

PENGUNAAN ASAM FUSARAT DALAM SELEKSI *IN VITRO* UNTUK RESISTENSI ABAKA TERHADAP *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

RULLY DYAH PURWATI¹⁾, UNTUNG SETYO-BUDI¹⁾, SUDARSONO²⁾

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat
Jalan Raya Karangploso, P.O. Box 199, Malang 65000

²⁾ PMB Lab, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor
Jalan Meranti-Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680

ABSTRAK

Penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans (*Foc*) merupakan penyakit yang banyak menyerang tanaman *Musa* sp. (termasuk abaka) dan dapat menurunkan produktivitas serat antara 20-65%. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut adalah penggunaan klon abaka yang resisten. Seleksi *in vitro* dengan menggunakan agens penyeleksi asam fusarat (AF) merupakan metode yang efektif untuk memperoleh klon abaka resisten terhadap infeksi *Foc*. Pengkulturan kalus embriogen dan tunas abaka pada medium tunas (MT) yang mengandung berbagai konsentrasi AF digunakan untuk mengetahui pengaruh daya hambat AF. Konsentrasi sub-lethal ditentukan sebagai konsentrasi yang paling tinggi menghambat proliferasi kalus embriogen dan tunas abaka. Seleksi *in vitro* untuk mengidentifikasi embrio somatik yang insensitif AF dilakukan dengan konsentrasi sub-lethal. Setelah regenerasi dan aklimatisasi *plantlet*, klon abaka hasil regenerasi ditanam di rumah kaca untuk pengujian ketahanan terhadap *Foc* menggunakan metode *detached leaf dual culture*. Penelitian ini bertujuan untuk (1) mengevaluasi daya hambat pertumbuhan kalus embriogen abaka, (2) mengetahui konsentrasi sub-lethal AF, (3) mengidentifikasi varian embrio somatik abaka yang insensitif AF melalui seleksi *in vitro* yang dilanjutkan dengan regenerasi *plantlet*, dan (4) mengevaluasi resistensi *plantlet* hasil regenerasi terhadap infeksi *Foc*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa AF menghambat pertumbuhan kalus embriogen dan tunas abaka, sedangkan konsentrasi sub-lethal AF adalah 50 mg/l. Dari seleksi *in vitro* dihasilkan 85 *plantlet* klon Tangongon dan 28 *plantlet* klon Sangihe-1 yang diregenerasikan dari embrio somatik yang insensitif AF. Genotipe asli Tangongon termasuk dalam kelompok sangat rentan terhadap infeksi *Foc*, sedangkan dua dari tiga varian dari klon Tangongon yang diuji menunjukkan resisten dan satu agak rentan. Pada penelitian ini, pengujian resistensi terhadap infeksi *Foc* varian yang berasal dari klon Sangihe-1 belum dapat dilakukan karena *plantlet* masih terlalu kecil sehingga belum dapat diaklimatisasi.

Kata kunci: Abaka, *Musa textilis* Nee., penyakit, *Fusarium*, keragaman somaklonal, toksin cendawan, Jawa Timur

ABSTRACT

The usage of fusaric acid (FA) in vitro selection of abaca resistant to Fusarium Oxysporum f. sp. cubense

Wilt *Fusarium* disease caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans (*Foc*) is one of the major diseases of *Musa* sp. including abaca, and it could decrease 20-65% fiber productivity. One of the method to solve this problem is utilization of abaca resistant clones. *In vitro* selection using fusaric acid (FA) as selective agents is an effective method to produce abaca resistant clones to *Foc* infection. Culturing abaca embryogenic calli (EC) and shoots on MT medium containing various FA concentrations was used to determine FA inhibition effects. Sub-lethal concentration was defined as one inhibiting > 90% proliferation of abaca EC and shoots. *In vitro* selection to identify FA insensitive SE was conducted using FA sub-lethal concentration. Following *plantlet* regeneration and acclimatization, the regenerated abaca lines were grown in the glasshouse for testing against *Foc* using detached

leaf dual culture test. The objectives of this study were to (1) evaluate growth inhibition of abaca EC and shoots by FA, (2) determine sub-lethal concentration of FA, (3) identify FA insensitive variants of abaca somatic embryos (SE) through *in vitro* selection followed by *plantlet* regeneration, and (4) evaluate resistance of regenerated *plantlets* against *Foc* infection. Results of the experiment showed FA inhibited abaca EC and shoots growth while sub-lethal concentration of FA was 50 mg/l. Following *in vitro* selection, 85 *plantlets* of Tangongon and 28 of Sangihe-1 were regenerated from FA insensitive SE. The original Tangongon genotype was very susceptible against *Foc* infection. Meanwhile, among three *Foc* tested lines derived from Tangongon, two lines were considered resistant and one was slightly susceptible. However, resistance against *Foc* of variants derived from Sangihe-1 have not been evaluated in this experiment due to the *plantlets* were not strong enough to be acclimatized.

Key words: Manila hemp, *Musa textilis* Nee., pest, *Fusarium*, somaclonal variation, fungal toxin, East Java

PENDAHULUAN

Tanaman abaka (*Musa textilis* Nee) atau dikenal sebagai Manila hemp (Manila henep) merupakan tanaman sejenis pisang yang menghasilkan serat dari pelepah daun (batang semu). Dengan adanya kemajuan teknologi, serat abaka yang tadinya hanya digunakan untuk tali-temali kini banyak digunakan pada berbagai industri seperti: industri kertas berkualitas tinggi, tekstil, kabel bawah laut, pampers (popok bayi), dan lain-lain. Kebutuhan serat abaka di pasar dunia juga cukup tinggi yaitu sebesar 600.000 ton serat per tahun (BI, 2003). Keadaan ini membuka peluang bagi Indonesia untuk mengembangkan abaka, didukung dengan agroklimat yang cocok untuk pengembangan abaka. Namun pengembangan abaka di Indonesia menghadapi beberapa kendala, salah satunya adalah serangan penyakit layu yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp. *cubense* (E.F. Smith) Snyder & Hans yang dapat menurunkan produktivitas serat hingga 20-65% (BASTASA dan BALIAD, 2005).

