan Susanto, S³⁾

¹⁾Balai Penelitian Tanaman Hias, Jln. Raya Ciherang PO BOX 8 SDL, Ciherang, Cianjur, Jawa Barat, Indonesia 43253

²⁾Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jln. Kamper, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

³⁾Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Dramaga, Jln. Meranti, Bogor, Jawa Barat, Indonesia 16680

E-mail : gsuast@gmail.com

Naskah diterima tanggal 27 Mei 2015 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 24 Juli 2015

ABSTRAK. *Carnation mottle virus* (CarMV) merupakan salah satu virus penting pada tanaman anyelir dan semua kultivar anyelir yang ditanam di Jawa Barat terinfeksi oleh virus ini. Penelitian bertujuan mendapatkan metode eliminasi CarMV yang efektif untuk membebaskan planlet anyelir dari virus. Inisiasi eksplant terinfeksi dilakukan pada media MSO dan perbanyakan planlet dilakukan pada media perbanyakan MS yang mengandung 1,0 ppm BA dan 0,5 ppm kinetin (MSZ). Metode eliminasi CarMV yang diuji terdiri atas perlakuan 2-thiourasil dan amantadin dengan konsentrasi masing-masing 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm, dan ribavirin 5 ppm sebagai pembanding. Tunas apikal planlet ditanam pada media perlakuan (MSZA). Setelah tunas tumbuh, meristem terminal diambil 0,5 mm untuk ditanam pada media MSZ. Kultur meristem terminal dari planlet pada perlakuan 2-thiourasil menghasilkan planlet bebas virus sebesar 0 – 57%. Konsentrasi 2-thiourasil 25 ppm menghasilkan persentase planlet bebas virus tertinggi, namun perlakuan tersebut toksik pada tanaman. Perlakuan amantadin menghasilkan 25,0 – 54,55% planlet bebas virus. Di antara perlakuan yang diuji, perlakuan antiviral amantadin dengan konsentrasi 5 – 30 ppm lebih optimal menghasilkan planlet anyelir bebas CarMV dan tidak toksik terhadap tanaman. Perlakuan amantadin 5 – 20 ppm mampu menghambat virus lebih tinggi dibandingkan perlakuan 2-thiourasil pada konsentrasi yang sama. Amantadin 5 – 30 ppm menghasilkan tingkat penghambatan virus sebesar 42,94 – 59,57%, sedangkan 2-thiourasil sebesar -8,18 – 63,03%. Senyawa 2-thiourasil dan amantadin berpotensi sebagai agen antiviral untuk mendapatkan tanaman anyelir bebas CarMV.

Katakunci: *Carmovirus*; Anyelir; 2-thiourasil; Amantadin; *Meristem tip*; Planlet bebas virus

ABSTRACT. *Carnation mottle virus* (CarMV) is one of the important virus on carnation plants and all carnation cultivars grown in West Java are infected by this virus. The aim of conducted research was to obtain an effective elimination method of CarMV to freed carnation plantlets from virus. Initiation of infected explant was performed on MSO medium and propagation of plantlets on MS propagation medium containing 1.0 ppm BA and 0.5 ppm kinetin (MSZ). CarMV elimination method tested consists of a 2-thiouracil and amantadine treatment with concentration of 0, 5, 10, 15, 20, 25, and 30 ppm, and ribavirin 5 ppm as comparison. Apical bud plantlets were grown on treatment media (MSZA). After new shoots growth, the meristem tip was taken 0.5 mm to be propagated on the MSZ media. Meristem tip culture was taken from plantlets grown on 2-thiouracil treatment medium produced virus-free plantlets ranged from 0 – 57%. Concentration of 2-thiouracil at 25 ppm produced highest percentage of virus-free plantlets, however the treatment toxic to plants. Amantadine treatment produced 25.0 – 54.55% virus-free plantlets. Among the tested treatments, antiviral amantadine treatment with concentration 5 – 30 ppm optimally produced better CarMV-free plantlets and were not toxic to the plants. Amantadine treatment from 5 to 20 ppm was able to inhibit the virus higher than 2-thiouracil treatment at the same concentration. Amantadine 5 to 30 ppm produced levels of viral inhibition of 42.94 – 59.57%, while the 2-thiouracil of -8.18 – 63.03%. The 2-thiouracil and amantadine compounds have potential as an antiviral agent to get CarMV free carnation plants.

Keywords: *Carmovirus*; Carnations; 2-thiouracil; Amantadine; Meristem tip; Virus-free plantlets

Anyelir (*Dianthus caryophyllus* L.) merupakan tanaman perineal di daerah subtropis. Anyelir dapat berumur hingga 2,5 tahun, sedangkan di daerah tropis hanya mencapai 1,5 tahun (Marwoto, komunikasi pribadi 2015). Hal ini disebabkan terjadinya degenerasi pada tanaman akibat penggunaan setek yang berulang dan adanya akumulasi patogen sistemik dalam jaringan tanaman anyelir.

Carnation mottle virus (CarMV) merupakan salah satu virus penting pada tanaman anyelir (Lisa 1995). Virus ini selalu ditemukan di manapun anyelir

dibudidayakan (Sing et al. 2005, Raikhy et al. 2006, Garcia et al. 2003). Tanaman anyelir yang terserang virus ini daunnya bergejala belang-belang hijau tua dan hijau muda (*mottle*) bahkan pada varietas tertentu kadang-kadang gejala tidak terlihat (*symptomless*). Deteksi serologi dengan empat jenis antiserum menunjukkan bahwa semua kultivar anyelir yang diuji yang berasal dari beberapa pertanaman anyelir di Jawa Barat bereaksi positif terhadap antiserum CarMV (Diningsih 2015). Haerunisa et al. (2014) juga melaporkan bahwa penyakit belang yang ditemukan

pada tanaman anyelir di Cianjur dan Bandung disebabkan oleh infeksi CarMV. Adanya infeksi CarMV pada tanaman anyelir menyebabkan tanaman lebih rentan terhadap infeksi patogen lain (Sing *et al.* 2005, Safari *et al.* 2009). Hal ini menyebabkan tanaman tidak dapat berproduksi dengan baik, dimana kuantitas dan kualitas bunga potongnya menurun. Akan tetapi berapa besar penurunan produksi bunga potong akibat penyakit ini di Indonesia belum ada yang melaporkan secara tertulis.

