

Seleksi *In Vitro* dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning untuk Ketahanan terhadap Penyakit Layu Fusarium

Deden Sukmadjaja*, Ragapadmi Purnamaningsih, dan Tri P. Priyatno

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

Diajukan: 13 Maret 2013; Diterima: 20 Juni 2013

ABSTRACT

***In Vitro* Selection and Evaluation of Banana Mutants Variety Ambon Kuning to Fusarium Wilt Disease. Deden Sukmadjaja, Ragapadmi Purnamaningsih, and Tri P. Priyatno.** Fusarium wilt of banana (*Musa* spp.) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) is the most serious problem faced in banana cultivation in terms of plant productivity and fruit quality. Mutation breeding is one of the alternative method that can be applied in producing new banana cultivar. Mutants can be induced by chemical mutagen such as ethyl methane sulfonate (EMS) followed by *in vitro* selection and then evaluation of the mutants to fusarium wilt disease in glasshouse and *Foc* infected field. The aim of this research was obtained EMS induced and *in vitro* selected mutants of banana var. Ambon Kuning and evaluated *Foc* disease resistant clones in glasshouse and *Foc* infected field. The first step to obtain the explants for this research was initiation and formation of multiple bud clumps (MBC) using MS basal media supplemented with 5, 10, and 20 mg/l of benzyladenin. Plant regeneration of MBC was also studied by using MS media containing 0, 0.2, and 1 mg/l of benzyladenin. To induce mutagenesis, MBC was soaked in 0.1, 0.3, and 0.5% (v/v) EMS for 1, 2, and 3 hours. The assesment of resistant MBC mutants to Fusarium phytotoxin was conducted by using fusaric acid (FA) as selection agent in concentration of 30, 45, and 60 ppm. Putative mutant plants produced by *in vitro* selection were further tested using spore solution of *Foc* race 4 in glasshouse. Meanwhile, *Foc* resistance assesment in the infected field was conducted in Pasirkuda Experimental Station, Bogor Agricultural University. The results showed that MBC can be formed in MS basal media supplemented with 10 or 20 mg/l benzyladenin. The EMS played a role in obtaining mutants by producing 68 MBC putative mutants tolerant to *Foc* based on FA selection. Further evaluation in the glasshouse was obtained 64 *Foc* resistant plants from 391 putative mutants produced by *in vitro* selection. Evaluation in the *Foc* infected field showed six clones survived until generative phase (12 month of age).

Keywords: Banana, Ambon Kuning, *in vitro* selection, *Fusarium oxysporum*, putative mutant, EMS, fusaric acid.

ABSTRAK

Seleksi *In Vitro* dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning untuk Ketahanan terhadap Penyakit Layu Fusarium. Deden Sukmadjaja, Ragapadmi Purnamaningsih, dan Tri P. Priyatno. Serangan penyakit layu oleh *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) merupakan salah satu masalah yang dihadapi dalam usaha peningkatan produktivitas dan mutu hasil pada usaha tanaman pisang. Induksi mutasi merupakan salah satu cara yang dapat ditempuh dalam perbaikan tanaman yang tahan terhadap penyakit. Pembentukan tanaman mutan menggunakan mutagen kimia EMS diikuti seleksi *in vitro* serta dilanjutkan dengan pengujian ketahanan baik di rumah kaca maupun di lahan endemik merupakan salah satu metode pemuliaan mutasi untuk memperoleh kultivar baru yang tahan terhadap penyakit. Metode yang digunakan dalam penelitian ini berupa pembentukan *multiple bud clumps* (MBC) pada pisang Ambon Kuning menggunakan media dasar MS yang ditambah BA konsentrasi tinggi (5, 10, dan 20 mg/l) sebagai perlakuan. Regenerasi tanaman dari MBC digunakan media MS ditambah BA konsentrasi rendah (0, 0,2, dan 1 mg/l). Untuk induksi mutasi pada MBC digunakan mutagen kimia *ethyl methane sulfonate* (EMS) konsentrasi 0,1; 0,3; dan 0,5% yang dikombinasikan dengan waktu perendaman selama 1, 2, dan 3 jam. Untuk pengujian ketahanan terhadap toksin *Fusarium* digunakan asam fusarat konsentrasi 30, 45, dan 60 ppm sebagai agen seleksi. Pengujian ketahanan tanaman mutan putatif hasil seleksi *in vitro* dilakukan di rumah kaca menggunakan larutan spora *Foc* ras 4, sedangkan pengujian tanaman di lapangan dilakukan di lahan endemik penyakit layu *Fusarium* di Kebun Percobaan Pasirkuda, Bogor. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan mutan-mutan tanaman pisang Ambon Kuning yang diinduksi dengan mutagen EMS dan menyeleksi ketahanannya terhadap penyakit layu *Fusarium* secara *in vitro*, di rumah kaca maupun di lahan endemik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pembentukan MBC sebagai target mutagenesis dari tanaman pisang Ambon Kuning secara *in vitro* dapat diperoleh menggunakan media MS dengan penambahan BA 10-20 mg/l + IAA 0,1 mg/l + asam askorbat 10 mg/l. Formulasi media terbaik untuk regenerasi MBC adalah media MS tanpa penambahan BAP. Pada percobaan induksi mutasi dengan EMS telah didapatkan 68 regenerasi MBC mutan putatif yang toleran pada media seleksi yang mengandung asam fusarat 30, 45, dan 60 ppm. Pengujian ketahanan terhadap *Fusarium* pada 391 tanaman mutan putatif hasil seleksi *in vitro* di

rumah kaca diperoleh 64 tanaman yang tahan penyakit layu Fusarium sampai dengan umur 6 bulan. Hasil pengujian selanjutnya di lahan endemik penyakit Fusarium diperoleh enam galur yang tahan sampai menghasilkan buah.