Hingga saat ini, klon abaka yang resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (*Foc*) belum tersedia. Hasil penelitian PURWATI (2007) menunjukkan dari 10 klon abaka yang diuji, sembilan klon tergolong sangat rentan dan satu klon tergolong rentan terhadap infeksi *Foc* isolat Banyuwangi (*Foc* Bw). Mengingat penggunaan klon abaka yang resisten merupakan metode

yang paling efektif untuk pengendalian *Foc* (PLOETZ, 2000), pengembangan klon abaka yang resisten *Foc* penting untuk dilakukan di Indonesia. Keberhasilan upaya tersebut perlu didampingi dengan peningkatan keragaman genetika abaka menggunakan kombinasi perlakuan mutagenesis dan perbanyakan tanaman secara *in vitro*. Mutagenesis dengan menggunakan mutagen kimia EMS (*Ethyl Methanesulphonate*) telah banyak dilakukan pada berbagai spesies tanaman. EMS merupakan kelompok alkyl yang dapat mengubah basa-basa DNA (guanin dan timin) menjadi basa lain dan akan berpasangan dengan basa yang berbeda sehingga terjadi transisi (RUSSELL, 1992). EMS telah terbukti dapat menghasilkan mutan antara lain: daun variegata pada *Arabidopsis* (CHEN *et al.*, 2000; SAKAMOTO *et al.*, 2002), ketahanan terhadap *lincomycin* dan *streptomycin* pada cabe merah (RAO *et al.*, 1997) dan jumlah cabang yang lebih banyak pada kenaf (ARUMINGTYAS dan INDRIYANI, 2005).

Mutan/varian yang resisten terhadap infeksi *Foc* dapat diidentifikasi melalui seleksi secara *in vitro* dalam media dengan penambahan asam fusarat (AF). Sebagai *non-host specific toxin* yang disekresikan oleh *Foc* dalam proses infeksi (BACON *et al.*, 1996), AF terbukti berkorelasi positif dengan virulensi isolat *Foc* terhadap tanaman inang. Karena AF merupakan komponen penting dalam proses infeksi, tanaman inang yang insensitif terhadap AF diduga juga resisten/toleran terhadap infeksi *Foc*. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel/jaringan mutan/varian insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur abaka yang resisten/toleran terhadap infeksi *Foc*. Identifikasi mutan/varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* telah dilakukan pada tanaman tomat (TOYODA *et al.*, 1984), pisang (MORPURGO *et al.*, 1994; MATSUMOTO *et al.*, 1995), gladiol (REMOTTI *et al.*, 1997), dan nanas (BORRAS *et al.*, 2001). Pada tanaman *Brassica napus*, mutasi dengan EMS dan seleksi *in vitro* menggunakan asam oksalat menghasilkan 2 mutan yang resisten terhadap *Sclerotinia sclerotiorum* pada tingkat bibit (LIU *et al.*, 2005). Seleksi *in vitro* menggunakan 0,5 mM AF meningkatkan toleransi tanaman gladiol terhadap toksin asam fusarat, namun menurunkan kemampuan regenerasi sel/jaringan (REMOTTI *et al.*, 1997). Kombinasi mutagenesis menggunakan EMS dan seleksi *in vitro* pada media yang mengandung 0,1 mM AF menghasilkan tanaman pisang (*Musa* sp.) yang toleran terhadap *Foc* dari kultivar rentan pada pengujian di rumah kaca (MATSUMOTO *et al.*, 1995).

Untuk memperoleh klon abaka yang resisten terhadap infeksi *Foc*, perlu dilakukan beberapa upaya antara lain: memperbesar peluang keberhasilan isolasi sel/jaringan mutan/varian yang insensitif terhadap AF dengan menggunakan metode kultur kalus embriogen, meningkatkan keragaman genetika kalus embriogen abaka dengan perlakuan EMS, menentukan konsentrasi AF sub-lethal

untuk memperkecil peluang terjadinya *escape*, dan menyeleksi secara *in vitro* kalus embriogen abaka selama tiga kali siklus seleksi, masing-masing siklus selama tiga bulan dalam media dengan penambahan AF sub-lethal. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini bertujuan untuk (1) mengevaluasi daya hambat asam fusarat (AF) terhadap pertumbuhan kalus/tunas abaka, (2) menentukan konsentrasi sub-lethal AF, yaitu konsentrasi yang mempunyai daya hambat paling tinggi terhadap pertumbuhan dan proliferasi tunas abaka, (3) meregenerasikan sel/jaringan varian yang insensitif AF menjadi *plantlet* abaka, dan (4) mengevaluasi respons *plantlet* yang diperoleh dari hasil seleksi *in vitro* terhadap infeksi *Foc*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilaksanakan mulai bulan April 2004 sampai dengan Juni 2006 di Laboratorium Kultur Jaringan, Balai Penelitian Tanaman Tembakau dan Serat, Malang, meliputi beberapa tahap sebagai berikut:

Daya Hambat AF

Percobaan untuk menentukan besarnya daya hambat AF terhadap proliferasi jaringan kalus embriogen abaka dilakukan dengan menanam eksplan dalam media induksi tunas (MT) abaka (media MS dengan penambahan BAP 0,5 mg/l dan asam askorbat 100 mg/l) dengan penambahan AF (Sigma-Aldrich Co.) 30, 45, atau 60 mg/l dan mengamati perkembangan embrio somatikanya. Penanaman kalus embriogen dalam media MT tanpa penambahan AF (0 mg/l) digunakan sebagai pembandingan.

Eksplan kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 dengan ukuran $\pm 3 \times 3 \times 3$ mm³ ditanam dalam media selektif yang telah disiapkan. Satuan percobaan terdiri atas satu kalus yang ditanam dalam satu botol kultur dan setiap perlakuan diulang 20 kali. Kalus disubkultur tiga kali dalam periode lima bulan ke media selektif yang sama. Inkubasi kultur dilakukan dalam ruang kultur bersuhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dan dengan penyinaran 1.000 lux selama 16 jam menggunakan lampu TL. Pengamatan terhadap persentase kalus embriogen yang mampu membentuk tunas, jumlah tunas per eksplan dan penurunan jumlah tunas dilakukan pada akhir percobaan (setelah lima bulan dalam media selektif).

