

Organogenesis dan Krioterapi Tebu untuk Mengeliminasi *Sugarcane Streak Mosaic Virus*

(Organogenesis and Cryotherapy Techniques of Sugarcane to Eliminate *Sugarcane Streak Mosaic Virus*)

Ika Roostika^{1*}, Sedyo Hartono², dan Deden Sukmadjaja¹

¹Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia
Telp. (0251) 8337975; Faks. (0251) 8338820; *E-mail: ikatambunan@yahoo.com

²Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Jl. Flora 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281 Indonesia

Diajukan: 8 Juni 2016; Direvisi: 10 Agustus 2016; Diterima: 18 Oktober 2016

ABSTRACT

The use of virus-free seedlings is an effective option to control viral disease. It was reported that several tissue culture methods could eliminate virus infection from plant tissues. The objective of the study was to know the *in vitro* responses of three sugarcane varieties to the organogenesis and cryotherapy techniques and to know the potential rate of both techniques in eliminating *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). The plant materials were virus-infected sugarcane of three varieties of sugarcane (PS862 from Cirebon, PS881 from Jember, and PSJK922 from Malang). Callus induction was conducted on MS medium with addition of 3 mg/l 2,4-D and 3 g/l casein hydrolysate. There were three treatments of subculture (SK0, SK1, and SK2). Regeneration of shoots was conducted on MS medium with addition of 0.3 mg/l BA, 0.5 mg/l IBA, and 100 mg/l PVP. Cryotherapy was done by using vitrification technique, starting with preculture on 0.3 M sucrose-containing medium for 3 days, loading with LS solution for 10 minutes, dehydration with PVS2 solution for 40 minutes, plunging in liquid nitrogen for 1 hour, deloading with RS solution for 30 minutes, recovery, and regeneration. Virus indexing was conducted by RT-PCR assay using specific primer of SCSMV. The result showed that all varieties were able to form for calli and shoots, both with and without subculture. Within the three varieties, only PS862 from Cirebon could survive post cryotherapy treatment. Organogenesis regeneration up to twice subculture was not able to eliminate SCSMV. Cryotherapy could eliminate SCSMV virus with the proportion of one third (33.3%).

Keywords: *Saccharum officinarum* L., embryogenic callus, vitrification, liquid nitrogen, virus elimination.

ABSTRAK

Penggunaan bibit bebas virus menjadi salah satu cara pengendalian penyakit virus yang efektif. Beberapa macam teknik kultur jaringan dilaporkan mampu mengeliminasi virus di dalam jaringan tanaman. Tujuan penelitian adalah mengetahui respons tiga varietas tebu terhadap teknik organogenesis dan krioterapi serta untuk mengetahui kemampuan kedua teknik tersebut dalam mengeliminasi *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). Bahan tanaman yang digunakan adalah varietas tebu PS862 asal Cirebon, PS881 asal Jember, dan PSJK922 asal Malang yang terinfeksi SCSMV. Induksi kalus dilakukan dengan menggunakan media MS yang ditambah dengan 2,4-D 3 mg/l dan kasein hidrolisat 3 g/l. Terdapat tiga macam perlakuan subkultur (SK0, SK1, dan SK2). Regenerasi tunas dilakukan pada media MS dengan penambahan BA 0,3 mg/l, IBA 0,5 mg/l, dan PVP 100 mg/l. Teknik krioterapi yang diterapkan adalah vitrifikasi dengan tahapan prakultur menggunakan sukrosa 0,3 M selama 3 hari, *loading* dengan larutan LS selama 10 menit, dehidrasi dengan larutan PVS2 selama 40 menit, krioterapi dengan nitrogen cair selama 1 jam, *deloading* dengan larutan RS selama 30 menit, pemulihan, dan regenerasi. Indeksing virus dilakukan secara RT-PCR menggunakan primer spesifik SCSMV. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ketiga varietas mampu membentuk kalus dan tunas, baik tanpa atau melalui proses subkultur. Di antara tiga varietas yang diuji, hanya PS862 asal Cirebon yang mampu bertahan hidup pasca-perlakuan krioterapi. Teknik organogenesis hingga dua kali subkultur tidak mampu mengeliminasi SCSMV, walaupun telah dilakukan subkultur hingga dua kali. Teknik krioterapi dapat mengeliminasi SCSMV dengan proporsi sebesar satu pertiga (33,3%).

Kata kunci: *Saccharum officinarum* L., kalus embriogenik, vitrifikasi, nitrogen cair, eliminasi virus.

PENDAHULUAN

Penyakit mosaik merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman tebu (Kristini *et al.*, 2008). Hasil survei menunjukkan bahwa gejala mosaik berupa garis-garis kuning-hijau pada lembaran daun tebu (Sholeh, 2015). Penyakit tersebut disebabkan oleh virus, yaitu *Sugarcane mosaic potyvirus* (SCMV) dan *Sugarcane streak mosaic virus* (SCSMV). Intensitas serangan penyakit berkisar antara 0–62% dan mampu menyebabkan kehilangan hasil gula 10–20%. Dilaporkan bahwa penyakit mosaik yang disebabkan oleh SCSMV ditemukan di semua perkebunan tebu (Putra dan Damayanti, 2009).

Penggunaan bibit bebas virus menjadi salah satu cara pengendalian patogen virus yang efektif (Hu *et al.*, 2012), terutama ketika infeksi virus tidak terjadi secara tunggal melainkan secara bersama-sama oleh beberapa virus. Teknik kultur meristem merupakan cara yang paling umum diaplikasikan untuk mengeliminasi virus (Retheesh dan Bhat, 2010). Keberhasilan teknik tersebut ditentukan oleh kecilnya ukuran eksplan yang diisolasi, jenis tanaman, dan jenis virus. Ukuran eksplan yang terlalu kecil menyebabkan kendala teknis dalam proses regenerasi jaringan menjadi tanaman utuh atau planlet (Wang dan Valkonen, 2012). Selain itu, isolasi meristem dari tanaman monokotil lebih sulit dibanding dengan tanaman dikotil karena meristem terletak di pangkal tunas dan lebih tersembunyi. Jenis virus tertentu juga sulit dieliminasi sehingga memerlukan perlakuan khusus. Dilaporkan bahwa *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) tidak dapat dieliminasi dengan teknik kultur meristem dan termoterapi (*thermotherapy*) (Wang dan Valkonen, 2012).