Kata kunci: Pisang Ambon Kuning, seleksi *in vitro*, *Fusarium oxysporum*, mutan putatif, EMS, asam fusarat.

PENDAHULUAN

Pisang (*Musa* spp.) merupakan salah satu komoditas buah-buahan yang banyak dikonsumsi oleh masyarakat Indonesia karena harganya yang relatif murah, dengan kualitas gizi yang baik. Luas panen dan produksi pisang menempati posisi pertama dibandingkan total produksi buah-buahan lainnya. Indonesia merupakan salah satu negara pengekspor pisang. Volume ekspor tertinggi dicapai pada tahun 1996 dengan nilai sekitar 18 juta dolar, namun selanjutnya menurun dan bahkan pada tahun 2004 hanya mencapai 1.197 ton dengan nilai sekitar 778.000 dolar (BPS, 2004). Salah satu masalah yang dihadapi adalah kehilangan hasil yang cukup tinggi yang disebabkan oleh serangan penyakit yang dapat menyebabkan kematian serta menurunkan mutu produk.

Penyakit layu Fusarium atau penyakit Panama yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) merupakan penyakit utama pisang yang menghancurkan pertanaman pisang komersial di dunia (Stover, 1962; Hwang dan Ko, 2004). Menurut beberapa laporan, kerusakan pertanaman pisang di Taiwan, Malaysia, Indonesia, Vietnam, dan Cina disebabkan oleh *F. oxysporum* ras 4. Penyakit layu tersebut dilaporkan telah menyebar luas di Asia, Amerika (Latin), dan Australia (Hwang dan Ko, 2004; Wu *et al.*, 2010; de Beer *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2013). Hampir semua pisang rentan terhadap penyakit ini dengan intensitas penyakit antara 24-49% (Eko, 2007). Kerugian hasil yang disebabkan oleh penyakit ini dapat mencapai 63%.

Tanaman pisang kultivar Ambon Kuning merupakan tanaman yang tidak menghasilkan biji sehingga pengembangan program pemuliaan melalui hibridisasi tidak memungkinkan. Konsekuensinya program penelitian untuk mendapatkan tanaman pisang yang tahan terhadap penyakit diarahkan pada pemuliaan non konvensional seperti keragaman somaklonal, induksi mutasi, fusi protoplas, dan rekayasa genetik. Keragaman somaklonal dan seleksi *in vitro* merupakan metode alternatif untuk memperoleh karakter baru yang tidak tersedia pada sumber plasma nutfah yang ada.

Mutasi buatan merupakan salah satu metode untuk meningkatkan keragaman somaklonal yang dapat diterapkan dalam pemuliaan tanaman. Teknik ini dapat mempercepat diperolehnya varietas baru dengan berbagai sifat atau karakter yang diinginkan seperti ketahanan terhadap penyakit. Induksi mutasi dapat dilakukan dengan perlakuan bahan mutagen tertentu. Mutagen yang sering digunakan dalam pemuliaan tanaman, yaitu mutagen fisik (radiasi sinar X, sinar gamma) dan mutagen kimia (*ethyl methane sulfonate* atau EMS, *methyl methane sulfonate* atau MMS, *N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine* atau MNNG dan lain-lain). Beberapa penelitian mutagenesis menggunakan mutagen kimia telah berhasil mendapatkan mutan baru pada tanaman pisang (Omar *et al.*, 1989; Bhagwat dan Duncan, 1998; Bidabadi *et al.*, 2012). Sejak tahun 1983 para peneliti di Balai Penelitian Pisang Taiwan telah melakukan seleksi pada tanaman pisang kultivar Giant Cavendish hasil keragaman somaklonal secara alami. Hasilnya telah diperoleh klon yang tahan terhadap *Foc* ras 4 (Hwang, 1999).

Kunci utama keberhasilan dalam perakitan varietas baru melalui keragaman somaklonal adalah dikuasainya teknik regenerasi tanaman. Berbagai hasil penelitian telah mengemukakan metode untuk meregenerasikan tanaman pisang secara *in vitro*. Namun demikian seringkali perlu dilakukan modifikasi untuk mendapatkan formulasi media tumbuh optimal dalam meregenerasikan massa sel atau organ hasil perlakuan induksi mutasi. Dengan dikuasainya sistem regenerasi maka mutan putatif yang dihasilkan dapat diregenerasikan menjadi tanaman. Selain itu metode regenerasi yang telah dikuasai dapat digunakan untuk memperbanyak tanaman yang diperoleh dari hasil keragaman somaklonal.

Asam fusarat merupakan senyawa toksik yang dihasilkan oleh jamur Fusarium yang dapat digunakan sebagai komponen seleksi secara *in vitro* untuk mendapatkan biakan mutan putatif pada tanaman pisang untuk ketahanan terhadap penyakit Fusarium. Matsumoto *et al.* (1995) telah melakukan seleksi terhadap varian-varian baru *Musa* sp. kultivar Maca secara *in vitro* yang tahan terhadap penyakit *Foc* ras 1. Remotti dan Löffler (1997) menggunakan asam fusarat sebagai agen seleksi *in vitro* untuk menghasilkan tanaman gladiol yang tahan terhadap Fusarium.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan mutan-mutan tanaman pisang Ambon Kuning yang diinduksi dengan mutagen EMS dan menyeleksi ketahanannya terhadap penyakit layu Fusarium secara *in vitro*, baik di rumah kaca maupun di lahan endemik.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan dan rumah kaca, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor, serta Kebun Percobaan (KP) Pasirkuda, Pusat Kajian Hortikultura Tropis (PKHT), IPB, Bogor, mulai Januari 2010 sampai Desember 2012.