Daya hambat AF juga ditentukan dengan menanam tunas abaka ke dalam media MT dengan penambahan AF 40, 45, atau 50 mg/l. Tunas yang ditanam dalam media MT tanpa penambahan AF (0 mg/l) digunakan sebagai pembandingan. Tunas abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 hasil kultur jaringan dengan tinggi tunas 2-3 cm ditanam dalam media selektif yang telah disiapkan. Satuan

percobaan terdiri atas satu tunas yang ditanam dalam satu botol kultur dan setiap perlakuan diulang 30 kali. Tunas disubkultur tiga kali dalam periode tiga bulan ke media selektif yang sama. Inkubasi kultur dilakukan dalam ruang kultur bersuhu $25 \pm 2^\circ\text{C}$ dan dengan penyinaran 1.000 lux selama 16 jam menggunakan lampu TL.

Pengamatan terhadap persentase kematian dan tingkat kerusakan tunas dilakukan pada akhir percobaan (setelah 3 bulan dalam media selektif). Tingkat kerusakan tunas ditentukan berdasarkan skoring sebagaimana dilakukan oleh EPP (1987) dengan sedikit modifikasi, yaitu: skor 0 – tunas sehat dan hijau, serta tidak mengalami gejala penguningan daun; skor 1 – daun bagian bawah sedikit menguning tetapi tunas tumbuh normal atau tunas tetap hijau tetapi pertumbuhannya terhambat; skor 2 – pangkal batang mulai membusuk dan pertumbuhan tunas terhambat, daun yang menguning semakin meluas, dan daun yang baru membuka berwarna kuning pucat; skor 3 – pangkal batang membusuk dan pertumbuhan tunas terhambat, seluruh daun telah menguning; skor 4 – tunas membusuk dan mati (PURWATI, 2007).

Peningkatan Keragaman Abaka dengan EMS

Untuk meningkatkan frekuensi mutan/varian, kalus embriogen abaka diberi perlakuan mutagenesis menggunakan larutan *ethyl methanesulphonate* (EMS). Sebanyak masing-masing 100 kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 (ukuran $3 \times 3 \times 3 \text{ mm}^3$) direndam dengan larutan EMS 0,6% selama dua jam dan digojok menggunakan *shaker* berkecepatan 100 rpm dalam ruangan bersuhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Untuk memperbanyak biomasa, kalus embriogen yang telah diberi perlakuan EMS diproliferasikan dalam media induksi kalus (MK) abaka dengan komposisi: media MS ditambah BAP 5 mg/l, Thidiazuron 0,4 mg/l dan asam askorbat 100 mg/l (MARISKA dan SUKMAJAYA, 2003) selama 6 bulan, diinkubasikan dalam ruangan bersuhu $28 \pm 2^\circ\text{C}$, dan diberi penyinaran 1.000 lux selama 16 jam menggunakan lampu TL.

Seleksi *In Vitro* dengan AF

Kalus embriogen yang telah diberi perlakuan EMS (300 potong untuk klon Tangongon dan 250 potong kalus untuk klon Sangihe-1 dengan ukuran $3 \times 3 \times 3 \text{ cm}^3$) diseleksi secara *in vitro* dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l. Eksplan disub-kultur ke dalam media selektif yang sama yang masih segar setiap dua bulan selama periode enam bulan. Pengamatan dilakukan terhadap persentase kalus embriogen yang mampu bertahan hidup dan bertunas, serta rata-rata jumlah tunas yang

terbentuk per kalus embriogen setelah enam bulan periode seleksi. Selanjutnya, tunas abaka insensitif AF hasil seleksi *in vitro* ditanam dalam media MT hingga mencapai ukuran 2-3 cm sebelum diaklimatisasi dan dievaluasi responnya terhadap infeksi *Foc*.

Evaluasi Tunas Varian Hasil Seleksi *In Vitro*

Tunas abaka insensitif AF hasil seleksi *in vitro* dievaluasi responnya terhadap infeksi *Foc* Bw secara tidak langsung dengan metode *detached leaf dual culture test* (PRATT, 1996). Tujuh potongan daun dengan ukuran $1 \times 1 \text{ cm}^2$ dari masing-masing tunas varian diinokulasi dengan hifa cendawan *Foc* Bw dan diinkubasikan dalam media agar (agar-agar 8 g dalam 1 liter air) selama 12 hari. Potongan daun bibit abaka hasil kultur jaringan digunakan sebagai pembanding.

Persentase potongan daun yang mengalami nekrosis dan gejala kerusakan daun yang terjadi diamati serta digunakan untuk menentukan tingkat kerusakan daun (intensitas penyakit). Gejala kerusakan daun diskor menggunakan kriteria sebagai berikut: skor 0 – tidak ada nekrosis, skor 1 – nekrosis daun kurang dari 35%, skor 2 – nekrosis antara 35 – 70%, skor 3 – nekrosis > 75% dan mulai muncul gejala pembusukan daun, dan skor 4 – daun telah membusuk semuanya (PURWATI, 2007). Tingkat kerusakan daun (intensitas penyakit; IP) dihitung dengan rumus $IP = \left[\frac{\sum (ni \times si)}{N \times S} \right] \times 100\%$; *ni*: jumlah potongan daun dengan skor kerusakan ke *i*, *si*: skor gejala ke *i*; *N*: jumlah potongan daun yang diamati, dan *S*: skor kerusakan tertinggi (CACHINERO *et al.*, 2002). Respon tunas varian abaka yang diuji terhadap infeksi *Foc* disimpulkan dari nilai hasil perhitungan IP, yaitu resisten (R) – jika IP = 0-5%; agak resisten (AR) – jika IP antara 5-10%; agak rentan (ARt) – jika IP antara 10-25%; rentan (Rt) – jika IP antara 25-50%; dan sangat rentan (SRt) – jika IP > 50% (YUSNITA dan SUDARSONO, 2004).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 tidak ada yang berkembang pada media MT dengan penambahan AF 60 mg/l, sebaliknya 90% kalus mampu berproliferasi menjadi tunas dalam media tanpa AF (0 mg/l). Pada 5 bulan setelah tanam, penurunan kemampuan kalus berproliferasi pada perlakuan penambahan AF 60 mg/l mencapai 100%, pada AF 45 mg/l mencapai 95%, dan pada AF 30 mg/l mencapai 88% (Tabel 1). Demikian pula nilai persentase kalus yang mengalami proliferasi dan jumlah tunas yang terbentuk per eksplan

dipengaruhi oleh konsentrasi AF yang ditambahkan dalam media selektif (Tabel 1). Pada Gambar 1 dapat dilihat contoh penghambatan pertumbuhan dan proliferasi kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 yang ditanam dalam media MT dengan penambahan berbagai konsentrasi AF.