Penyediaan bibit anyelir bebas virus melalui seleksi hampir tidak dapat dilakukan karena sulit mendapatkan individu tanaman yang bebas CarMV. Eliminasi CarMV dari jaringan terinfeksi merupakan salah satu cara yang dapat dilakukan untuk mendapatkan tanaman anyelir bebas virus.

Beberapa virus anyelir dapat dibebaskan dari jaringan tanaman sakit melalui teknik eliminasi virus dengan perlakuan panas pada jaringan tanaman (Ahmed *et al.* 2012). Namun, perlakuan panas tidak mungkin dilakukan pada CarMV karena titik panas inaktivasinya pada suhu 90°C (Sulyo *et al.* 2003). Jika tanaman dipanaskan sampai suhu tersebut, kemungkinan tanaman akan mati. CarMV dapat dieliminasi dari tanaman dengan perlakuan panas pada suhu 38°C selama 2 bulan, kultur meristem ujung (*meristem tip culture*), kemoterapi menggunakan ribavirin (5 ppm) pada kultur meristem ujung (3 mm) dan perlakuan arus listrik (10 mA) (Brunt & Martelli 2008, Ahmed *et al.* 2012, Wang *et al.* 1990, Sepahpour *et al.* 2009).

Antiviral 2-thiourasil pada konsentrasi 25 ppm yang dikombinasikan dengan *micrografting* secara *in vitro* mampu mengeliminasi *indian citrus ringspot virus* sebesar 21,4% (Sharma *et al.* 2007). Penggunaan amantadin pada tanaman dapat menghasilkan tanaman krisan bebas *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) (Horst & Cohen 1980), namun selama ini amantadin lebih banyak digunakan untuk mengatasi virus pada manusia (Stanicova *et al.* 2001).

Untuk meningkatkan peluang mendapatkan anyelir bebas virus maka perlu dilakukan upaya pembebasan tanaman dari virus. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan metode eliminasi CarMV yang efektif dari tanaman anyelir dan mendapatkan planlet anyelir bebas virus dengan menggabungkan penggunaan perlakuan senyawa antiviral pada media perbanyakan kultur jaringan dan kultur meristem ujung.

Hipotesis dari penelitian ini adalah salah satu senyawa antiviral yang digunakan dalam penelitian ini efektif untuk mendapatkan tanaman (planlet) anyelir bebas virus.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan dari bulan Maret sampai Desember 2014 di Laboratorium Virologi, Balai Penelitian Tanaman Hias, Cipanas, Cianjur.

Sumber Eksplan

Sumber eksplan adalah tanaman anyelir *D. caryophyllus* varietas Alivia yang terinfeksi oleh CarMV. Deteksi virus tersebut pada tanaman anyelir dikonfirmasi melalui cara serologi menggunakan antiserum CarMV (Agdia, USA) dan RT-PCR menggunakan sepasang primer spesifik gen protein selubung (Cevik *et al.* 2010).

Inisiasi Eksplan dan Mikropropagasi Kultur Tunas Terinfeksi

Media kultur jaringan yang digunakan adalah media MS (Murashige & Skooge 1962). Media MS tanpa zat pengatur tumbuh (ZPT) digunakan untuk inisiasi pertumbuhan eksplan (MSO), sedangkan media MS yang mengandung ZPT 1 mg/l BA dan 0,5 mg/l kinetin digunakan untuk memperbanyak planlet (MSZ).

Eksplan berupa tunas dari batang anyelir terinfeksi CarMV disterilisasi menggunakan detergen, antibiotik, kloroks (NaOCl), dan alkohol, kemudian ditanam pada media MSO. Planlet yang tumbuh diperbanyak dengan melakukan subkultur tunas yang berumur 4 minggu pada media MSZ seperti yang digunakan oleh Ahmed *et al.* (2012).

Perlakuan Antiviral

Perlakuan antiviral yang diuji terdiri atas (1) 2-thiourasil, (2) amantadin, masing-masing dengan konsentrasi 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm, dan (3) ribavirin 5 ppm sebagai pembanding. Senyawa antiviral diberikan ke dalam media MSZ. Tunas apikal dari planlet yang tumbuh ditanam pada media perlakuan (MSZ + antiviral) (MSZA). Setiap perlakuan terdiri dari empat ulangan dan setiap ulangan terdiri atas tiga planlet. Planlet ditanam pada media perlakuan selama 2 bulan.

Setelah ditumbuhkan pada media perlakuan (2 bulan setelah perlakuan), meristem ujung dengan ukuran sekitar 0,5 mm diambil tanpa dan atau menyertakan satu daun primordia dan ditanam pada media MS + 1 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin. Kultur meristem ujung yang tumbuh menjadi planlet dideteksi virusnya secara serologi dan planlet yang bebas virus ditanam kembali pada media MSO.

Semua planlet yang ditanam, baik pada media inisiasi, perbanyakan, maupun media perlakuan diinkubasi pada intensitas cahaya 1.000 lux selama 16 jam terang, 8 jam gelap, pada suhu ruang 18–20°C.

Parameter Pengamatan

Parameter yang diamati adalah jumlah planlet hidup, penambahan tinggi tanaman, jumlah planlet bebas virus, dan titer virus.

Jumlah planlet yang hidup/beregenerasi pada media MS + 1 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + antiviral diamati setiap 2 minggu sampai planlet beregenerasi (tumbuh). Persentase planlet hidup dihitung dengan rumus: $PH = \frac{\sum n}{\sum N} \times 100\%$, yaitu PH = persentase planlet hidup, n = jumlah planlet hidup, dan N = jumlah total planlet uji.

Pertambahan tinggi planlet pada media MSZA dihitung dengan rumus: $\Delta T = T_A - T_O$, yaitu ΔT = pertambahan tinggi planlet, T_A = tinggi planlet pada 2 bulan setelah perlakuan, T_O = tinggi planlet pada 0 hari perlakuan. Tinggi planlet diukur dari pangkal batang sampai ujung tunas.