Bahan Tanaman dan Sterilisasi Eksplan

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisang jenis Ambon Kuning. Sebagai langkah awal dari penelitian ini adalah penyediaan bahan tanaman berupa biakan tunas yang mempunyai daya proliferasi tinggi yang disebut sebagai *multiple bud clumps* (MBC) atau *scalp*. Sumber eksplan yang digunakan adalah mata tunas dari anakan pisang. Sterilisasi eksplan dilakukan dengan cara mencuci bonggol dari anakan tanaman pisang dengan deterjen pada air mengalir, kemudian merendamnya dalam fungisida dan bakterisida (masing-masing 2 g/l) selama 2 jam. Setelah itu pekerjaan dilakukan dalam ruang tanam steril (*laminar air flow*), dengan cara merendam eksplan secara berturut-turut dalam larutan alkohol 70% selama 5 menit, larutan pemutih Sunclin 30% selama 20 menit, kemudian dibilas 3-5 kali dengan air steril.

Pembentukan MBC

Eksplan yang sudah disterilisasi ditanam pada media induksi tunas MS + BAP 3 mg/l + asam askorbat 10 mg/l. Setelah berumur 4 minggu, eksplan dipindahkan pada media untuk pembentukan MBC, yaitu MS + BAP 5, 10, dan 20 mg/l + IAA 0,1 mmg/l + asam askorbat 10 mg/l. Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Sebagai perlakuan percobaan adalah penggunaan zat pengatur tumbuh BAP pada 3 taraf konsentrasi dengan 10 ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah eksplan yang membentuk MBC dan jumlah nodul per eksplan.

Regenerasi Tanaman

Regenerasi tanaman selain ditentukan oleh genotipe pohon induk, juga ditentukan oleh formulasi media yang digunakan. Pada kegiatan ini biakan berupa MBC ditanam pada media regenerasi untuk pembentukan tunas atau planlet. Media yang digunakan, yaitu MS dengan penambahan BAP, asam askorbat 10 mg/l dan *myoinositol* 100 mg/l. Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Leng-

kap. Untuk perlakuan adalah penggunaan media regenerasi pada 3 taraf konsentrasi BAP (0; 0,2; dan 1 mg/l). Masing-masing perlakuan diulang 10 kali. Pengamatan dilakukan terhadap persentase eksplan yang tumbuh dan pembentukan organ (tunas dan akar).

Induksi Mutasi dengan Perlakuan EMS

Mutagen kimia EMS yang digunakan adalah produk Sigma (No. katalog M0880). Sebagai pelarut dari mutagen EMS digunakan larutan bufer fosfat pH 7. Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Faktorial dengan 2 faktor perlakuan dan 10 ulangan. Faktor pertama adalah konsentrasi EMS, sedangkan faktor kedua adalah lama perendaman. Biakan MBC yang sudah dihasilkan direndam dalam larutan EMS sebagai perlakuan pada konsentrasi 0,1; 0,3; dan 0,5% (v/v) selama 1, 2, dan 3 jam dan disimpan dalam keadaan gelap. Selanjutnya biakan dibilas dengan akua-des steril dan disubkultur pada media MS + BAP 3 mg/l selama 3-4 minggu. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah eksplan yang tumbuh dan jumlah nodul per eksplan. Setelah itu biakan dipindahkan ke media pemulihan, yaitu media MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh. Pertumbuhan biakan pada media pemulihan diamati. Semua percobaan *in vitro* diletakkan pada rak kultur dengan intensitas penyinaran lampu fluorescence sebesar 1.000 lux selama 16 jam dalam sehari.

Pengujian Ketahanan Biakan pada Media Seleksi

Pengujian ketahanan biakan terhadap penyakit *Fusarium* secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan toksin asam fusarat. Biakan MBC yang telah dihasilkan dipindahkan ke media seleksi, yaitu media MS tanpa zat pengatur tumbuh dengan penambahan komponen seleksi asam fusarat pada konsentrasi 30, 45, dan 60 mg/l. Inkubasi pada media seleksi dilakukan selama 4 minggu. Kemudian masing-masing biakan disubkultur ke media pemulihan, yaitu media MS tanpa zat pengatur tumbuh dan asam fusarat. Biakan yang tetap hidup disubkultur setiap 2 bulan ke media yang sama sehingga terbentuk planlet yang siap untuk diaklimatisasi. Pengamatan dilakukan terhadap persentase biakan yang hidup pada media seleksi dan setelah dipindahkan ke media pemulihan.

Aklimatisasi dan Pengujian Ketahanan di Rumah Kaca

Planlet yang terseleksi dengan asam fusarat diaklimatisasi di rumah kaca. Aklimatisasi planlet dilakukan pada polibag (diameter 20 cm) berisi campuran tanah dan pupuk kandang (2 : 1). Pengujian bibit

pisang mutan putatif M_1 dilakukan menggunakan larutan spora *F. oxysporum* strain VCG 01213/16 (*tropical race 4*). Pemiakan spora dilakukan pada cawan petri menggunakan media PDA. Setelah itu spora dipanen dan dilarutkan pada media cair hingga densitasnya mencapai 10^6 - 10^7 . Bibit yang sudah berumur satu bulan diinokulasi dengan cara disiram dengan larutan spora pada bagian basal batang dengan terlebih dahulu melukai sedikit bagian bonggol atau akar tanaman.