Tunas abaka klon Tangongon tidak mati dan tidak rusak (skor 0) ketika ditanam dalam media MT tanpa AF. Sebagian tunas abaka yang diuji mati dalam media MT dengan penambahan AF 40 mg/l. Meningkatnya konsentrasi AF yang ditambahkan berakibat meningkatnya persentase kematian tunas (Tabel 2). Penanaman tunas abaka dalam media selektif dari 30 hari ke 60 hari juga meningkatkan persentase kematian tunas sedangkan dari 60 hari ke 90 hari relatif sama (Tabel 2).

Setelah penanaman selama 30 hari dan 60 hari dalam media MT selektif, skor kerusakan tunas (SKT) abaka akibat penambahan AF 45 mg/l dan 50 mg/l tidak berbeda nyata, tetapi pada penambahan AF 40 mg/l nyata lebih rendah dibandingkan AF 45 mg/l atau 50 mg/l (Tabel 2). Sebaliknya setelah 90 HST dalam media MT selektif, perlakuan penambahan AF 50 mg/l menghasilkan SKT tertinggi sedangkan SKT pada perlakuan AF 40 mg/l dan 45 mg/l tidak berbeda nyata (Tabel 2). Pada Gambar 2. dapat dilihat contoh penghambatan pertumbuhan dan proliferasi tunas abaka klon Tangongon yang ditanam dalam media MT dengan penambahan berbagai konsentrasi AF.

Kalus embriogen abaka yang telah ditingkatkan keragamannya dengan perlakuan EMS tidak terhambat

Tabel 1. Persentase kalus bertunas, jumlah tunas per kalus, total tunas dan persentase penurunan tunas abaka klon Tangongon (Tg) dan Sangihe-1 (Sh) yang dipanen setelah ditanam dalam media selektif dengan penambahan berbagai konsentrasi asam fusarat (AF) pada 5 bulan setelah tanam

Table 1. Percentage of callus producing shoots, number of shoots per callus, total number of shoots, and percentage of shoot decrease of Tangongon (Tg) and Sangihe-1 (Sh) clones harvested from selective media containing several concentration levels of fusaric acid (FA) on 5 months after planting

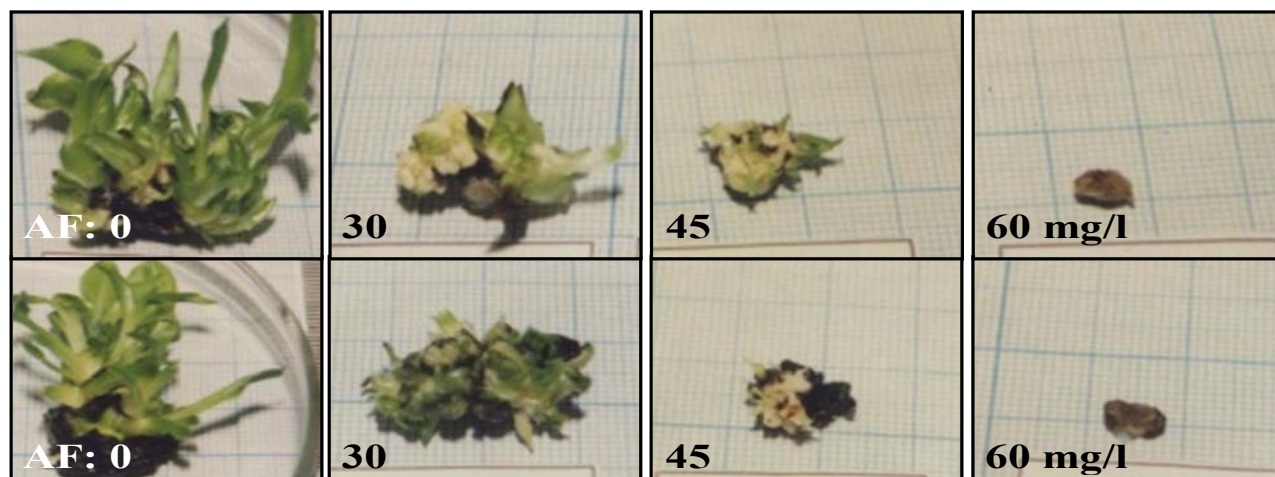
Konsentrasi AF FA concentration (mg/l)	Kalus bertunas Calli producing shoots (%)		Jumlah tunas/kalus Number of shoots/callus**)		Total tunas Total number of shoots		Penurunan tunas Shoots decrease (%) ^{*)}	
	Tg	Sh	Tg	Sh	Tg	Sh	Tg	Sh
0	90	90	10,7±3,32	16,6±9,04	316	191	0	0
30	45	20	5,6±3,91	6,9±4,82	69	28	79	88
45	25	10	5,00±1,41	6,2±3,96	31	10	90	95
60	0	0	0	0	0	0	100	100

Keterangan : *) Penurunan tunas (%) dihitung dengan rumus $[(Xo*Yo - X1*Y1)/(Xo*Yo)] \times 100\%$. Xo dan Yo berturut-turut adalah % kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus dari perlakuan tanpa AF, sedangkan X1 dan Y1 berturut-turut adalah % kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus dari perlakuan dengan AF