Jumlah planlet bebas virus dikonfirmasi dengan deteksi serologi dengan metode DAS ELISA menggunakan antiserum CarMV (Agdia, USA). Planlet positif masih mengandung virus jika memiliki nilai absorbansi ELISA (NAE) dua kali lebih besar atau sama dengan NAE planlet sehat (kontrol).

Titer virus dan tingkat penghambatan virus (THR). Tingkat penghambatan virus dihitung dengan rumus: $THR = \frac{(NAE_k - NAE_p)}{NAE_k} \times 100\%$, yaitu NAE_k = nilai absorbansi ELISA kontrol, NAE_p = nilai absorbansi ELISA perlakuan.

Analisis Data

Pengujian dilakukan dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan tujuh perlakuan, yaitu konsentrasi antiviral 0, 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 ppm. Setiap perlakuan terdiri atas empat ulangan dan setiap ulangan terdiri atas tiga tanaman. Data pertambahan tinggi tanaman dan titer virus dianalisis menggunakan ANOVA dan diuji lebih lanjut menggunakan uji Duncan pada taraf nyata 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inisiasi dan Pertumbuhan Planlet Terinfeksi CarMV pada Media Perbanyakan

Inisiasi eksplan tanaman anyelir berhasil dilakukan pada media MSO. Dari semua eksplan yang ditanam, lebih dari 90% eksplan dapat tumbuh walaupun ada kontaminasi pada media (terutama kontaminasi bakteri). Namun, kontaminasi dapat teratasi dengan baik setelah dilakukan subkultur tunas-tunas planlet yang tidak kontak dengan media pertumbuhan pada media yang sama.

Pada media MS + 1 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin tanaman mampu bermultiplikasi dengan baik.

Pada media perbanyakan ini, satu ruas planlet yang ditanam dapat menghasilkan 5–15 planlet baru setelah diinkubasi selama 1 bulan (data tidak ditampilkan).

Pengaruh Perlakuan Antiviral terhadap Daya Tahan Hidup, Regenerasi, dan Pertumbuhan Planlet

Daya tahan hidup

Antiviral 2-thiourasil dan amantadin memiliki pengaruh yang berbeda terhadap daya tahan hidup planlet anyelir. Pemberian antiviral 2-thiourasil pada media menyebabkan pertumbuhan tanaman terhambat dan terjadi pencokelatan/*browning* pada tanaman. Namun, tidak demikian halnya dengan pemberian antiviral amantadin. Daya tahan hidup planlet yang ditanam pada media perlakuan 2-thiourasil berkisar dari 41,67 sampai 100%, sedangkan pada media yang mengandung amantadin adalah 100% (Tabel 1). Semakin tinggi konsentrasi 2-thiourasil (dari 5 – 30 ppm) menunjukkan senyawa tersebut semakin toksik terhadap planlet. Toksisitas antiviral 2-thiourasil sudah teramati pada konsentrasi 15 ppm, ditunjukkan adanya pencokelatan pada daun dan batang planlet bagian bawah yang kontak dengan media perlakuan pada umur 2 minggu setelah tanam.

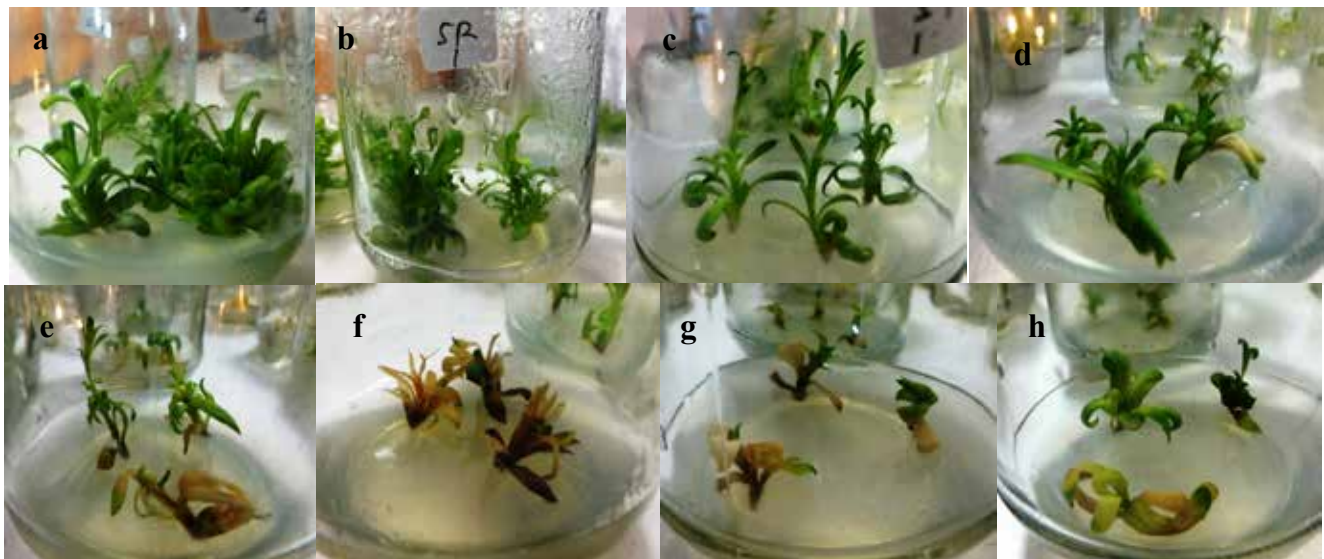
Toksisitas 2-thiourasil pada planlet tanaman anyelir memengaruhi daya tahan hidup planlet. Dibandingkan tanaman kontrol/pembanding, planlet yang ditanam pada media perlakuan tidak dapat tumbuh dan beregenerasi dengan baik. Daya tahan hidup planlet pada umumnya semakin rendah dengan semakin meningkatnya konsentrasi antiviral. Daya tahan hidup terendah disebabkan oleh perlakuan 2-thiourasil pada konsentrasi 25 ppm (41,67%). Pada 5 minggu setelah perlakuan, toksisitas antiviral 2-thiourasil menyebabkan beberapa individu planlet hampir mati pada perlakuan 15 ppm, sedangkan pada 20 sampai 30 ppm beberapa planlet mati. Planlet yang tidak mati, pertumbuhannya tidak optimal, semakin lama daun semakin menguning dan berwarna kecokelatan. Namun demikian, planlet masih tetap hidup karena masih ada bagian tanaman yang berwarna hijau.