Pengamatan terhadap ketahanan bibit dilakukan dengan menghitung jumlah tanaman yang sehat, mempunyai gejala penyakit, dan mati terserang penyakit layu. Selain itu diamati secara visual tanaman yang terkena penyakit layu.

Pengujian Ketahanan Mutan Putatif (M_1) terhadap Penyakit Layu Fusarium di Lahan Endemis Fusarium

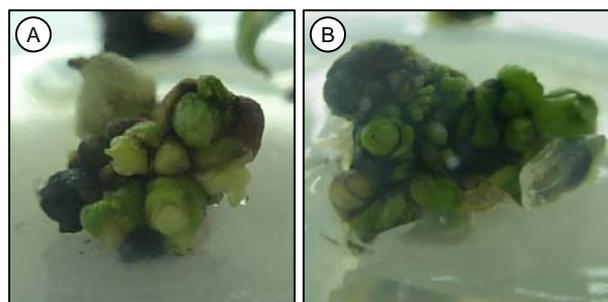
Pengujian dilakukan di KP Pasir Kuda, IPB. Lahan yang digunakan untuk percobaan sudah terinfeksi berat oleh *Foc* secara alami. Sebanyak 48 nomor tanaman terpilih hasil pengujian ketahanan dari rumah kaca ditanam dalam lubang tanam di lahan percobaan yang sebelumnya sudah digemburkan. Setiap lubang tanam diberi pupuk kandang dengan dosis 5 kg/lubang dengan jarak tanam $\pm 2 \times 2 \text{ m}^2$. Pemberian pupuk buatan NPK di sekitar tanaman dilakukan saat tanaman berumur 1 dan 6 bulan setelah tanam masing-masing 15 g/tanaman. Pengamatan dilakukan terhadap jumlah tanaman yang terserang penyakit dan tanaman yang sehat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembentukan MBC dan Regenerasi Tanaman

Induksi tunas dari eksplan mata tunas yang ditanam pada media MS + BAP 3 mg/l terjadi pada umur 3-4 minggu. Umumnya pada tanaman pisang tingkat keberhasilan untuk mendapatkan biakan steril dari isolasi eksplan yang berasal dari tanaman di lapang sangat rendah. Kontaminasi eksplan baik oleh jamur maupun bakteri pada penanaman eksplan awal sering terjadi. Hal ini diduga disebabkan oleh kontaminan yang masuk ke dalam jaringan eksplan (endogen), sementara proses sterilisasi hanya terjadi pada permukaan luar eksplan saja.

Biakan steril yang berhasil diisolasi setelah dipindahkan ke media proliferasi tunas akan tumbuh membentuk nodul-nodul tunas pada bagian basal tunas atau disebut *multiple bud clump* (MBC). Pembentukan MBC terjadi setelah inkubasi eksplan berumur 4-8 minggu (Gambar 1). Tabel 1 menunjukkan persentase eksplan tunas yang dapat menghasilkan MBC dan jumlah rata-rata nodul yang dihasilkan. Penggunaan media MS yang mengandung BAP 10 dan 20 mg/l dapat menghasilkan MBC dengan persentase 100% dan jumlah nodul/eksplan yang dihasilkan tidak berbeda nyata. Peningkatan konsentrasi BAP pada media diikuti oleh peningkatan jumlah nodul per eksplan dengan rata-rata jumlah terbanyak dihasilkan pada media yang mengandung BAP 20 mg/l (5,25 nodul) diikuti BAP 10 mg/l (3,5 nodul) dan BAP 5 mg/l (2,25 nodul). Strosse *et al.* (2003) menggunakan media MS dengan penambahan BAP 22,73 mg/l dan IAA 0,175 mg/l untuk meningkatkan proliferasi nodul pisang pada kultur *in vitro* tanaman pisang dengan metode *scalp*. Sebagian



Gambar 1. Pembentukan MBC pada media MS + IAA 0,1 mg/l + asam askorbat 10 mg/l yang diberi BAP 10 (A) dan 20 mg/l (B) pada 8 MST.

Tabel 1. Persentase pembentukan MBC dan rata-rata jumlah nodul pada 3 komposisi media induksi.

Media (mg/l)	Eksplan membentuk MBC (%)	Rata-rata jumlah nodul per eksplan
MS + BAP 5 + IAA 0,1 + asam askorbat 10 mg/l	50	2,25 b
MS + BAP 10 + IAA 0,1 + asam askorbat 10 mg/l	100	3,5 ab
MS + BAP 20 + IAA 0,1 + asam askorbat 10 mg/l	100	5,25 a

MBC kemudian digunakan sebagai eksplan untuk mendapatkan formulasi media yang cocok pada percobaan regenerasi untuk diregenerasikan menjadi planlet. Pada penelitian terdahulu, Kosmiatin *et al.* (2006) menggunakan kalus pisang Ambon Kuning sebagai target mutagenesis dan menggunakan mutagen radiasi sinar gamma untuk meningkatkan keragaman somaklonal. Akan tetapi, penggunaan kalus pada tanaman pisang Ambon Kuning pada percobaan untuk pembentukan mutan menggunakan EMS menurut Sukmadjaja *et al.* (2010) tingkat keberhasilannya lebih kecil dibandingkan dengan MBC.