**) Rerata ± standar deviasi

Note : *) Shoots decrease (%) was calculated by formula: $[(Xo*Yo - X1*Y1)/(Xo*Yo)] \times 100\%$. Xo and Yo are % of callus produce shoots and number of shoots per callus resulted from the treatment without FA, meanwhile X1 and Y1 % of callus produce shoots and number of shoots per callus resulted from the treatment with FA, respectively

**) Average ± deviation standard



Gambar 1. Daya hambat berbagai konsentrasi asam fusarat (AF) terhadap pertumbuhan dan proliferasi kalus embriogen abaka klon Tangongon (atas) dan Sangihe-1 (bawah), pada saat 5 bulan setelah penanaman ke dalam media selektif dengan penambahan AF

Figure 1. Inhibitions growth and proliferation of abaca embriogenic callus clone Tangongon (top) and Sangihe-1 (bottom) by fusaric acid (FA) at 5 months after planting on selective medium containing FA



Gambar 2. Daya hambat berbagai konsentrasi asam fusarat (AF) terhadap pertumbuhan dan proliferasi tunas klon Tangongon, pada 3 bulan setelah penanaman ke dalam media selektif dengan penambahan AF.

Figure 2. Inbibitions growth and proliferation of abaca shoots clone Tangongon by three different concentration of fusaric acid (FA) at 5 months after planting on selective medium containing FA.

Tabel 2. Persentase kematian tunas dan rata-rata skor kerusakan tunas abaka klon Tangongon yang ditanam dalam media selektif dengan penambahan berbagai konsentrasi asam fusarat (AF) pada 30, 60, dan 90 hari sesudah tanam (HST).

Table 2. Percentage of shoots death and mean of leaf damage score of abaca clone Tangongon planted in selective media containing several concentration levels of fusaric acid (FA) on 30, 60, and 90 days after planting (DAP)

Konsentrasi AF FA concentration (mg/l)	Persentase kematian tunas (%) Percentage of shoots death (%)			Skor kerusakan tunas Score of leaf damage		
	30 HST (DAP)	60 HST (DAP)	90 HST (DAP)	30 HST (DAP)	60 HST (DAP)	90 HST (DAP)
0	0	0	0	0 c	0 c	0 c
40	7	36	47	1.7 b	2.6 b	3.2 b
45	32	67	68	3.0 a	3.3 a	3.3 b
50	56	73	76	3.2 a	3.4 a	3.5 a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata pada taraf 5% uji BNT

Note : Numbers followed by the same letters in each column are not significantly different at 5% LSD test

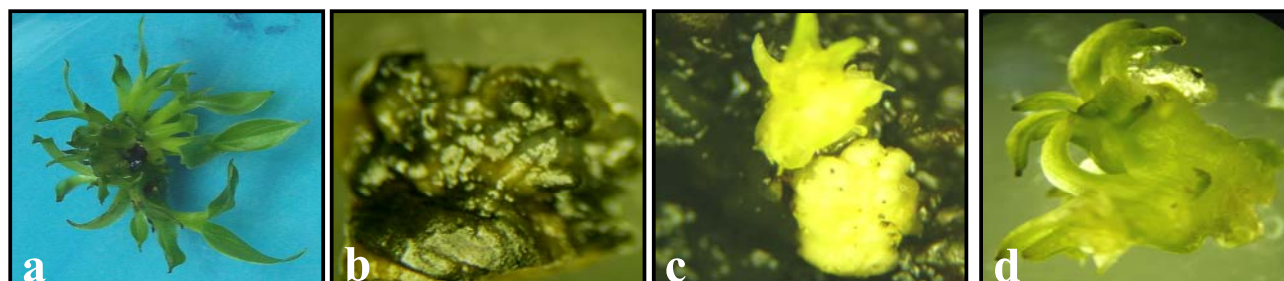
proliferasi tunasnya dalam media MT tanpa AF. Dalam MT tanpa AF, kalus embriogen abaka yang ditanam mampu menghasilkan rata-rata 20 (klon Tangongon) dan 18 (klon Sangihe-1) tunas per eksplan.

Penanaman kalus embriogen yang telah diberi perlakuan EMS dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l menyebabkan seluruh eksplan membusuk atau sebagian besar membusuk, tetapi di antara kalus yang membusuk berkembang kalus embriogen, tunas roset, atau tunas normal abaka yang insensitif terhadap AF. Pada Gambar 3 disajikan contoh perkembangan kalus embriogen yang diseleksi dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l.

Tingkat keberhasilan seleksi *in vitro* dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l terhadap kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 disajikan dalam Tabel 3. Seleksi *in vitro* yang dilakukan menghasilkan total 85 tunas dari abaka klon Tangongon dan 28 tunas dari klon Sangihe-1 yang insensitif terhadap AF (Tabel 3). Selanjutnya, tunas hasil seleksi *in vitro* dengan tinggi > 2 cm ditanam pada media induksi akar

(media MS dengan penambahan arang aktif 2 g/l), diaklimatisasi dan ditanam di dalam kantong plastik (*polybag*) berisi campuran tanah:pupuk kandang (1:1). Setelah periode tiga bulan, bibit abaka yang tetap hidup dievaluasi responnya terhadap infeksi *Foc*.

Hasil evaluasi respon tunas abaka insensitif AF yang didapat dari seleksi *in vitro* dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l terhadap infeksi *Foc* Bw dapat dilihat pada Tabel 4. Daun abaka klon Tangongon pembandingan yang diuji mengalami pembusukan total akibat infeksi *Foc* Bw sehingga tergolong sangat rentan. Dari tiga bibit abaka klon Tangongon hasil seleksi *in vitro* yang diuji, berhasil diidentifikasi dua bibit varian/mutan yang tidak mengalami kerusakan daun akibat inokulasi dengan *Foc* Bw (resisten) dan satu tunas yang tergolong agak rentan (Tabel 4). Dalam percobaan ini, bibit abaka klon Sangihe-1 hasil seleksi *in vitro* belum dapat dievaluasi responnya terhadap *Foc* Bw karena *plantlet* hasil seleksi *in vitro* belum diaklimatisasi dan bibit yang diperlukan belum siap diuji.