Pemberian antiviral 2-thiourasil juga berpengaruh terhadap jumlah tunas-tunas yang muncul dari setiap individu planlet. Pada planlet yang diberi perlakuan 2-thiourasil sampai akhir masa perlakuan (2 bulan) tidak teramati munculnya tunas-tunas baru dari setiap individu planletnya (Gambar 1C-H). Pada tanaman kontrol/pembanding teramati adanya pertumbuhan 3 - 4 tunas-tunas baru dan pertumbuhannya yang hijau segar (Gambar 1A-B). Namun, pada beberapa planlet perlakuan yang hampir mati, muncul satu tunas baru dari bagian pucuk tanaman dan berukuran sangat kecil, sehingga tanaman tidak sempat mati (Gambar 1F-H).

Tabel 1. Pengaruh perlakuan antiviral terhadap daya tahan hidup dan pertumbuhan planlet (*Effect of antiviral treatment on growth and survival of plantlet*)

Perlakuan (<i>Treatment</i>), ppm	Persentase planlet hidup (<i>Plantlet survival</i>), %	Rerata pertambahan tinggi planlet (<i>Average of plantlets high added</i>), cm
2-Thiourasil (2-Thiouracil)		
0	100	4,14 a
5	100	4,07 a
10	100	2,24 ab
15	83,3	2,10 ab
20	58,3	2,19 b
25	41,67	1,85 b
30	66,6	2,46 ab
Ribavirin* (5 ppm)	100	3,29 ab
Amantadin (Amantadine)		
0	100	4,14 ab
5	100	4,03 b
10	100	4,57 ab
15	100	4,83 ab
20	100	4,94 a
25	100	4,43 ab
30	100	5,31 a
Ribavirin* (5 ppm)	100	3,29 b

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf 5% (*Mean followed by the same letter in the same column is not significantly different based on Duncan multiple range test (DMRT) at p=0.05*). *Ribavirin 5 ppm (sebagai pembanding)



Gambar 1. Pertumbuhan planlet anyelir pada umur 2 bulan setelah perlakuan pada medium MS yang mengandung antiviral 2-thiourasil pada konsentrasi 5 – 30 ppm. (a) 0 ppm, (b) Ribavirin 5 ppm (pembanding), (c) 5 ppm, (d) 10 ppm, (e) 15 ppm, (f) 20 ppm, (g) 25 ppm, dan (h) 30 ppm (*Growth of carnation plantlets at 2 months after treatment on media containing antiviral 2-thiouracil at concentration 5–30 ppm*)

Perlakuan antiviral amantadin pada media MS tidak berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan tanaman anyelir pada semua konsentrasi perlakuan. Setiap planlet yang ditanam, baik pada perlakuan antiviral dengan konsentrasi rendah maupun tinggi

mampu hidup, tumbuh dengan baik, dan tidak terjadi pencokelatan tanaman sampai akhir masa perlakuan dengan daya tahan hidup mencapai 100% (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa antiviral amantadin dengan konsentrasi 5 – 30 ppm tidak bersifat toksik

terhadap planlet tanaman anyelir. Penambahan BA dan kinetin pada media yang mengandung antiviral amantadin menyebabkan planlet mampu beregenerasi. Satu tunas planlet yang ditanam pada media perlakuan antiviral amantadin mampu berkembang menjadi lebih dari tiga tunas pada akhir masa perlakuan, hampir sama dengan kontrol (Gambar 2).

Antiviral ribavirin pada konsentrasi 5 ppm tidak berpengaruh buruk terhadap pertumbuhan biakan anyelir. Tunas dapat tumbuh hijau dan setiap biakan yang ditanam mampu beregenerasi menjadi lebih dari tiga tunas majemuk seperti yang terjadi pada biakan kontrol dan biakan yang diberi perlakuan amantadin.

Pertumbuhan Biakan

Perlakuan antiviral berpengaruh terhadap tinggi biakan, terutama 2-thiourasil (Tabel 1). Rerata tinggi planlet pada perlakuan 5, 10, 15, dan 30 ppm 2-thiourasil tidak berbeda dibanding kontrol tanpa perlakuan dan kontrol pembanding (ribavirin 5 ppm). Perlakuan 2-thiourasil pada konsentrasi 20 dan 25 ppm pertambahan tinggi tanaman berbeda secara signifikan dibanding kontrol (Tabel 1).

Perlakuan amantadin tidak bersifat toksik dan tidak menghambat pertumbuhan biakan yang berupa tunas majemuk. Rerata tinggi tunas anyelir pada semua perlakuan tidak berbeda secara nyata terhadap rerata tinggi tunas pada kontrol. Pada semua konsentrasi perlakuan, biakan masih mampu untuk tumbuh