Cara yang relatif baru untuk mengeliminasi virus adalah menggunakan metode kriopreservasi. Metode tersebut bahkan dapat diterapkan untuk eradikasi patogen lainnya, seperti fitoplasma dan bakteri sehingga disebut juga sebagai teknik krioterapi (*cryotherapy*) (Wang dan Valkonen, 2012). Dilaporkan juga bahwa teknik tersebut dapat mengeliminasi *Grapevine virus A* (GVA) pada tanaman anggur (Wang *et al.*, 2003), *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) pada tanaman ubi jalar (Feng *et al.*, 2011), dan *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) dan *Grape leafroll associated viruses* (GLRaVs) pada tanaman anggur (Shatnawi *et al.*, 2011).

Selain untuk produksi bibit bebas virus, teknik krioterapi sekaligus dapat diterapkan untuk konservasi jangka panjang untuk tanaman yang berbiak secara vegetatif (Sakai, 1993), seperti tebu. Pada prinsipnya, jaringan tanaman disimpan pada suhu ultra rendah (-160°C hingga -200°C) dalam uap

nitrogen, cair atau yang terpadatkan, di mana proses metabolisme jaringan nyaris tidak ada sama sekali. Oleh karena itu, bahan tanaman dapat disimpan selama puluhan tahun secara kriopreservasi sehingga akan lebih efisien dalam menghemat ruangan, waktu, tenaga, dan biaya.

Dibanding dengan teknik kultur meristem, krioterapi menghasilkan tanaman bebas virus dengan frekuensi yang lebih tinggi (Feng *et al.*, 2011). Tingkat kesulitan yang tinggi pada teknik kultur meristem berupa isolasi meristem yang berukuran sangat kecil, hanya terdiri atas *apical dome* dan *leaf primordia* pertama (LP1) dan yang kedua (LP2) serta kesulitan dalam meregenerasikannya menjadi planlet. Sebaliknya, penggunaan tunas pucuk (*shoot tips*) sangat dimungkinkan dalam teknik krioterapi. Cekaman fisik selama proses dehidrasi sebelum pembekuan dan proses rehidrasi setelah pembekuan menyebabkan sel-sel tanaman pada bagian *leaf primordia* ketiga (LP3), keempat (LP4), kelima (LP5), dan bagian basal menjadi mati sehingga virus tidak dapat bertahan hidup (Feng *et al.*, 2011).

Selain krioterapi, teknik organogenesis juga berpeluang diterapkan untuk mengeliminasi virus. Naz *et al.* (2009) melaporkan bahwa teknik organogenesis dapat mengeliminasi virus SCMV pada tebu dengan tingkat keberhasilan sebesar 61,11% jika dideteksi secara serologi dan 40% jika dideteksi dengan mikroskop elektron. Tujuan penelitian adalah mengetahui respons tiga varietas tebu terhadap teknik organogenesis dan krioterapi serta untuk mengetahui kemampuan kedua teknik tersebut dalam mengeliminasi virus mosaik (SCSMV).

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman yang digunakan adalah tiga varietas tebu, yaitu PS862 asal Cirebon yang diperoleh dari Pabrik Gula Jatitujuh (PS862-Crb), PS881 asal Jember yang diperoleh dari PTPN XI Surabaya (PS881-Jbr), dan PSJK922 asal Malang yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (PSJK922-Mlg) yang telah terbukti terinfeksi oleh virus SCSMV (Roostika *et al.*, 2015). Tanaman tebu tersebut dipelihara di rumah kaca milik Unit Produksi Benih Unggul (UPBU), Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian (Balitbangtan), Bogor.

Dalam penelitian ini, terdapat tiga kegiatan yang dilakukan secara bertahap, yaitu (1) Organogenesis, (2) Krioterapi, dan (3) Indeksing virus. Induksi organogenesis dan krioterapi dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya

Genetik Pertanian (BB Biogen), sedangkan kegiatan indeksing virus dilakukan di Laboratorium Virologi, Departemen Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada (UGM), Yogyakarta.

Organogenesis

Bahan tanaman berupa setek pucuk tebu varietas PS862-Crb, PS881-Jbr, dan PSJK922-Mlg dicelup ke dalam alkohol 96%, kemudian dibakar di atas lampu spiritus sebanyak tiga kali. Pelepeh dikupas satu per satu dan batang yang mengandung gulungan daun diiris tipis-tipis secara melintang. Eksplan yang berupa irisan daun ditanam pada media induksi kalus, yaitu media MS yang mengandung *dichlorophenoxyacetic acid* (2,4-D) 3 mg/l, kasein hidrolisat (CH) 3 g/l, dan PVP 100 mg/l. Kalus yang terbentuk disubkultur pada media yang sama untuk proliferasi kalus. Proses subkultur dilakukan dengan menggunakan media yang sama, sebanyak dua kali dengan pengodean SK0 (kontrol atau tanpa subkultur), SK1 (subkultur kesatu), dan SK2 (subkultur kedua). Regenerasi tunas dilakukan pada media MS dengan penambahan BA 0,5 mg/l, IBA 0,5 mg/l, dan PVP 100 mg/l. Planlet yang terbentuk digunakan sebagai sampel untuk indeksing virus.

Krioterapi

Teknik krioterapi yang diterapkan adalah vitrifikasi yang telah dilakukan pada tebu varietas PS864 (Roostika *et al.*, 2015). Sumber eksplan dari varietas PS862-Crb, PS881-Jbr, dan PSJK922-Mlg adalah biakan *in vitro* yang berumur 2 minggu sejak subkultur terakhir yang dipelihara pada media regenerasi, yaitu media MS yang ditambah dengan BA 0,5 mg/l, IBA 0,5 mg/l, dan PVP 100 mg/l.

Dalam tahapan penelitian ini digunakan dua tipe eksplan, yaitu apeks dan tunas pucuk. Apeks merupakan organ yang terdiri atas meristem dengan 3–4 primordia daun dengan ukuran eksplan sekitar 3 mm, sedangkan tunas pucuk memiliki ukuran yang lebih besar (sekitar 5 mm), yaitu meristem beserta lebih dari lima primordia daun.