Gambar 3. Perkembangan eksplan kalus embriogen abaka setelah periode seleksi *in vitro* dalam media yang mengandung asam fusarat (AF). Kalus embriogen abaka: (a) mengalami proliferasi tunas dalam media tanpa AF, (b) membusuk dalam media selektif, (c) membusuk dan memproliferasikan kalus embriogen yang insensitif AF dalam media selektif, dan (d) memproliferasikan tunas roset yang insensitif AF dalam media selektif dengan penambahan AF 50 mg/l.

Figure 3. Development of abaca embryogenic calli after selected *in vitro* on selective medium containing fusaric acid (FA). Abaca embryogenic calli: (a) proliferated normal shoots on medium without FA, (b) rotted on selective medium, (c) rotted and proliferated FA insensitive embryogenic calli on selective medium, and (d) proliferated insensitive rosette shoots on selective medium containing 50 mg/l FA.

Tabel 3. Penghambatan pertumbuhan kalus embriogen dua klon abaka yang ditanam dalam media proliferasi tunas dengan atau tanpa penambahan asam fusarat (AF) pada 6 bulan setelah tanam.

Table 3. Inhibition growth of abaca embryogenic calli planted on shoot proliferation medium with or without fusaric acid (FA) at 6 months after planting.

Parameter yang diamati Parameters observed	Klon Tangongon Clone Tangongon		Klon Sangihe-1 Clone Sangihe-1	
	Tanpa AF Without FA	Dengan AF With FA	Tanpa AF Without FA	Dengan AF With FA
Jumlah eksplan:				
o Awal	100	300	100	250
Kalus yang diamati	88	281	88	224
o Bertunas (%)	99	3	99	1
o Dorman (%)	1	10	1	9
o Mati/busuk (%)	0	87	0	90
Rataan jumlah tunas/eksplan	20,0	10,6	18,0	9,3
Jumlah tunas total:				
o < 1 cm	1080	67	1049	16
o 1 – 2 cm	374	8	381	9
o > 2 cm	286	10	136	3
o Total	1740	85	1566	28
Penurunan jumlah tunas*) (dibanding tanpa FK)		98		99

Keterangan : *) Penurunan jumlah tunas (%) dihitung dengan rumus $[(Xo*Yo - X1*Y1)/(Xo*Yo)] \times 100\%$. Xo dan Yo berturut-turut adalah % kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus dari perlakuan tanpa AF, sedangkan X1 dan Y1 berturut-turut adalah % kalus bertunas dan jumlah tunas per kalus dari perlakuan dengan AF

Note : *) Shoots decrease (%) was calculated by formula: $[(Xo*Yo - X1*Y1)/(Xo*Yo)] \times 100\%$. Xo and Yo are % of calli produce shoots and number of shoots per callus resulted from the treatment without FA, meanwhile X1 and Y1 % of calli produce shoots and number of shoots per callus resulted from the treatment with FA, respectively

Pembahasan

Keberhasilan seleksi *in vitro* dipengaruhi oleh ketersediaan metode regenerasi *plantlet* dalam jumlah banyak dan keefektifan agen penyeleksi yang digunakan. Metode regenerasi abaka secara *in vitro* telah dikembangkan oleh peneliti sebelumnya dengan menggunakan tunas pucuk atau mata tunas sebagai eksplan dan ditumbuhkan pada media dasar MS dengan penambahan BAP serta Thidiazuron (MARISKA dan SUKMADAJA, 2003; RAHAJENG, 2006). Toksin utama yang diproduksi dan disekresikan oleh cendawan *Foc* adalah asam fusarat (BACON *et al.*, 1996).

Asam fusarat (AF) telah digunakan sebagai agen penyeleksi dalam seleksi *in vitro* untuk memperoleh varian yang resisten terhadap *Foc*.

Daya hambat *in vitro* dari AF terhadap pertumbuhan kalus dan tunas abaka klon Tangongon atau Sangihe-1 dipengaruhi oleh konsentrasi AF yang ditambahkan ke dalam media selektif. Penelitian sebelumnya telah menunjukkan penghambatan pertumbuhan jaringan yang diseleksi berkorelasi positif dengan konsentrasi AF yang ditambahkan dalam media (MATSUMOTO *et al.*, 1995; BOUIZGARNE *et al.*, 2006). Terhambatnya pertumbuhan kalus dan tunas yang ditanam dalam media selektif dengan penambahan AF diduga sebagai akibat terganggunya

Tabel 4. Persentase daun bergejala (PDB), rata-rata skor gejala kerusakan (SGK), intensitas penyakit (IP), dan ketahanan abaka klon Tangongon (Tg) dari lapang dan klon hasil seleksi *in vitro* dalam media dengan penambahan asam fusarat. Respon ketahanan ditentukan berdasarkan hasil uji inokulasi daun dengan *F. oxysporum* f. sp. *cubense* isolat Banyuwangi

Table 4. Leaf damage percentage (LDP), average of damage symptom score (DSS), Disease intensity (DI), and resistance of abaca clone Tangongon resulted from field and *in vitro* selection on medium containing fusaric acid (FA). Response of resistance described based on the result of leaf inoculation test using *F. oxysporum* f. sp. *cubense* isolate Banyuwangi

Varian abaka <i>Abaca variants</i>	PDB (%) LDP (%)	Rataan SGK Average of DSS	IP (%) DI (%)	Ketahanan Resistance
Tg dari kultur jaringan:				
o Tg-3	86	2.29	57	SRt
Tg dari seleksi <i>in vitro</i> :				
o Tg-70.3.1.1-AF6	43	0,43	10,7	ARt
o Tg-70.3.1.1-AF1	0	0	0	R*
o Tg-70.3.1.1-AF2	0	0	0	R*

Keterangan : * hifa *Foc* tumbuh di atas potongan daun, tetapi daun tidak mengalami kerusakan. SRt: sangat rentan, ARt: agak rentan, R: resisten.

Note : * *Foc* hypha was growing on the leaf cuts, but leaf was not damage. SRt: highly susceptible, ARt: moderately susceptible, R: resistant

permeabilitas membran sel, terhambatnya oksidasi sitokrom dan respirasi pada mitokondria sehingga menghambat sintesis ATP, serta penurunan aktivitas fenol (JIN *et al.*, 1996; BOUIZGARNE *et al.*, 2006).