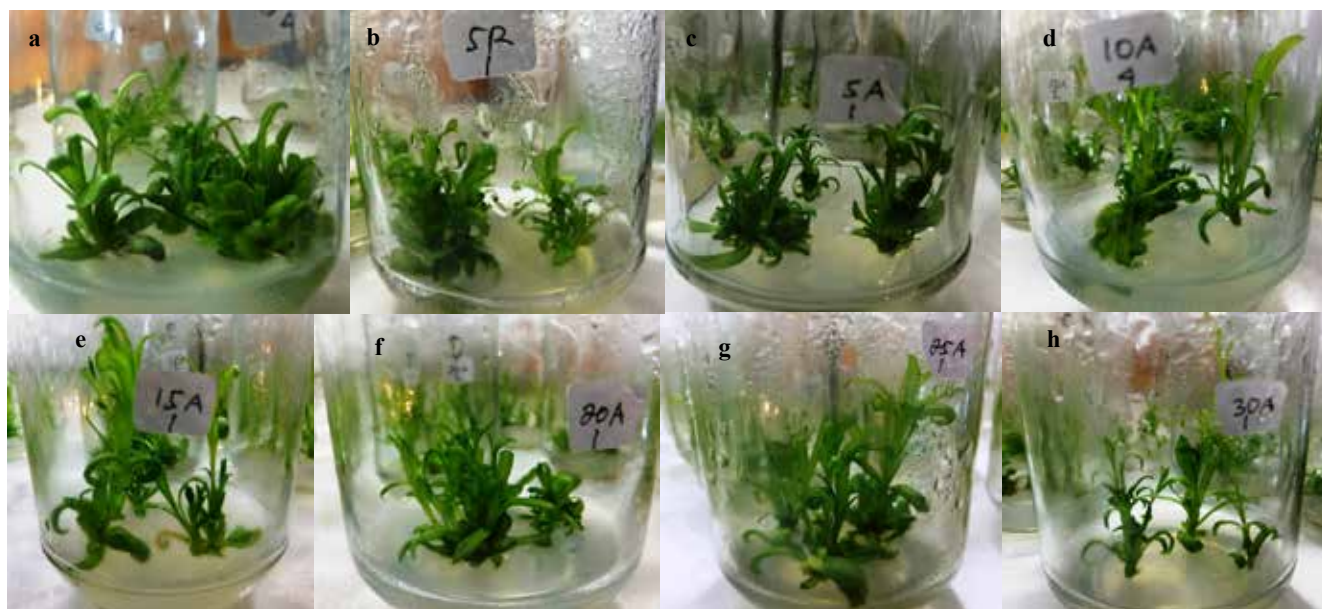
memanjang. Pertambahan tinggi tanaman ini bisa mencapai kisaran 4,03 – 5,31 cm dalam kurun waktu 2 bulan setelah tanam (Tabel 1).

Kultur Meristem Terminal

Kultur meristem terminal berukuran $\pm 0,5$ mm dari planlet perlakuan antiviral berhasil didapatkan dari biakan yang berupa tunas majemuk yang tumbuh pada media perlakuan antiviral 2-thiourasil, amantadin, dan ribavirin. Keberhasilan mendapatkan meristem terminal ditandai dengan munculnya satu individu tanaman (tunas) tanpa disertai adanya pertumbuhan daun atau tunas lateral pada awal pertumbuhan. Individu tunas baru tersebut muncul pada umur sekitar 5 hari setelah inkubasi. Namun, setelah beberapa minggu inkubasi, tunas baru tumbuh dan berkembang karena adanya ZPT 1 mg/l BA dan 0,5 mg/l kinetin pada media MS.

Pengaruh Kultur Meristem Terminal dari Biakan Perlakuan Antiviral terhadap Titer Virus dan Tingkat Penghambatan Virus

Tanaman anyelir bebas virus dapat diperoleh dari kultur meristem terminal semua perlakuan antiviral, kecuali pada perlakuan 2-thiourasil 15 ppm. Berdasarkan uji serologi ELISA pada kultur meristem terminal dari perlakuan 2-thiourasil, tanaman anyelir bebas virus yang dihasilkan berkisar dari 0 sampai 57,14%, sedangkan pada perlakuan amantadin, tanaman anyelir bebas virus berkisar pada 25,0–54,55% (Tabel 2).



Gambar 2. Pertumbuhan planlet anyelir pada umur 2 bulan setelah perlakuan pada MS + 1 mg/l BA + 0,5 mg/l kinetin + amantadin pada konsentrasi 5 - 30 ppm. (a.) 0 ppm, (b.) 5 ppm ribavirin (pembanding), (c.) 5 ppm, (d.) 10 ppm, (e.) 15 ppm, (f.) 20 ppm (g.) 25 ppm, dan (h.) 30 ppm (*Growth of carnation plantlets at 2 months after treatment on MSZ-amantadine at concentration 5-30 ppm*)

Tabel 2. Pengaruh perlakuan terhadap persentase planlet bebas virus (*Effect of treatment on virus-free plantlets*)

Perlakuan (<i>Treatments</i>)	Persentase planlet bebas virus pada beberapa konsentrasi antiviral (<i>Percentage of plantlet virus free on several antiviral concentration</i>)						
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm
2-Thiourasil (<i>2-Thiouracil</i>)	-	1/14* (7,14%)	1/10 (10,00%)	0/4 (0,00%)	1/8 (12,50%)	4/7 (57,14%)	5/11 (45,45%)
Amantadin (<i>Amantadine</i>)	-	4/16 (25,00%)	6/11 (54,55%)	3/10 (30,00%)	4/10 (40,00%)	4/15 (26,67%)	3/10 (30,00%)
Ribavirin	-	4/9 (44,44%)	-	-	-	-	-
Kontrol (<i>With-out treatment</i>)	0/5 (0,00%)						

*Jumlah planlet bebas virus/jumlah sampel planlet yang diamati (*The number of virus free plantlet the number of observed plantlets samples*)

Konsentrasi antiviral yang tinggi tidak selalu menghasilkan tanaman bebas virus dengan persentase tinggi pula. Pada kultur meristem terminal perlakuan 2-thiourasil, persentase tanaman bebas virus tertinggi diperoleh pada konsentrasi 25 ppm antiviral dibandingkan konsentrasi 30 ppm, sedangkan pada perlakuan amantadin persentase tertinggi diperoleh dari konsentrasi 10 ppm antiviral. Hal ini menunjukkan besarnya persentase tanaman bebas virus yang diperoleh tergantung pada jenis dan konsentrasi antiviral yang digunakan, juga tergantung pada keberhasilan dalam mengisolasi ujung meristem. Apakah dalam isolasi meristem dengan ukuran yang sangat kecil berhasil dilakukan maka perlakuan konsentrasi antiviral yang rendah pun peluang mendapatkan keberhasilan tanaman bebas virus dapat memberikan keberhasilan.