Tahapan kriopreservasi yang dilakukan meliputi prakultur, *loading*, dehidrasi, pembekuan, pelelehan (*thawing*), pemulihan, dan regenerasi. Pertama kali, eksplan diprakultur pada media MS yang mengandung sukrosa 0,3 M dan diinkubasikan di ruang gelap dengan suhu 25°C selama 3 hari. Selanjutnya, eksplan diberi perlakuan *loading* dalam larutan LS (MS cair + gliserol 2 M + sukrosa 0,4 M) selama 20 menit. Dehidrasi jaringan dilakukan dengan menggunakan larutan *Plant Vitrification-2* atau PVS2 (MS cair + gliserol 30% + etilen glikol (EG) 15% +

dimetilsulfoksida (DMSO) 15% + sukrosa 0,4 M) selama 30 menit. Sebanyak tiga tabung krio (*cryovial*) yang masing-masing berisi lima eksplan dimasukkan ke dalam nitrogen cair selama minimal 1 jam. Sebagai kontrol, sebanyak tiga tabung krio yang masing-masing berisi lima eksplan tidak direndam di dalam nitrogen cair, namun langsung dicuci dengan larutan *deloading solution*, yaitu media MS cair yang mengandung sukrosa 1,2 M. Pasca-pembekuan di dalam nitrogen cair, eksplan dilelehkan (*thawing*) di dalam larutan *deloading solution* pada suhu ruang. Selanjutnya, eksplan dikeringanginkan di atas kertas saring dengan hembusan angin dari *laminair air flow* (LAF) selama sekitar 1 menit. Eksplan ditanam pada media pemulihan (MS padat + BA 0,5 mg/l + IBA 0,5 mg/l + PVP 300 mg/l). Pada minggu pertama, eksplan diinkubasi di ruang gelap, selanjutnya dipindahkan ke ruang terang dengan pencahayaan 1.000 lux selama 16 jam. Untuk memacu multiplikasi tunas, biakan dipindahkan ke media regenerasi (MS padat + BA 0,5 mg/l + IBA 0,5 mg/l + PVP 100 mg/l) setelah minimal 1 bulan masa pemulihan. Peubah yang diamati adalah daya hidup, jumlah tunas per eksplan, dan jumlah daun per eksplan. Daya hidup dihitung berdasarkan jumlah eksplan yang bertahan hidup dibagi dengan jumlah total eksplan dan dikalikan 100%. Data ditampilkan dalam bentuk rerata dan standar deviasi. Planlet yang terbentuk selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk indeksing virus.

Indeksing Virus

Bahan tanaman yang digunakan adalah embrio somatik dari ketiga varietas dan tunas *in vitro* hasil perlakuan krioterapi dari jaringan yang berhasil hidup dan tumbuh, yaitu PS862-Crb. Sampel daun diambil dari setiap perlakuan. Sampel yang berasal dari embrio somatik diambil dari perlakuan SK0, SK1, dan SK2. Indeksing virus mosaik dilakukan dengan metode RT-PCR menggunakan primer spesifik SCSMV (Babu *et al.*, 2012). Adapun sekuen primer secara lengkap disajikan pada Tabel 1.

Isolasi RNA total sampel planlet tebu dilakukan dengan menggunakan *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) dan *RNA Extraction Kit* (GenAid) mengikuti petunjuk dari pabrikan. RNA hasil ekstraksi digunakan sebagai cetakan (*template*) untuk membentuk DNA komplementer (cDNA) menggunakan *Revert Aid cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). DNA komplementer yang terbentuk selanjutnya digunakan sebagai cetakan untuk PCR menggunakan *Go Taq Green PCR Kit* (Kapa) dan *Ready to Go PCR Kit* (GE Healthcare) dengan primer spesifik SCSMV. Campuran cDNA dan primer didenaturasi pada suhu 94°C selama 1 menit, kemudian reaksi dilanjutkan dengan 35 siklus pada

94°C selama 30 detik, 45–53°C selama 5 detik, dan 74°C selama 30 detik dengan tahapan akhir berupa pemanjangan untai DNA pada 74°C selama 5 menit. Hasil PCR divisualisasi pada gel agarosa dan dielektroforesis di dalam bufer *Tris-borate-EDTA* (TBE). Hasil elektroforesis diwarnai dengan etidium bromida dan didokumentasi dengan *gel doc*. Observasi dilakukan terhadap ada tidaknya pita. Adanya pita menunjukkan bahwa bahan tanaman masih mengandung virus, sebaliknya jika tidak ditemukan pita maka bahan tanaman dinyatakan bebas dari virus.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Organogenesis

Secara umum, ketiga varietas tebu memberikan respons *in vitro* yang baik untuk induksi kalus. Kalus tersebut terinisiasi pada minggu kedua. Pemindahan kalus pada media yang sama (MS + 2,4-D 3 mg/l + CH 3 g/l) dilakukan agar kalus mampu berproliferasi. Proses subkultur tersebut berhasil memacu proliferasi kalus dengan lebih cepat. Kalus dapat berkembang menjadi tunas setelah dipindahkan ke media