Daya hambat AF terhadap pertumbuhan kalus dan tunas abaka klon Sangihe-1 lebih tinggi dibandingkan klon Tangongon, mengindikasikan adanya pengaruh faktor genetika. Adanya pengaruh faktor genetika telah diindikasikan berdasarkan hasil penelitian pada tanaman gladiol. Dari 10 genotipe gladiol yang secara genetika beragam, ketika ditanam dalam media dengan penambahan AF mempunyai nilai respon insensitivitas yang berbeda terhadap AF yang ditambahkan ke dalam media *in vitro* (REMOTTI dan LOFFLER, 1996).

Konsentrasi sub-lethal AF yang mempunyai daya hambat paling tinggi terhadap pertumbuhan dan proliferasi kalus embriogen abaka klon Tangongon dan Sangihe-1 dicapai pada penambahan AF 45 mg/l ke dalam media MT selektif. Namun, setelah diverifikasi ulang dengan kisaran konsentrasi AF yang lebih sempit, diperoleh konsentrasi sub-lethal AF pada konsentrasi 50 mg/l. Konsentrasi sub-lethal perlu ditentukan untuk meningkatkan efektivitas dan keberhasilan seleksi *in vitro* (YUSNITA *et al.*, 2005). Selanjutnya penambahan AF dengan konsentrasi 50 mg/l ke dalam media MT digunakan untuk seleksi *in vitro* kalus embriogen abaka.

Kalus embriogen yang telah diberi perlakuan EMS 0,6% dan diseleksi dalam media MT selektif dengan penambahan AF 50 mg/l menunjukkan respon yang beragam (eksplan membusuk, di antara kalus yang membusuk berkembang kalus embriogen, tunas roset, atau tunas normal abaka yang insensitif terhadap AF). Keragaman respon ini diduga terjadi sebagai akibat adanya sel-sel atau jaringan mutan dengan fenotipe insensitif terhadap AF yang diinduksi oleh perlakuan EMS di antara sel-sel atau jaringan *wild-type* yang sensitif AF. Sel atau jaringan mutan yang insensitif AF mampu tumbuh dan berkembang menjadi kalus embriogen, tunas roset, atau tunas normal, sedangkan sel atau jaringan *wild-type* mati (membusuk)

dalam media MT yang mengandung AF. Penggunaan kultur kalus embriogen sebagai eksplan dalam seleksi *in vitro* dapat mengurangi terjadinya kimera karena plantlet varian yang didapat umumnya diregenerasikan dari embrio somatik yang berkembang dari sel tunggal (STROSSE *et al.*, 2004).

Seleksi *in vitro* dalam media MT dengan penambahan AF 50 mg/l menghasilkan 85 tunas abaka klon Tangongon dan 28 tunas abaka klon Sangihe-1 yang insensitif terhadap AF. Fenotipe insensitif terhadap AF dapat terjadi sebagai akibat terinduksinya enzim pada tanaman varian yang dapat mendetoksifikasi toksin, aktivasi ketahanan sistemik (SAR) atau elisitor untuk menghasilkan fitoaleksin (JAYASANKAR *et al.*, 2000; SVABOVA dan LEBEDA, 2005; YUSNITA *et al.*, 2005).

Hasil evaluasi bibit varian yang diregenerasikan dari embrio somatik insensitif AF hasil seleksi *in vitro* dalam media dengan penambahan AF menunjukkan bahwa dua dari tiga bibit tersebut resisten terhadap infeksi *Foc* Bw, yang mengindikasikan bahwa seleksi *in vitro* dengan menggunakan 50 mg/l AF efektif untuk mengisolasi varian yang resisten terhadap infeksi *Foc* Bw. Penelitian YUSNITA *et al.* (2005) pada tanaman kacang tanah menunjukkan bahwa dari 23 varian yang diuji dengan menggunakan metode tersebut diperoleh 16 varian rentan dan 7 di antaranya agak rentan. Hal ini mengkonfirmasi teori yang menyatakan bahwa resistensi tanaman yang diregenerasikan dari jaringan hasil seleksi *in vitro* menggunakan toksin terhadap infeksi patogennya berkorelasi dengan insensitivitas sel hasil seleksi terhadap toksin yang ditambahkan dalam media selektif (SVABOVA dan LEBEDA, 2005).

KESIMPULAN

Dari hasil percobaan dapat disimpulkan AF yang ditambahkan dalam media MT mampu menghambat proliferasi kalus embriogen dan tunas abaka. Konsentrasi

sub-lethal AF yang dapat menghambat proliferasi kalus embriogen atau tunas abaka paling tinggi adalah 50 mg/l yang ditambahkan dalam media MT. Dari kalus embriogen abaka yang insensitif AF hasil seleksi *in vitro* telah diperoleh 85 tunas varian abaka klon Tangongon dan 28 tunas varian klon Sangihe-1. Setelah tahapan aklimatisasi dan evaluasi respon terhadap infeksi *Foc*, berhasil diidentifikasi dua bibit varian yang diduga resisten dan satu bibit varian dari abaka klon Tangongon yang agak rentan terhadap infeksi *Foc* Bw. Namun demikian, hasil evaluasi ini masih perlu dikonfirmasi dengan menggunakan metode pengujian yang melibatkan patogen secara langsung.

UCAPAN TERIMA KASIH

Naskah ini merupakan pengembangan dari bagian disertasi, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Kepala Badan Litbang Pertanian, Puslitbangun dan Balittas serta Pimpro PAATP atas bantuan dan kesempatan yang diberikan untuk menempuh program S3 di IPB serta fasilitas penelitian yang disediakan. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada ibu Dr. Ika Mariska (BB Biogen) atas pemberian kultur kalus embriogen abaka klon Tangongon.