Pemindahan MBC ke media perlakuan regenerasi memberikan hasil yang berbeda. Eksplan dapat tumbuh 100% pada semua perlakuan media regenerasi yang dicobakan. Namun demikian, dari masing-masing formulasi media terdapat perbedaan regenerasinya. Umumnya pada media tanpa pemberian BAP proses regenerasi mengarah pada pertumbuhan tunas dan perakaran yang lebih cepat dibandingkan dengan perlakuan yang lain. Sementara itu, pada media yang mengandung BAP 0,2 mg/l pemanjangan tunas lebih cepat dan pembentukan akar yang diperoleh lebih banyak dibandingkan dengan pada media yang mengandung BAP 1 mg/l (Tabel 2). Percobaan ini menunjukkan bahwa media MS tanpa penambahan BAP baik digunakan untuk media pemulihan dan pembentukan planlet.

Induksi Mutasi dengan Perlakuan EMS

Tabel 3 menunjukkan pengaruh konsentrasi mutagen EMS dan lamanya perendaman terhadap persentase biakan MBC yang tumbuh dan rata-rata jumlah tunas yang tumbuh setelah 25 hari ditanam pada media MS + BAP 3 mg/l. Semua perlakuan yang dicoba tidak menunjukkan perbedaan yang nyata terhadap rata-rata jumlah tunas yang dihasilkan. Persentase biakan yang dapat tumbuh pada semua perlakuan yang dicoba masih tinggi (80-100%) dengan rata-rata tunas 2,27-3,08. Peningkatan lama perendaman pada konsentrasi EMS 0,3 dan 0,5% cenderung menurunkan jumlah biakan yang dapat tumbuh tetapi tidak berpengaruh terhadap jumlah tunas yang terbentuk. Peningkatan lama perendaman pada larutan EMS 0,1% berpengaruh terhadap penurunan jumlah tunas per eksplan. Menurut Chen *et al.* (2013), konsentrasi EMS dan lamanya perendaman optimum untuk perlakuan induksi mutasi tanaman pisang masing-masing adalah 30 mM (setara 0,37%) dan 60 menit.

Pemindahan tunas yang telah diberi perlakuan mutagen (Tabel 3) ke media pemulihan (media dasar MS tanpa penambahan ZPT) dapat menghasilkan kembali nodul-nodul dan meningkatkan jumlah tunas. Persentase tumbuh dari biakan setelah dipindahkan ke media pemulihan umumnya tetap tinggi. Peningkatan jumlah tunas/eksplan pada media pemulihan dapat mencapai lebih dari 10 kali dibandingkan pada saat penanaman tunas awal (Tabel 4). Peningkatan

Tabel 2. Regenerasi MBC pada beberapa komposisi media pertumbuhan.

Media	MBC yang beregenerasi (%)	MBC yang membentuk tunas (%)	Bentuk visual	Tunas yang membentuk akar (%)	Bentuk visual
MS + BA 0 mg/l + asam askorbat 10 mg/l	100	100	Normal, jarang	90	Normal, banyak
MS + BA 0,2 mg/l + asam askorbat 10 mg/l	100	100	Normal, cukup banyak	60	Normal, jarang
MS + BA 1 mg/l + asam askorbat 10 mg/l	100	100	Pendek, sebagian membentuk nodul baru	20	Tidak normal, jarang

Tabel 3. Pengaruh waktu perendaman eksplan pada berbagai konsentrasi EMS terhadap persentase biakan yang tumbuh dan jumlah tunas umur 25 hari.

Konsentrasi EMS (%)	Lama perendaman (jam)	Biakan yang tumbuh (%)	Rata-rata jumlah tunas/eksplan
0	-	100,0	3,10 a
0,1	1	90,0	3,04 a
	2	100,0	2,55 a
	3	88,0	2,44 a
0,3	1	92,0	2,80 a
	2	85,0	3,08 a
	3	81,2	2,27 a
0,5	1	90,0	2,82 a
	2	87,5	3,08 a
	3	82,0	3,05 a

Angka-angka pada kolom yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT

jumlah tunas tertinggi diperoleh pada biakan yang berasal dari perlakuan EMS 0,1% dengan waktu perendaman 2 jam (sekitar 20 kali dibandingkan jumlah tunas awal). Peningkatan jumlah keragaman berdasarkan jumlah tunas/eksplan ditunjukkan pada perlakuan EMS 0,3%. Kosmiatin *et al.* (2006) menggunakan media MS + thidiazuron 0,4 mg/l + BA 3 mg/l + PVP 100 mg/l sebagai media pemulihan setelah perlakuan induksi mutasi menggunakan sinar gamma dengan jumlah tunas yang diperoleh bervariasi antara 1-10 tunas.

Gambar 2 menunjukkan keragaan biakan setelah diberi perlakuan induksi mutasi dengan EMS pada

media MS + BA 3 mg/l dan pertumbuhan selanjutnya pada media pemulihan. Dari media pemulihan, biakan dipindahkan ke media seleksi yang mengandung asam fusarat (30, 45, dan 60 ppm).

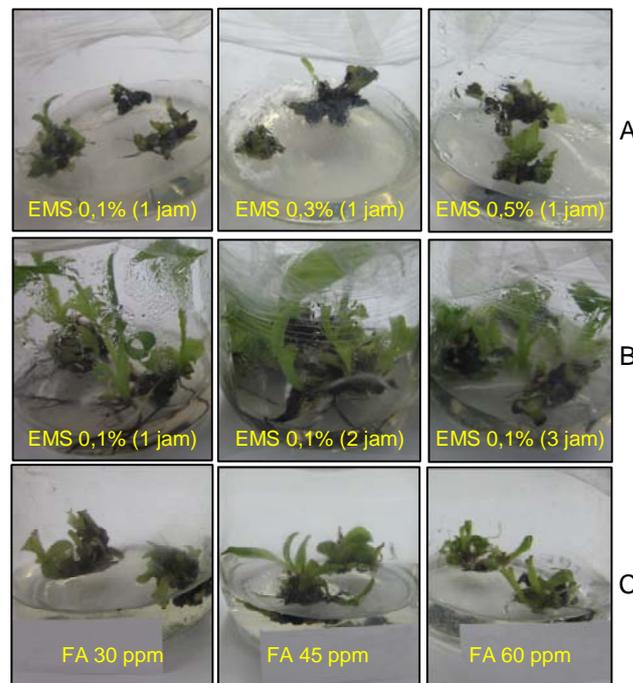
Seleksi *In Vitro* Mutan Putatif dengan Asam Fusarat