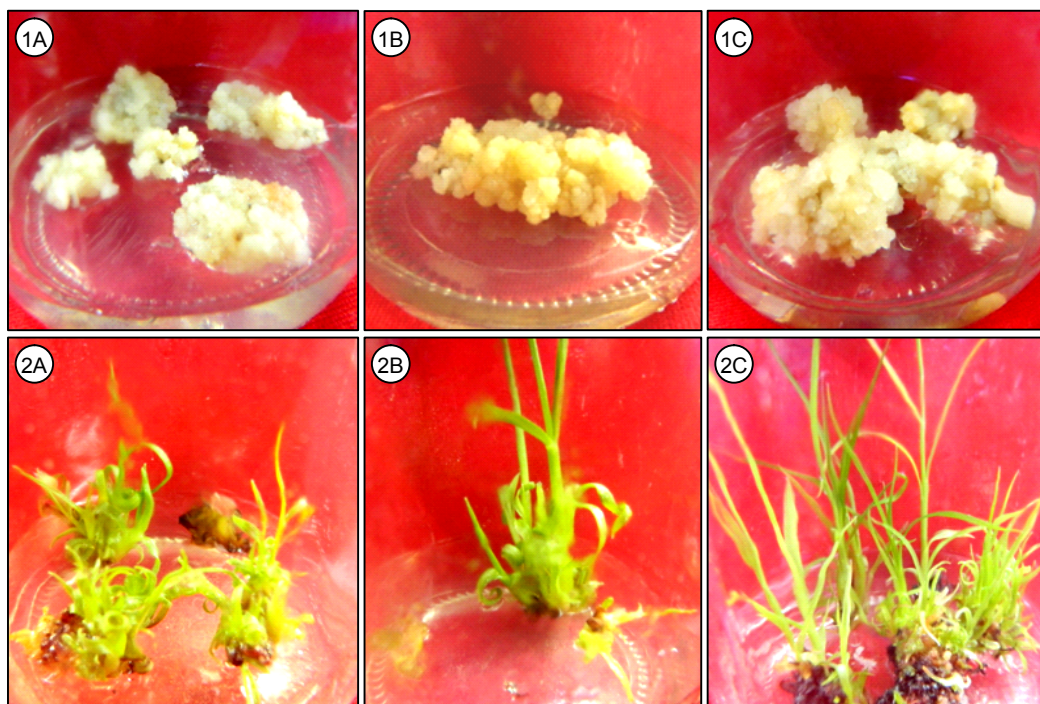
regenerasi (Gambar 1), baik kalus yang berasal dari perlakuan SK0, SK1, maupun SK2. Tunas yang dihasilkan mampu berkembang secara sempurna membentuk planlet pada media yang sama.

Krioterapi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa baik apeks maupun tunas pucuk ketiga varietas yang diuji dapat bertahan hidup pasca-perlakuan prakultur dengan sukrosa 0,3 M. Hasil serupa dilaporkan oleh Roostika *et al.* (2015) untuk tebu varietas PS864. Perlakuan prakultur tersebut diperlukan untuk meningkatkan toleransi jaringan tanaman terhadap cekaman dehidrasi sepanjang tahapan kriopreservasi. Tahapan prakultur dilaporkan mampu menurunkan kandungan air di dalam jaringan tanaman oleh karena adanya tekanan osmosis seiring dengan penyerapan gula sehingga konsentrasi cairan sitoplasma meningkat (Panis *et al.*, 2005). Prakultur juga dilaporkan dapat mempertahankan integritas membran dan struktur protein selama dehidrasi. Hasil penelitian Zhu *et al.* (2006) menunjukkan bahwa prakultur dapat mengubah komposisi gula dan sterol. Gula merupakan

Tabel 1. Primer yang digunakan untuk deteksi virus mosaik tanaman tebu.

Nama primer	Sekuen primer (5'–3')	Posisi	Ukuran (bp)	Referensi
SCSMV cpF	GTGGGTTTCAGTTCTCGGTTTC	<i>Coat protein</i>	500	Damayanti dan Putra (2011); Hema <i>et al.</i> (2003)
SCSMV-AP3	TTTTTTCCTCCTCACGGGGCAGGTTGATTG			

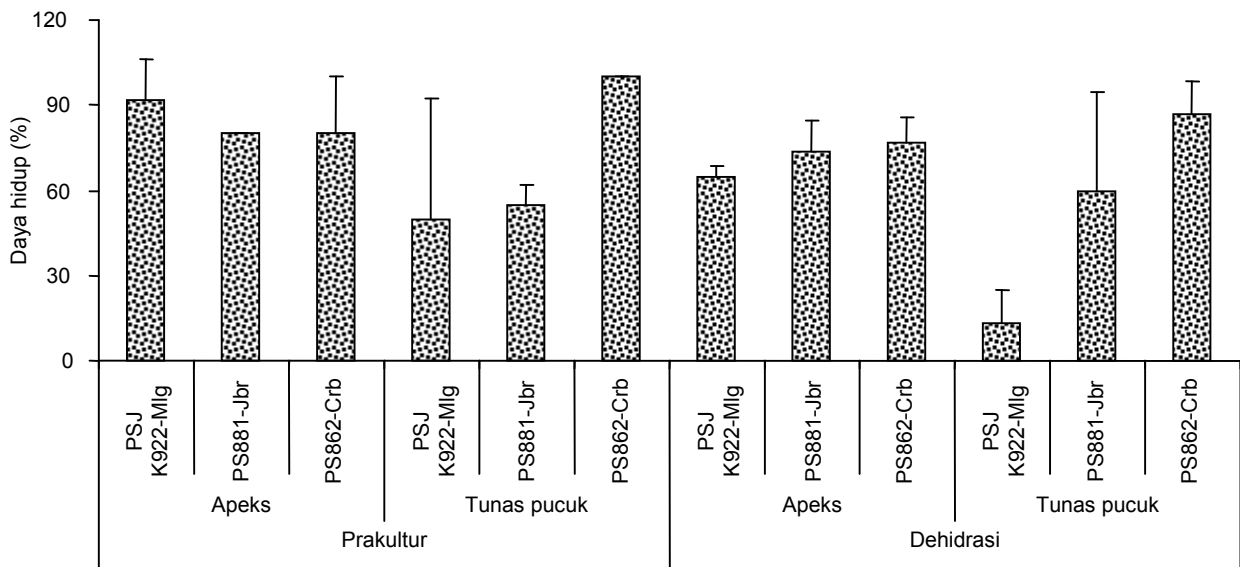


Gambar 1. Tahapan regenerasi kalus tebu menjadi tunas. 1 = tahap proliferasi kalus, 2 = tahap regenerasi tunas, A = PS862-Crb, B = PS881-Jbr, C = PSJK922-Mlg.