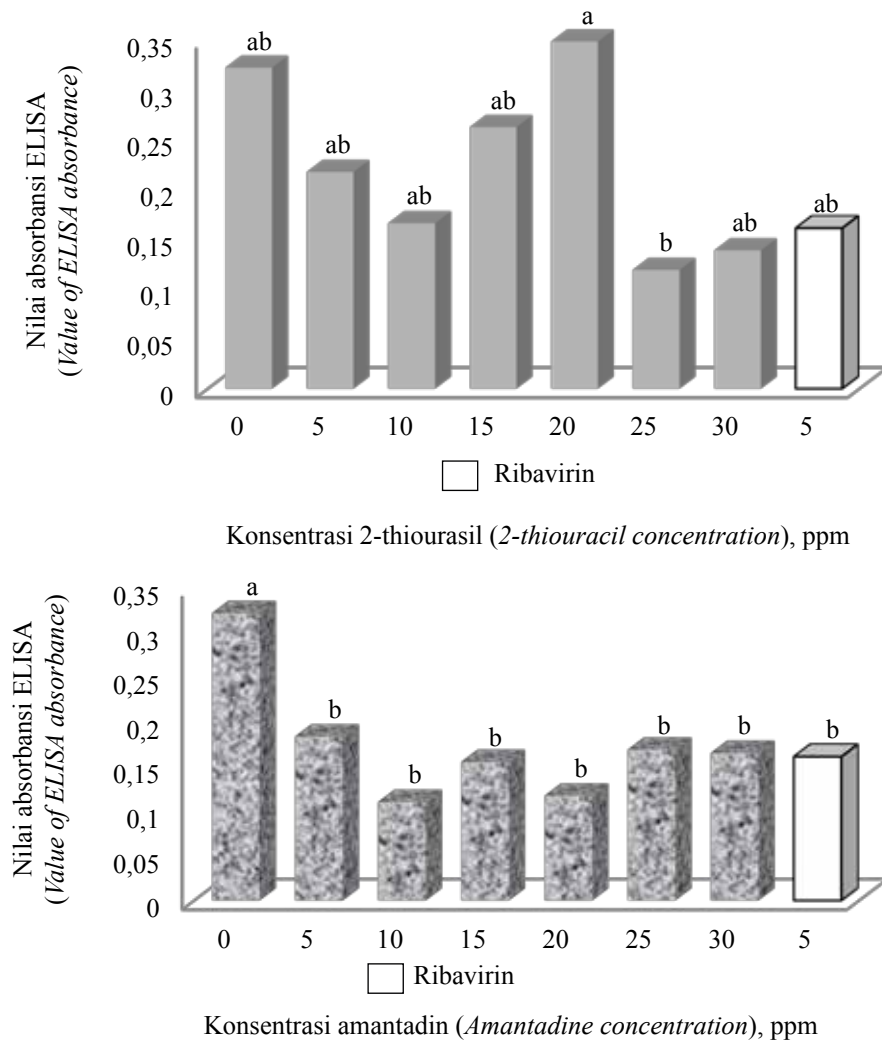
Penambahan antiviral pada media tumbuh yang dilanjutkan dengan kultur meristem ujung berpengaruh terhadap titer virus dan tingkat penghambatan virus dalam biakan. Pada taraf nyata 5%, rerata titer virus pada semua perlakuan 2-thiourasil tidak berbeda secara signifikan dibanding kontrol dan pembanding. Namun, rerata titer virus pada perlakuan 25 ppm berbeda secara signifikan terhadap perlakuan 20 ppm (Gambar 3A). Pada perlakuan amantadin, rerata titer virus semua perlakuan berbeda secara signifikan dibanding dengan kontrol, namun tidak berbeda terhadap pembanding, yaitu ribavirin 5 ppm (Gambar 3B).

Tingkat penghambatan virus bervariasi tergantung pada jenis antiviral dan konsentrasi perlakuan. Perlakuan antiviral 2-thiourasil pada konsentrasi 5 – 30 ppm yang dilanjutkan dengan kultur meristem terminal menghasilkan tingkat penghambatan virus sebesar -8,18 - 63,03%, dan tingkat penghambatan tertinggi dihasilkan dari perlakuan 2-thiourasil 25 ppm. Tingkat penghambatan virus sangat rendah pada perlakuan 2-thiourasil 20 ppm (-8,18%). Hal ini mungkin disebabkan meristem terminal yang terisolasi

ukurannya lebih besar dari 0,5 mm sehingga perlakuan antiviral saja tidak mampu menurunkan konsentrasi virus dalam biakan, bahkan konsentrasinya lebih tinggi dibandingkan kontrol tanpa perlakuan sehingga nilai THR negatif. Pada taraf nyata 5%, tingkat penghambatan virus pada semua perlakuan 2-thiourasil tidak berbeda secara signifikan dibanding kontrol tanpa perlakuan dan pembanding (ribavirin 5 ppm). Namun, tingkat penghambatan virus pada perlakuan 25 ppm berbeda secara signifikan dibanding perlakuan 20 ppm (Tabel 3).

Perlakuan antiviral amantadin 5 sampai 30 ppm menghasilkan tingkat penghambatan virus sebesar 42,94 – 59,57% dengan penghambatan tertinggi pada konsentrasi amantadin 10 ppm. Tingkat penghambatan virus semua perlakuan berbeda secara signifikan terhadap kontrol, namun tidak berbeda terhadap pembanding dan antar perlakuan. Perlakuan amantadin 5 – 20 ppm mampu menghambat virus lebih tinggi dibandingkan perlakuan 2-thiourasil pada konsentrasi yang sama (Tabel 3).

Eliminasi virus merupakan salah satu cara pengendalian yang umum dilakukan terhadap penyakit yang disebabkan oleh virus (Lim *et al.* 1993). Senyawa kimia 2-thiourasil merupakan analog dari pirimidin yang dilaporkan dapat menginaktivasi beberapa virus tanaman seperti TMV melalui mekanisme penghambatan replikasi virus. Sekitar 3 – 10% 2-thiourasil menyisip pada utas negatif dari RNA sehingga menghambat pembentukan utas positif. Penyisipan 2-thiourasil ke dalam utas RNA virus menyebabkan pembentukan triplet kodon yang tidak benar sehingga menyebabkan kesalahan dalam pembentukan asam amino dalam coat protein dan kemungkinan juga dalam enzim replikasi (replikase) yang menyebabkan hilangnya infektivitas virus (Sharma *et al.* 2007). Hilangnya infektivitas virus pada tanaman dapat dibuktikan dengan dihasilkannya



Gambar 3. Rerata titer virus pada perlakuan 2-thiourasil (A) dan amantadin (B) dibandingkan rerata titer virus pada kontrol (tanpa perlakuan) dan pembanding (ribavirin 5 ppm) (*The average of virus titer in the treatment of 2-thiouracil (A) and amantadine (B) compared with the average virus titer in control (no treatment) and comparison (ribavirin 5 ppm)*)

tanaman anyelir bebas virus sebesar 7,14 – 57,14% pada konsentrasi 2-thiourasil 5–30 ppm. Pada konsentrasi 2-thiourasil 25 ppm, persentase tanaman bebas virus yang diperoleh dua kali lebih tinggi dari hasil sebelumnya pada tanaman jeruk (Sharma *et al.* 2007), namun pada konsentrasi tersebut, 2-thiourasil bersifat toksik pada tanaman anyelir dibandingkan pada tanaman jeruk. Hal ini menunjukkan bahwa keefektifan senyawa antiviral yang digunakan tergantung pada jenis tanaman.