Tabel 5 menunjukkan jumlah dan persentase biakan MBC hasil perlakuan induksi mutasi dengan EMS yang tetap tumbuh pada media seleksi yang mengandung asam fusarat 30, 45, dan 60 ppm setelah umur 25 hari. Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa semua calon mutan masih dapat bertahan hidup (100%) pada media seleksi yang mengandung asam fusarat 30

Tabel 4. Pertumbuhan biakan dan rata-rata jumlah tunas dari mata tunas yang telah diberi perlakuan induksi mutasi setelah disubkultur pada media pemulihan (media dasar MS).

Konsentrasi EMS (%)	Lama perendaman (Jam)	Biakan yang tumbuh (%)	Rata-rata jumlah tunas/eksplan
0,1	1	100	16,0 ab
	2	96,9	23,8 ab
	3	100	25,6 a
0,3	1	95,7	13,0 b
	2	100	18,2 ab
	3	100	27,3 a
0,5	1	96,2	17,4 ab
	2	100	15,0 ab
	3	100	23,5 ab

Angka-angka pada kolom yang diikuti huruf yang sama berbeda tidak nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT.



Gambar 2. Keragaan biakan pisang Ambon Kuning setelah diberi perlakuan induksi mutasi. A = beberapa konsentrasi EMS, B = pertumbuhan setelah dipindahkan ke media pemulihan, C = setelah pengujian biakan pada media seleksi yang mengandung asam fusarat.

ppm. Sedangkan pada media yang mengandung asam fusarat 45 dan 60 ppm jumlahnya menurun berturut-turut menjadi 75 dan 44,4%. Semakin tinggi konsentrasi asam fusarat, toksisitasnya semakin bertambah sehingga ketahanan calon mutanpun semakin berkurang. Berdasarkan hasil pengujian ketahanan terhadap asam fusarat, dari semua perlakuan induksi mutasi dihasilkan 68 nomor MBC terdiri dari 30 nomor pada asam fusarat 30 ppm, 24 nomor pada asam fusarat 45 ppm, dan 14 nomor pada asam fusarat 60 ppm. Sedangkan untuk perlakuan tanpa induksi mutasi (kontrol) pertumbuhannya tidak mengalami hambatan (Tabel 5). Hasil ini berbeda dengan penelitian Matsumoto *et al.* (1995) di mana pertumbuhan MBC

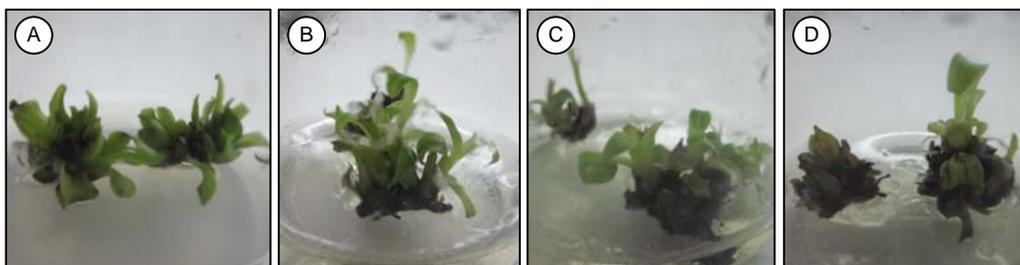
pisang kultivar Maçã telah terhenti pertumbuhannya setelah dikulturkan di media yang mengandung asam fusarat 0,1 mM atau setara dengan 17,9 ppm.

Gambar 3 menunjukkan keragaan biakan yang telah diberi perlakuan induksi mutasi pada media seleksi yang mengandung asam fusarat (0, 30, 45, dan 60 ppm) saat umur 25 hari. Kerusakan jaringan (berwarna coklat tua hingga hitam) di bagian basal rumpun tunas ganda karena pengaruh pemberian asam fusarat di media seleksi. Semakin tinggi konsentrasi asam fusarat pada media seleksi maka semakin cepat kerusakan jaringan yang terjadi.

Tabel 5. Jumlah biakan hasil induksi mutasi yang tetap tumbuh pada media seleksi, umur 25 hari setelah pengujian.

Perlakuan induksi mutasi		Konsentrasi asam fusarat pada media seleksi (ppm)	Jumlah biakan*		
EMS (%)	Perendaman (jam)		Awal	Tumbuh	(%)
0,1	1	30	4	4	100
		45	4	3	75
		60	4	2	50
	2	30	4	4	100
		45	4	4	100
		60	4	1	25
	3	30	2	2	100
		45	4	3	75
		60	2	1	50
0,3	1	30	4	4	100
		45	4	4	100
		60	4	2	50
	2	30	4	4	100
		45	4	4	100
		60	4	2	50
	3	30	4	4	100
		45	4	2	50
		60	2	1	50
0,5	1	30	4	4	100
		45	2	2	100
		60	4	1	25
	2	30	2	2	100
		45	4	1	25
		60	4	2	50
	3	30	2	2	100
		45	2	1	50
		60	2	2	50
Kontrol (tanpa perlakuan induksi mutasi)			20	20	100

* biakan berupa rumpun tunas ganda (*multiple bud clumps*).