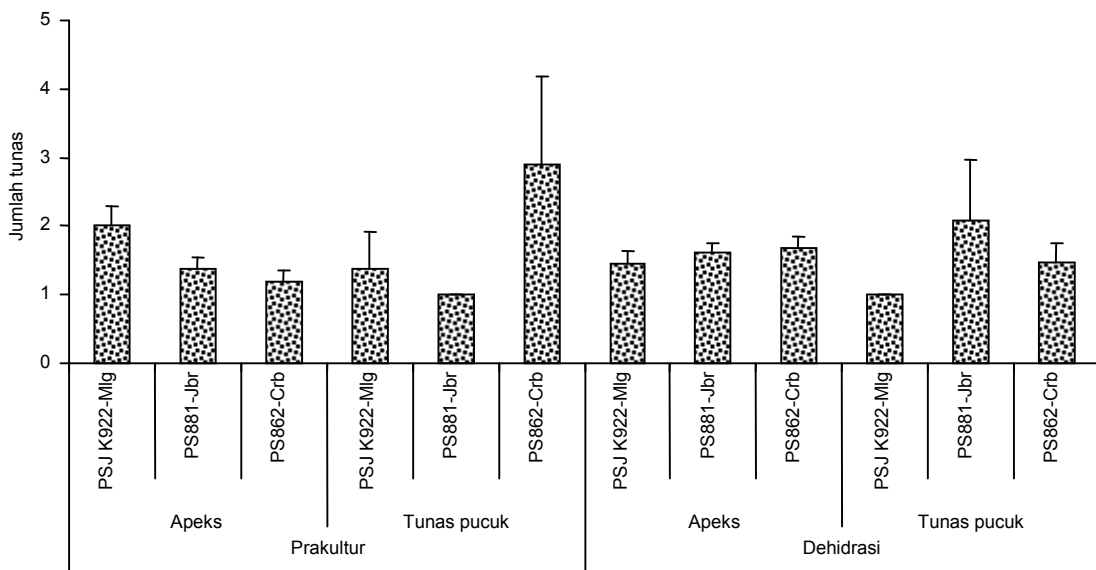
komponen penting yang berperan dalam osmosis dan penurunan titik beku, pemelihara membran bilayer, dan penstabil protein selama pembekuan, sedangkan sterol merupakan salah satu komponen penyusun membran sel dan berperan penting dalam stabilisasi dan permeabilitas membran sel.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan respons dari jenis eksplan apeks dan tunas pucuk terhadap perlakuan dehidrasi dengan larutan PVS2 (Gambar 2–4). Perbedaan respons juga terjadi antarvarietas. Pascadehidrasi jaringan, tunas pucuk PS862-Crb memiliki daya hidup yang paling tinggi dan tunas pucuk PSJK922-Mlg memiliki daya hidup yang

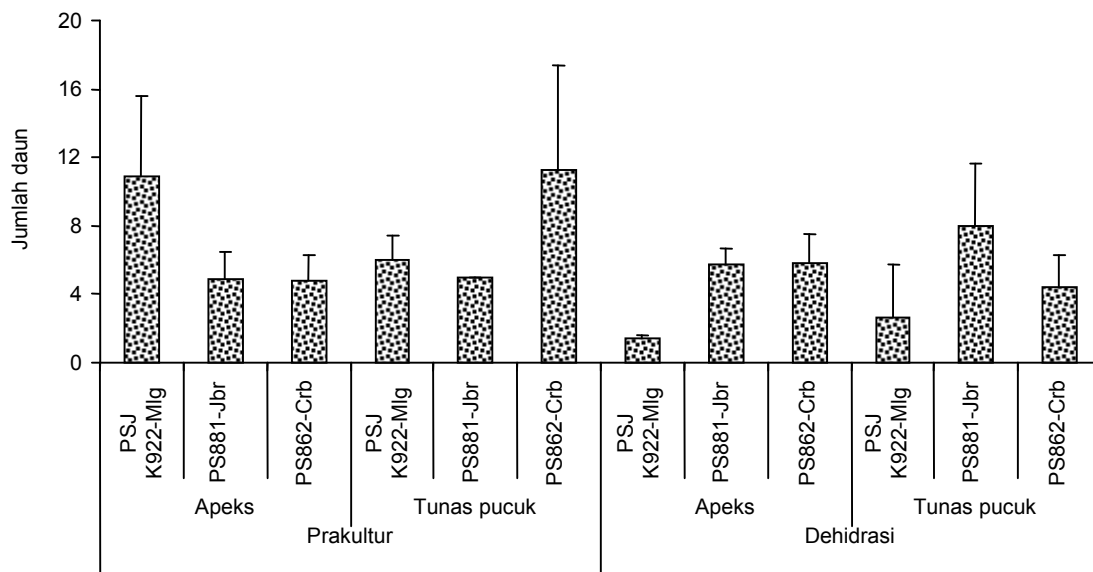
paling rendah (Gambar 2). Pada umur 4 minggu setelah tanam (MST), daya hidup eksplan apeks dan tunas pucuk ketiga varietas yang diuji cenderung sama dengan yang diperoleh sebelumnya pada varietas PS864, yaitu lebih dari 60% (Roostika *et al.*, 2015), kecuali untuk eksplan tunas pucuk PSJK922-Mlg. Pada kegiatan krioterapi, daya hidup eksplan pascadehidrasi sangat menentukan daya hidup eksplan setelah direndam di dalam nitrogen cair. Hal tersebut berkaitan dengan kandungan air di dalam jaringan eksplan. Kandungan air yang tinggi di dalam jaringan dapat membahayakan eksplan ketika dibekukan di dalam nitrogen cair karena air tersebut



Gambar 2. Daya hidup eksplan apeks dan tunas pucuk tiga varietas tebu pasca-prakultur dan dehidrasi pada 4 MST.



Gambar 3. Jumlah tunas dan daun yang terbentuk dari eksplan apeks dan tunas pucuk tiga varietas tebu pasca-perlakuan prakultur dan dehidrasi pada 4 MST.



Gambar 4. Jumlah tunas dan daun yang terbentuk dari eksplan apeks dan tunas pucuk tiga varietas tebu pasca-perlakuan prakultur dan dehidrasi pada 4 MST.