Amantadin merupakan senyawa antiviral yang digunakan dalam bentuk *amantadine hydrochloride salt* (Stanicova *et al.* 2001). Mekanisme kerja amantadin adalah menghambat replikasi virus dalam beberapa tahap, misalnya pada HIV menyebabkan terputusnya sintesis asam nukleat oleh materi yang analog dengan nukleotida seperti azidotymidine (AZT) atau dideoxysinosin (DDI) (Stanicova *et al.* 2001).

Aktivitas kerja amantadin pada tanaman belum banyak dilaporkan. Namun, ada beberapa laporan ilmiah yang menunjukkan tanaman anggrek yang diberi amantadin pada konsentrasi 25–100 ppm menghasilkan *protocorm like bodies* (plb) bebas CyMV sekitar 20–40% (Diningsih *et al.* 2010). Sementara, perlakuan amantadin pada tanaman krisan dengan konsentrasi 50–100 ppm belum dapat membebaskan viroid dari jaringan terinfeksi (Diningsih *et al.* 2009).

Penggunaan kultur meristem terminal dengan ukuran sekitar 0,5 mm dari biakan yang diberi perlakuan senyawa antiviral meningkatkan peluang diperolehnya tanaman anyelir bebas virus yang lebih tinggi. Kultur meristem merupakan salah satu aplikasi bioteknologi yang efisien untuk regenerasi dan eliminasi virus dari tanaman yang terinfeksi (Milosevic *et al.* 2012). Virus tidak memiliki sistem metabolisme tersendiri. Replikasi virus dalam sel inang tergantung

Tabel 3. Pengaruh perlakuan terhadap persentase penghambatan virus (THR) [(Effect of treatment on percentage viral inhibition (THR)]

Perlakuan antiviral (Antiviral treatment)	Tingkat penghambatan virus pada beberapa konsentrasi antiviral (Virus inhibition level on several concentration)						
	0 ppm	5 ppm	10 ppm	15 ppm	20 ppm	25 ppm	30 ppm
2-Thiourasil (2-Thiouracil)	-	32,49 ab	48,41 ab	18,44 ab	-8,18 a	63,03 b	56,90 ab
Amantadin (Amantadine)	-	42,94 b	64,95 b	51,80 b	59,57 b	47,51 b	48,66 b
Ribavirin	-	49,94					
Kontrol (Without treatment)	0						

Angka rerata yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji wilayah berganda Duncan pada taraf 5% (Mean followed by the same letter in the same column are not significantly different based on Duncan multiple range test (DMRT) at p=0.05). *Ribavirin 5 ppm (sebagai pembanding). * Kontrol

pada *metabolic pathways* dan mesin pensintesis asam nukleat dan protein sel inang. Pada umumnya, dalam meristem tanaman 0,1 – 0,2 mm tidak ditemukan adanya infeksi virus (Milosevic *et al.* 2012). Hal ini disebabkan sel meristem bermultiplikasi lebih cepat daripada replikasi virus. Inilah yang menjadi alasan utama dilakukannya kultur meristem untuk mendapatkan tanaman bebas virus. Akan tetapi, untuk mendapatkan meristem dengan ukuran 0,1 – 0,2 mm dari biakan anyelir sangat sulit karena lunak dan kecilnya ukuran meristem pucuk tersebut. Jadi, dalam penelitian ini penggunaan meristem terminal yang ukurannya sedikit lebih besar dapat membantu dalam mendapatkan tanaman anyelir bebas virus jika sebelumnya tanaman diberi perlakuan senyawa antiviral. Dengan cara itu peluang mendapatkan tanaman bebas virus menjadi lebih tinggi.

Keberhasilan dalam memperoleh tanaman bebas virus, selain didukung oleh kinerja senyawa antiviral dalam media pertumbuhan dan perlakuan kultur meristem terminal, juga didukung oleh penggunaan zat pengatur tumbuh sitokinin dengan konsentrasi relatif tinggi (1 ppm BA dan 0,5 ppm kinetin). Penambahan kedua ZPT tersebut dalam medium pertumbuhan berpengaruh terhadap eliminasi virus dari jaringan terinfeksi, yaitu berkaitan dengan ketahanan tanaman terhadap infeksi virus karena sitokinin dengan konsentrasi tinggi dapat menghambat sintesis protein virus (Milosevic *et al.* 2012).

Teknologi eliminasi CarMV dari tanaman anyelir yang diperoleh dalam penelitian ini dapat diaplikasikan dalam kegiatan kultur jaringan tanaman anyelir secara rutin untuk mendapatkan tanaman anyelir bebas virus. Planlet anyelir bebas virus yang diperoleh dalam penelitian ini juga bisa dijadikan sebagai tanaman induk sebagai sumber perbanyakan vegetatif tanaman.

KESIMPULAN DAN SARAN

Senyawa 2-thiourasil dan amantadin berpotensi sebagai agen antiviral untuk mendapatkan tanaman anyelir bebas CarMV. Kultur meristem terminal (0,5 mm) dari biakan yang diberi perlakuan antiviral 2-thiourasil dengan konsentrasi 25 ppm efektif menghasilkan planlet anyelir bebas virus, tetapi pada konsentrasi ini bersifat toksik terhadap tanaman, sedangkan kultur meristem terminal dari biakan perlakuan amantadin konsentrasi 10 ppm lebih optimal mendapatkan planlet bebas virus.