DAFTAR PUSTAKA

- ARUMINGTYAS E.L., dan S. INDRIYANI. 2005. Induksi variabilitas genetik percabangan tanaman kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) dengan mutagen kimia Ethyl Methane Sulfonate (EMS). *Natural Jurnal*. 8 (2): 24-28.
- BACON C.W., J.K. PORTER, W.P. NORRED, and J.F. LESLIE. 1996. Production of Fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied Env Microbiol*. 62: 4039-4043.
- BASTASA G.N. and A.A. BALIAD. 2005. Biological control of *Fusarium* wilt of abaca (*Fusarium oxysporum*) with *Trichoderma* and yeast. *Philippines J Crops Sci*. 30:29-37.
- BI. 2003. Model kelayakan proyek kemitraan terpadu perkebunan pisang abaka. <http://www.bi.go.id/sipuk/lm/ind/pisang-ABACA>. Diakses tanggal: 18 April 2003.
- BORRAS O., R. SANTOS, A.P. MATOS, R.S. CABRAL, and M. ARZOLA. 2001. A first attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusariosis disease. *Plant Breeding*. 120:435-438.
- BOUIZGARNE B., H. E. BOUTEAU, C. FRANKART, D. REBOUTIER, K. MADIONA, A. M. PENNARUN, M. MONESTIEZ, J. TROUVERIE, Z. AMIAR, J. BRIAND, M. BRAULT, J. P. RONA, Y. OUHDOUCH, I. E. HADRAMI, and F. BOUTEAU. 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytologist*. 169:209-218.
- CACHINERO J.M., A. HERVAS, R.M. JIMENEZ-DIAZ, and M. TENA. 2002. Plant defence reactions against *Fusarium* wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* and non-host isolates of *F. oxysporum*. *Plant Pathol*. 51:765-776.
- CHEN M., Y. CHOI, D.F. VOYTAS, and S. RODERMEL. 2000. Mutations in the *Arabidopsis* *VAR2* locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *The Plant Journal*. 22 (4): 303-313.
- EPP D. 1987. Somaclonal variation in banana: a case study with *Fusarium* wilt. In: Persley G.J. and E.A. De Langhe (ed). *Banana and Plantain Breeding Strategies*. Canberra: ACIAR Publ, p.140-150.
- JAYASANKAR S., Z. LI, and D.J. GRAY. 2000. *In-vitro* selection of *Vitis vinifera* 'Chardonnay' with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. *Planta*. 211: 200-208.
- JIN H., G.L. HARTMAN, Y.H. HUANG, C.D. NICKELL, and J.M. WIDHOLM. 1996. Regeneration of soybean plants from embryogenic suspension cultures treated with toxic culture filtrate of *Fusarium solani* and screening of regenerants for resistance. *Phytopathology*. 86:714-718.
- LIU S., H. WANG, J. ZHANG, B.D.L. FITT, Z. XU, N. EVANS, Y. LIU, W. YANG, and X. GUO. 2005. *In vitro* mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Cell Rep*. 24 (3): 133-144.
- MARISKA I., and D. SUKMADAJA. 2003. Perbanyakan bibit abaka melalui kultur jaringan Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik.
- MATSUMOTO K., M.L. BARBOSA, L.A.C. SOUZA, and J.B. TEIXEIRA. 1995. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica* 84:67-71.
- MORPURGO R., S.V. LOPATO, R. AFZA, and F.J. NOVAK. 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica*. 75:121-129.
- PLOETZ R.C. 2000. Banana disease: a classic and destructive disease of banana. <http://www.plantmanagement-network.org/pub/php/management/bananapanama/> Diakses tanggal: 23/2/2006.
- PRATT R.G. 1996. Screening for resistance to *Sclerotinia trifoliarum* in alfalfa by inoculation of excised leaf tissue. *Phytopathology*. 86:923-928.
- PURWATI R.D. 2007. Variasi somaklonal dan seleksi *in vitro* abaka (*Musa textilis* Nee) untuk ketahanan terhadap

- Fusarium*. [Disertasi]. Bogor: Program Studi Biologi, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. 145p.
- RAHAJENG W. 2006. Interaksi genotipe klon-klon abaka (*Musa textilis* Nee) dengan beberapa komposisi media kultur *in vitro* [Skripsi]. Malang: Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya. 43p.
- RAO A.V., M.A. FAROOQUI, and A. SADANANDAM. 1997. Induction of lincomycin and streptomycin resistance by nitrosomethylurea and ethyl methanesulphonate in *Capsicum annuum* L. Plant Cell Rep. 16: 865-868.
- REMOTTI P.C., and H.J.M. LOFFLER. 1996. The involvement of fusaric acid in the bulb-rot of *Gladiolus*. J Phytopathol. 144:405-411
- REMOTTI P.C., H.J.M. LOFFLER, and L.V. LOTEN-DOTING. 1997. Selection of cell lines and regeneration of plants resistant to fusaric acid from *Gladiolus* x *grandiflorus* c.v. 'Peter Pear'. Euphytica. 96:237-245.
- RUSSELL, P.J. 1992. Genetics. Third edition. Harper Collins Pub. 758 P.
- SAKAMOTO W., T. TAMURA, Y. HANBA-TOMITA, SODMERGEN and M. MURATA. 2002. The *VARI* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. Genes to Cell. 7: 769-780.
- STROSSE H., I. VAN DEN HOUWE, and B. PANIS. 2004. Banana cell and tissue culture-review. In: Jain S.M., and R. Swennen (ed). Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology, and Induced Mutations. Enfield: Sci Pub, Inc. p.1-10.
- SVABOVA L., and A. LEBEDA. 2005. *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. J Phytopathol. 153:52-64.
- TOYODA H., H. HAYASHI, and K. YAMAMOTO. 1984. Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. Ann Phytopathol Soc Japan. 50:538-540.
- YUSNITA dan SUDARSONO. 2004. Metode inokulasi dan reaksi ketahanan 30 genotipe kacang tanah terhadap penyakit busuk batang *Sclerotium*. Hayati. 11:53-58.
- YUSNITA, WIDODO, and SUDARSONO. 2005. *In vitro* selection of peanut somatic embryos on medium containing culture filtrate of *Sclerotium rolfsii* and plantlet regeneration. Hayati. 12:50-56.