Gambar 3. Keragaan biakan yang telah diberi perlakuan induksi mutasi pada media seleksi yang mengandung asam fusarat (FA), umur 25 hari setelah pengujian. A = FA 0 ppm, B = FA 30 ppm, C = FA 45 ppm, D = FA 60 ppm.

Aplikasi mutagen kimia seperti EMS dan pengujian ketahanan terhadap penyakit Fusarium dengan asam fusarat telah banyak dilakukan. Matsumoto *et al.* (1995) telah mendapatkan mutan pisang kultivar Maçã (*Musa sp.*, AAB, silk) hasil perlakuan dengan mutagen kimia, yang telah diseleksi dengan asam fusarat 0,1 mM (± 18 ppm). Mutan tersebut telah dibuktikan tahan terhadap penyakit layu Fusarium ras 1 melalui pengujian di kamar kaca. Pada penelitian lain, Purwati (2007) telah menginduksi kalus embriogenik abaka (*Musa textilis*) dengan EMS 0,6% dan mengujinya dengan media seleksi yang mengandung 40% filtrat konidia *Foc* isolat Banyuwangi dan 50 mg/l asam fusarat. Hasilnya dari 164 bibit Tangongon dan 114 bibit Sangihe-1 diperoleh 8 bibit klon Tangongon dan 8 bibit klon Sangihe-1 yang meningkat resistensinya terhadap infeksi *Foc* isolat Banyuwangi.

Pengujian Tanaman Mutan Putatif di Rumah Kaca

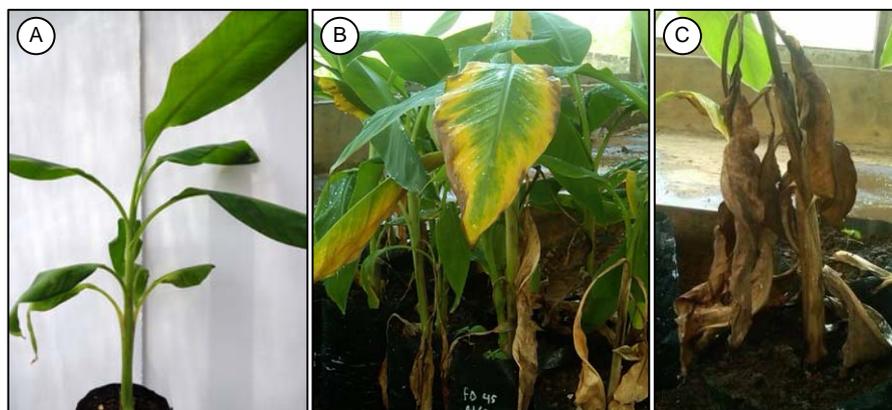
Sebanyak 401 tanaman yang terdiri dari 391 tanaman hasil seleksi *in vitro* dan 10 tanaman kontrol

telah berhasil diaklimatisasi dan selanjutnya diuji ketahanannya terhadap *Foc* di rumah kaca. Tabel 6 menunjukkan jumlah tanaman hasil pengujian dengan pemberian larutan spora *Foc* strain VCG 01213/16 (*tropical race 4*). Hasil pengujian bibit tanaman terhadap penyakit layu dalam polibag di rumah kaca pada umur 6 bulan menunjukkan jumlah tanaman yang mati, masih terserang, dan yang sehat masing-masing sebesar 79,3; 4,5; dan 16,2%. Satu tanaman yang merupakan kontrol mula-mula dapat bertahan (*escape*) dari patogen penyakit layu yang diinokulasikan, namun tanaman tersebut kemudian tidak dapat bertahan sampai menghasilkan buah. Hal ini diduga adanya variasi somaklonal yang menyebabkan terjadinya epigenetik sehingga peningkatan ketahanan terhadap serangan penyakit layu *Foc* hanya bersifat sementara. Pembentukan tanaman pisang yang tahan terhadap penyakit *Foc* melalui variasi somaklonal dapat terjadi tanpa melalui induksi mutasi (Hwang dan Ko, 2004). Gejala awal penyakit layu Fusarium ditandai oleh menguningnya daun tertua. Perubahan war-

Tabel 6. Hasil pengujian inokulasi penyakit layu Fusarium pada tanaman mutan putatif hasil seleksi *in vitro* yang mati, dengan gejala serangan dan sehat di RK, umur 6 bulan.

Perlakuan mutagen dan komponen seleksi		Jumlah tanaman	Mati terserang	Gejala terserang	Sehat	Tanaman sehat (%)
EMS (%)	FA (%)					
0,1	30	88	64	4	20	23
	45	35	32	0	3	9
	60	42	36	1	5	12
0,3	30	47	40	3	4	8
	45	47	34	2	11	23
	60	43	38	1	4	9
0,5	30	35	26	2	7	20
	45	36	28	2	6	17
	60	18	13	1	4	22
Kontrol		10	7	2	1	10
Jumlah*		401	318 (79,3%)	18 (4,5%)	65 (16,2%)	

* jumlah tanaman secara keseluruhan (termasuk kontrol).



Gambar 4. Tanaman hasil pengujian dengan larutan spora Fusarium. A = tanaman sehat, B = tanaman dengan gejala serangan *Foc*, C = tanaman mati akibat terserang *Foc*.

Tabel 7. Tanaman mutan putatif yang tahan penyakit layu Fusarium hasil pengujian di RK yang dapat ditanam di lahan endemik KP Pasirkuda, PKHT, IPB Bogor.