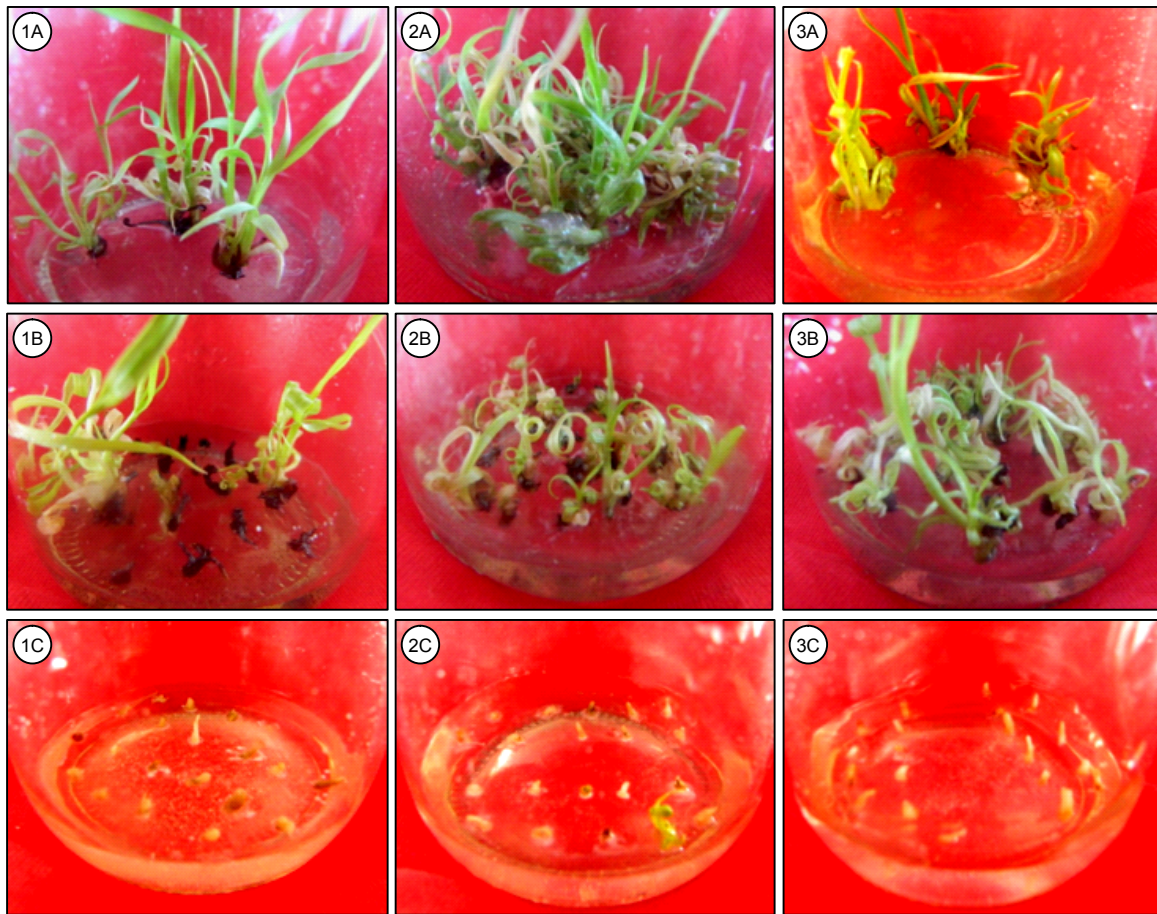
dapat memicu terbentuknya kristalisasi es yang bersifat merusak membran dan organel sel. Sebaliknya, kandungan air yang terlalu rendah juga dapat menurunkan daya hidup eksplan karena reaksi enzimatik untuk metabolisme menjadi terhambat. Condello *et al.* (2011) dan Maslanka *et al.* (2013) melaporkan bahwa dehidrasi dapat meningkatkan daya hidup dan regenerasi eksplan pasca-pembekuan jaringan dengan nitrogen cair. Salah satu komponen yang terkandung dalam PVS2 adalah DMSO. Menurut Momose *et al.* (2010), DMSO dapat meningkatkan ekspresi gen-gen yang terlibat dalam sintesis protein dan asam lemak, pembentukan dinding sel, dan akumulasi senyawa dengan berat molekul rendah, seperti gliserol, arginin, dan prolin. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa hanya varietas PS862-Crb yang dapat bertahan hidup dan tumbuh kembali pasca-perlakuan krioterapi di dalam nitrogen cair (Gambar 5 dan 6). Ini mengindikasikan bahwa keberhasilan penerapan teknik krioterapi dipengaruhi oleh varietas atau bersifat *genotype-dependent*. Selain itu, diduga bahwa kondisi sumber eksplan dari lapang turut memengaruhi tingkat keberhasilan krioterapi. Secara visual, kondisi tanaman PSJK922-Mlg dan PS881-Jbr menunjukkan gejala penyakit mosaik yang lebih parah daripada PS862-Crb yang ditandai dengan garis-garis klorosis yang lebih banyak dan berwarna kuning.

Indeksing Virus

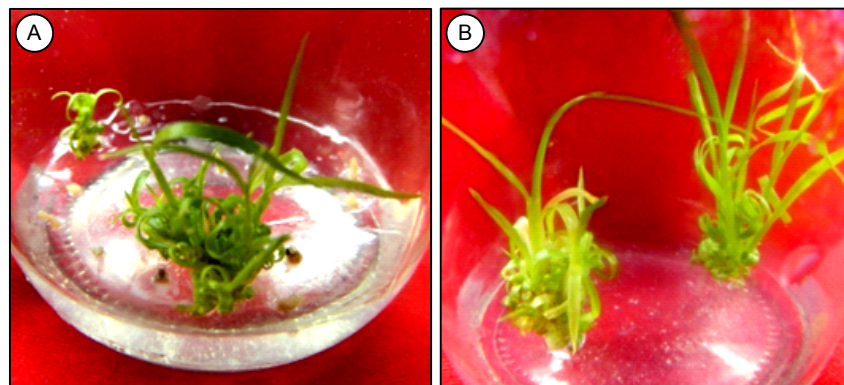
Hasil penelitian menunjukkan bahwa kalus dapat terbentuk mulai 2 MST dan kalus tersebut mampu berproliferasi pada media yang sama, baik dengan

atau tanpa proses subkultur. Begitu pula, kalus mampu beregenerasi membentuk tunas dan planlet setelah dipindahkan ke media regenerasi, yaitu MS dengan penambahan BA 0,5 mg/l, IBA 0,5 mg/l, dan PVP 100 mg/l. Hasil indeksing menunjukkan bahwa organogenesis tidak mampu mengeliminasi virus SCSMV (Gambar 7 dan Tabel 2), walaupun telah dilakukan subkultur kalus hingga dua kali. Hal ini terjadi karena organ yang dihasilkan dengan teknik organogenesis kemungkinan masih terhubung dengan jaringan asalnya (eksplan) melalui jaringan vaskuler. Berbeda dengan embrio somatik yang dihasilkan dari teknik embriogenesis somatik, tidak terhubung lagi dengan jaringan eksplan karena memiliki jaringan vaskuler yang terpisah.