Perlu dilakukan kajian terhadap mekanisme kedua antiviral dalam mengeliminasi CarMV dan diupayakan mengisolasi kultur meristem terminal dengan ukuran yang lebih kecil dari 0,5 mm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Badan Litbang Pertanian yang telah mendanai penelitian ini, Bapak Ir. Indijarto Budi Rahardjo, Bapak Prof. Dr. Ir. Budi Marwoto, MS dan Prof. Dr. Ir. I. Djatnika, MS, yang telah membantu memfasilitasi terselenggaranya penelitian, serta Laily Qodriyah dan Ee Saepudin yang telah membantu pelaksanaan penelitian di laboratorium.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, AA, Eman, Khatab, AH, Rehab, Dawood, A & Ismail, AM 2012, 'Evaluation of tip culture and thermotherapy for elimination of carnation latent virus and carnation vein mottle virus from carnation plant', *Inter. J. Virol.*, vol. 8, pp. 234-9.
- Brun, AA & Martelli, GP 2008 'Description of plant viruses : Carnation mottle virus, A revised version of DPV 7.

3. Cevik, B, Bakır, T & Koca, G 2010, 'First report of carnation mottle virus in Turkey', *Plant Pathol.*, vol. 59, pp. 394.
4. Diningsih, E, Sulyo, Y & Rahardjo, IB 2009, 'Eliminasi chrysanthemum stunt viroid (CSVd) pada tanaman krisan, Laporan akhir, Balai Penelitian Tanaman Hias, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, Badan Litbang Pertanian, Kementerian Pertanian, Jakarta.
5. Diningsih, E, Muharam, A, Sulyo, Y, Rahardjo, IB & Widiastoety, D 2010, 'Eliminasi cymbidium mosaic virus (CyMV) pada anggrek *Dendrobium* dengan senyawa antiviral amantadin dan ribavirin', *Prosiding Seminar Nasional Hortikultura Indonesia dalam Upaya Reorientasi Riset untuk Mengoptimalkan Produksi dan Rantai Nilai Hortikultura*, Universitas Udayana, Denpasar, Bali, hlm. 932-40.
6. Diningsih, E, Suastika, G, Damayanti, TA & Susanto, S 2015, 'Characterization a carmovirus on carnation in West Java, Indonesia', *J. Agrivita*, vol. 37. no. 2. hlm. 108-14.
7. Garcia, S, Sanchez, MA & Pallas, V 2003, 'Spatio-temporal analysis of the RNA, coat and movement (p7) protein of carnation mottle virus in *Chenopodium quinoa* plant', *J. Gen Virol.*, vol. 84, no. 3, pp. 745-49.
8. Haerunisa, R, Diningsih, E & Suastika, G 2014, 'Identifikasi carmovirus pada tanaman anyelir melalui teknik reverse transcription-polymerase chain reaction dan analisis sikuen nukleotida', *J. Fitopatol. Indones.*, vol. 10, no. 3, hlm. 87-92.
9. Horst, RK & Cohen, D 1980, 'Amantadine supplement tissue culture medium: A method for obtaining chrysanthemum free of Chrysanthemum stunt viroid', *Acta Hort.*, vol. 110, pp. 311-5.
10. Lim, ST, Wong, SM & Goh, CJ 1993, 'Elimination of cymbidium mosaic virus and odontoglossum ringspot virus from orchid by meristem culture and thin section culture with chemotherapy', *Ann. Appl. Biol.*, vol. 122, pp. 289-97.
11. Lisa, V 1995, 'Carnation', in Loebenstein, G, Lawson, RH & Brunt, AA (eds.), *Virus and virus like diseases of bulb and flower crops*, John Willey and Sons, pp. 543.
12. Milosevic, S, Cingel, A, Jevremovic, S, Stankovic, I, Bulajic, A, Krstic, B & Subotic, A 2012, 'Virus elimination from ornamental plants using in vitro culture techniques', *Pestic. Phytomed.* (Belgrade), vol. 27, no. 3, pp. 203-11.
13. Murashige, T & Skoog, F 1962, 'A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures', *Physiol. Plant.*, vol. 15, no. 3, pp. 473-97.
14. Raikhy, G, Hallan, V, Kulshrestha, S, Ram, R & Zaidi, AA 2006 'Multiplex PCR and genome analysis of carnation mottle virus Indian isolate', *Curr. Scie.*, vol. 90, no. 1, pp. 74-82.
15. Safari, M, Koohi Habibi, M, Mosahebi, G & Dizadji, A 2009, 'Carnation mottle virus, an important viral agent infecting carnation cut-flower crops in Mahallat of Iran', *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, vol. 74, no. 3, pp. 861-5.
16. Sepahpour, S, Moieni, A, Shamsbakhsh, M & Baghizadeh, A 2009, 'Effects of electric current value and time treatments on elimination of carnation mottle virus and in vitro plantlet regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus*)', *Acta Hort.*, (ISHS), vol. 829, pp. 395-8.
17. Sharma, S, Sing, B, Rani, G, Zaidi, AA, Hallan, U, Nagpal, A & Virk, GS, 2007, 'Production of Indian citrus ringspot virus free plant of kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting', *J. Cent. Europ. Agric.*, vol. 8, no. 1, pp. 1-8.
18. Sing, HP, Hallan, V, Raikhy, G, Kulshrestha, S, Sharma, ML, Ram, R, Garg, ID & Zaidi, AA 2005 'Characterization of An Indian isolate of Carnation mottle virus', *Curr. Scie.*, vol. 88, no. 4, pp. 594-601.
19. Stanicova, J, Miskovsky, P & Sutiak, P 2001, 'Amantadin: An antiviral antiparkinsonian agent', *Rev. Vet Med-Czech*, vol. 46, no. 9-10, pp. 244-56.
20. Sulyo, Y, Diningsih, E & Rahardjo, IB 2003, 'Studi pendahuluan mengenai virus pada tanaman anyelir', *Prosiding Kongres XVII dan Seminar Ilmiah Nasional Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*, Fak. Pertanian, Unpad, Bandung, 6-8 Agustus 2003.
21. Wang, BLu, MK Yu, SQ & Zang, RP 1990, 'Elimination of carnation mottle virus from carnation plant', *Chinese J. Virol.*, vol. 6, no. 4, pp. 341-346, doi:CNKI:SUN:BD XB.0.1990-04-008.