Berbeda dengan hasil penelitian ini, Naz *et al.* (2009) melaporkan bahwa organogenesis dapat mengeliminasi SCMV dengan tingkat keberhasilan sebesar 61,11% jika dideteksi secara serologi dan 40% jika dideteksi dengan mikroskop elektron. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa teknik *sieving* atau pemisahan kalus mikro dapat membebaskan virus. Semakin kecil ukuran kalus mikro, semakin banyak kalus yang terbebas dari virus. Dari kalus mikro yang berdiameter 250 μm , 300 μm , dan 425 μm masing-masing dihasilkan 25 planlet, 9 planlet, dan 5 planlet yang bebas *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) pada tembakau berdasarkan uji RT-PCR (Naz *et al.*, 2009). Selain itu, Damba *et al.* (2013) juga melaporkan bahwa kultur kalus dapat mengeliminasi *Cassava mosaic virus* pada ubi kayu dengan tingkat keberhasilan sebesar 87,5%. Parmessur *et al.*



Gambar 5. Penampilan biakan varietas tebu. 1 = PSJK922-Mlg, 2 = PS862-Crb, 3 = PS881-Jbr. A = pasca-prakultur, B = dehidrasi, C = krioterapi dengan nitrogen cair.

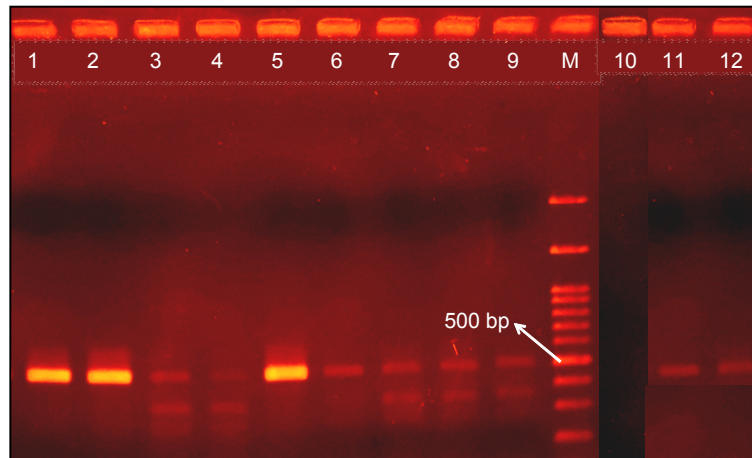


Gambar 6. Biakan tebu PS862-Crb yang berhasil bermultiplikasi pascakrioterapi dengan nitrogen cair. A = tahap pemulihan, B = tahap regenerasi.

(2002) bahkan berhasil mengeliminasi *Sugarcane yellow leaf virus* pada tebu dengan tingkat keberhasilan sebesar 100% melalui kultur kalus.

Berbeda dengan teknik organogenesis yang gagal mengeliminasi SCSMV, dalam penelitian ini teknik krioterapi terbukti mampu mengeliminasi virus tersebut (Gambar 7) dengan proporsi sebesar satu

per tiga atau 33,3% (Tabel 3). Menurut Wang dan Valkonen (2012), teknik krioterapi mampu mengeliminasi virus karena infeksi virus biasa terjadi di daerah basal apeks, sedangkan jaringan yang bertahan hidup setelah perlakuan krioterapi adalah meristem. Menurut Feng *et al.* (2011), cekaman fisik selama proses dehidrasi sebelum pembekuan dan



Gambar 7. Hasil uji RT-PCR sampel tebu pasca-perlakuan organogenesis (1–9) dan krioterapi (10–12).

Tabel 2. Data indekasing SCSMV pada biakan hasil organogenesis dan krioterapi.

Nama sampel	Skoring pita DNA	Keterangan
Organogenesis SK0		
PSJK922-Mlg	+	Positif SCSMV
PS862-Crb	+	Positif SCSMV
PS881-Jbr	+	Positif SCSMV
Organogenesis SK1		
PSJK922-Mlg	+	Positif SCSMV
PS862-Crb	+	Positif SCSMV
PS881-Jbr	+	Positif SCSMV
Organogenesis SK2		
PSJK922-Mlg	+	Positif SCSMV
PS862-Crb	+	Positif SCSMV
PS881-Jbr	+	Positif SCSMV
Krioterapi		
PS862-Crb Cryo 1	+	Positif SCSMV
PS862-Crb Cryo 2	-	Negatif SCSMV
PS862-Crb Cryo 3	+	Positif SCSMV

SK0 = tanpa subkultur, SK1 = subkultur sekali, SK2 = subkultur dua kali, Cryo = setelah perlakuan krioterapi.

Tabel 3. Tingkat keberhasilan metode eliminasi virus SCSMV pada tebu.

Perlakuan	Jumlah planlet bebas SCSMV	Proporsi planlet bebas SCSMV (%)
Organogenesis tanpa subkultur (SK0)	0/3	0
Organogenesis dengan subkultur sekali (SK1)	0/3	0
Organogenesis dengan subkultur dua kali (SK2)	0/3	0
Krioterapi	1/3	33,3

proses rehidrasi setelah pembekuan menyebabkan sel-sel tanaman pada bagian *leaf primordia* LP3, LP4, LP5, dan bagian basal menjadi mati sehingga virus tidak dapat bertahan hidup. Dengan matinya sel-sel di daerah basal, secara otomatis virus tidak mampu melakukan replikasi. Dengan demikian, planlet yang dihasilkan dari krioterapi dapat terbebas dari virus. Dalam hal ini, tingkat keberhasilan eliminasi virus tidak hanya dipengaruhi oleh jaringan yang bertahan

hidup, namun juga disebabkan oleh intensif tidaknya hubungan inang dengan virus. Dilaporkan bahwa eliminasi virus *Raspberry bushy dwarf virus* (RBDV) dapat berhasil dilakukan ketika teknik krioterapi dikombinasikan dengan termoterapi (Wang dan Valkonen, 2012).

KESIMPULAN

Seluruh varietas yang diuji mampu membentuk kalus dan tunas, baik tanpa atau melalui proses subkultur. Varietas PS862-Crb memiliki respons *in vitro* yang lebih baik daripada PS881-Jbr dan PSJK922-Mlg dalam merespons perlakuan krioterapi. Teknik organogenesis tidak mampu mengeliminasi SCSMV pada tebu, walaupun telah melalui proses subkultur sebanyak dua kali. Teknik krioterapi dapat mengeliminasi SCSMV dengan proporsi sebesar satu pertiga (33%).

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian yang telah mendanai penelitian ini melalui Program KKP3N 2015. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Alfia An Nur Azizi dan Joko Tamami yang turut membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Babu, B., V. Hegde, T. Makesh Kumar, and M.L. Jeeva. 2012. Rapid and sensitive detection of potyvirus infecting tropical tuber crops using genus specific primers and probes. *Afr. J. Biotechnol.* 11(5):1023–1027.
- Condello, E., E. Caboni, E. Andre, B. Piette, P. Duart, R. Swennen, and B. Panis. 2011. Cryopreservation of apple *in vitro* axillary buds using droplet-vitrification. *CryoLetters* 32(2):175–185.
- Damayanti, T.A. and L.K. Putra. 2011. First occurrence of *Sugarcane streak mosaic virus* infecting sugarcane in Indonesia. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:72–74.
- Damba, Y., A.K. Quainoo, and E.N.K. Sowley, 2013. Effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the *Cassava mosaic virus* from infected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plant materials. *IJSTR* 2(11):282–287.
- Feng, C., Z. Yin, Y. Ma, Z. Zhang, L. Chen, B. Wang, and B. Li. 2011. Cryopreservation of sweet potato (*Ipomoea batatas*) and its pathogen eradication by cryotherapy. *Biotechnol. Adv.* 29:84–93.
- Hu, G.J., N. Hong, L.P. Wang, H.J. Hu, and G.P. Wang. 2012. Efficacy of virus elimination from *in vitro*-cultured sand pear (*Pyrus pyrifolia*) by chemotherapy combined with thermotherapy. *Crop Prot.* 37:20–25.
- Hema, M., N. Kirthi, P. Sreenivasulu, and H.S. Savithri. 2003. Development of recombinant coat protein antibody based IC-RT-PCR for detection and discrimination of *Sugarcane streak mosaic virus* isolates from Southern India. *Arch. Virol.* 148(6):1185–1193.
- Kristini, A., E.M. Achadian, I.L.K. Putra, T. Dianpratiwi, M. Mulyadi, dan Murwandono. 2008. Potret penyakit tebu di Jawa: Distribusi dan dominasi penyakit-penyakit tebu penting. *MPG* 44(4):205–218.
- Maslanka, M., B. Panis, and A. Bach. 2013. Cryopreservation of *Galanthus elwesii* Hook, apical meristems by droplet vitrification. *CryoLetters* 34(1):1–9.
- Momose, Y., R. Matsumoto, A. Maruyama, and M. Yamaoka. 2010. Comparative analysis of transcriptional responses to the cryoprotectants, dimethyl sulfoxide and trehalose, which confer tolerance to freeze-thaw stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cryobiology* 60:245–261.
- Naz, S., F.A. Siddiqui, A. Ali, and J. Iqbal. 2009. Virus indexation of *in vitro* regenerated sugarcane plants. *Pak. J. Bot.* 41(4):1931–1939.
- Panis, B., B. Piette, and R. Swennen. 2005. Droplet vitrification of apical meristems: A cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 168:45–55.
- Parmessur, Y., S. Aljanabi, S. Saumtally, and A. Dookun-Saumtally. 2002. *Sugarcane yellow leaf virus* and sugarcane yellows phytoplasma: Elimination by tissue culture. *Plant Pathol.* 51:561–566.
- Putra, L.K. dan T.A. Damayanti. 2009. Penyakit *streak mosaic* pada tebu di Indonesia: Survei lapang, deteksi virus, uji penularan, kisaran inang, dan ketahanan varietas. *MPG* 45(1):19–35.
- Retheesh, S.T. and A.I. Bhat. 2010. Simultaneous elimination of *Cucumber mosaic virus* and *Cymbidium mosaic virus* infecting *Vanilla planifolia* through meristem culture. *Crop Prot.* 29:1214–1217.
- Roostika, I., R.P.D.L. Wati, dan D. Efendi. 2015. Dehidrasi dan pembekuan jaringan apeks tebu untuk penyimpanan jangka panjang. *J. Litri* 21(1):25–32.
- Sakai, A. 1993. Cryogenic strategies for survival of plant culture cells and meristem cooled to -196°C. In: *Cryopreservation of Plant Genetic Resources. Issue 6 of Technical Assistance Activities for Genetic Resources Projects. Japan International Cooperation Agency, Japan.* p. 5–26.
- Shatnawi, M., G. Anfoka, R. Shibli, M. Al-Mazra'awi, W. Shahrour, and A. Arebiat. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turk. J. Agric. For.* 35:173–184.
- Sholeh, A. 2015. Deteksi *Sugarcane mosaic virus* pada tebu (*Saccharum officinarum* L.) menggunakan metode *reverse transcription-polymerase chain reaction*. Skripsi S1, Universitas Jember, Jember.
- Wang, Q. and J.P.T. Valkonen. 2012. Cryopreservation of shoot tips: Novel pathogen eradication method. *Trends Sci.* 14(3):119–122.

Wang, Q., M. Mawassi, P. Li, R. Gafny, I. Sela, and E. Tanne. 2003. Elimination of *Grape vine virus A* (GVA) by cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 165:321–327.

Zhu, G-Y, J.M.C. Geuns, S. Dussert, R. Swennen, and B. Panis. 2006. Change in sugar, sterol, and fatty acid composition in banana meristems caused by sucrose-induced acclimation and its effects on cryopreservation. *Physiol. Plant.* 128:80–94.