No. galur*	Perlakuan induksi mutasi dan komponen seleksi			Jumlah tanaman
	EMS (%)	Waktu (jam)	Asam fusarat (ppm)	
PM1	0,1	1	30	2
PM2	0,1	1	45	6
PM3	0,1	1	60	12
PM5	0,1	2	45	1
PM6	0,1	2	60	2
PM7	0,1	3	30	2
PM9	0,1	3	60	2
PM12	0,3	1	60	2
PM13	0,3	2	30	3
PM14	0,3	2	45	5
PM16	0,3	3	30	1
PM17	0,3	3	45	1
PM18	0,3	3	60	1
PM20	0,5	1	45	1
PM22	0,5	2	30	2
PM23	0,5	2	45	2
PM24	0,5	2	60	1
PM25	0,5	3	30	1
Kontrol (K)				1

* nomor galur (PM = mutan putatif) menunjukkan urutan perlakuan induksi mutasi (konsentrasi EMS dan waktu perendaman) dan komponen seleksi FA.

Tabel 8. Tanaman mutan putatif yang terserang dan hidup hasil yang dapat ditanam di lahan endemik KP Pasirkuda, PKHT, IPB Bogor, s.d. bulan November 2012 (umur 11 bulan).

No. galur*	Jumlah tanaman	Mati**	Terserang	Sehat	Keterangan
PM1	2	-	1	1	1 Berbuah***
PM2	6	2	1	3	4 Berbuah***
PM3	12	5	2	5	2 Berbuah
PM5	1	1	-	-	
PM6	2	2	-	-	
PM7	2	1	-	1	1 Berbuah
PM9	2	1	1	-	
PM12	2	2	-	-	
PM13	3	2	1	-	1 Berbuah***
PM14	5	3	1	1	1 Berbuah
PM16	1	1	-	-	
PM17	1	-	-	1	
PM18	1	-	1	-	1 Berbuah***
PM20	1	1	-	-	
PM22	2	2	-	-	
PM23	2	2	-	-	
PM24	1	1	-	-	
PM25	1	1	-	-	
Kontrol (K)	1	-	1	-	

* nomor galur (PM = mutan putatif) menunjukkan urutan perlakuan induksi mutasi (konsentrasi EMS dan waktu perendaman) dan komponen seleksi FA, ** mati saat tanaman masih muda, *** berbuah dari atau salah satunya dari tanaman yang terserang.

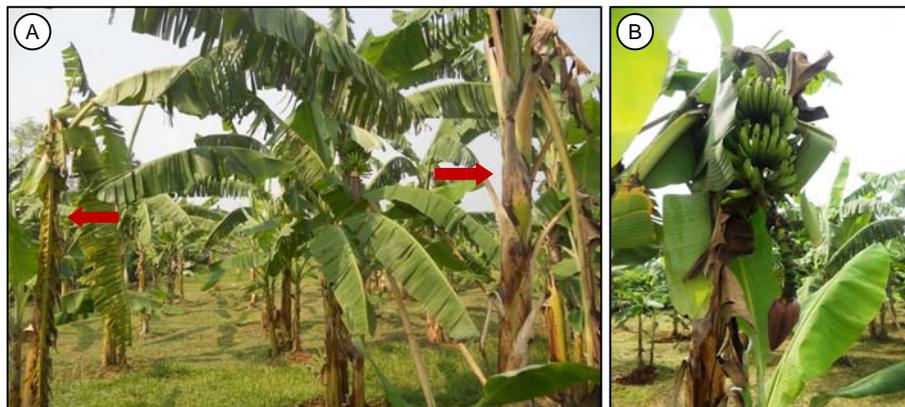
na kuning dimulai dari tepi helaian daun yang diikuti oleh perubahan warna pembuluh, terutama pada pelepah daun luar. Pada stadia lanjut, warna daun menjadi kuning tua atau coklat dan tangkai daun patah pada bagian pangkal (Gambar 4).

Berdasarkan perlakuan konsentrasi EMS dan asam fusarat (FA) terhadap persentase tanaman sehat, ternyata dengan konsentrasi EMS yang lebih rendah (0,1%) yang diberi asam fusarat 30% mengha-

silkan tanaman sehat paling banyak (23%), atau 20 tanaman sehat dari 88 tanaman yang diuji (Tabel 6).

Pengujian Tanaman Mutan Putatif di Lahan Endemik

Materi uji telah terpilih sebanyak 48 nomor mutan hasil pengujian di rumah kaca (Tabel 7) berdasarkan pada tanaman yang sehat dan pertumbuhannya baik. Pengujian tanaman mutan putatif dilakukan di



Gambar 5. Keragaan tanaman pisang di lokasi pengujian ketahanan terhadap fusarium di KP Pasirkuda, Bogor. A = tanaman sehat yang sudah berbuah (tanda panah menunjukkan tanaman yang terserang penyakit) dan B = tanaman terserang penyakit yang berbuah.

KP Pasirkuda, Bogor, yang merupakan lahan yang sudah terinfeksi penyakit layu *Fusarium*. Hasil pengujian menunjukkan sampai dengan umur tanaman 11 bulan (umur berbuah), dari 48 tanaman yang diuji diperoleh 12 tanaman dari 6 galur berbeda masih sehat (dengan persentase sehat 20-100%) tanpa gejala serangan penyakit, sisanya terserang penyakit bahkan ada yang mati pada umur masih muda (Tabel 8). Dari 12 tanaman yang sehat, beberapa nomor sudah menghasilkan buah dan dipanen. Empat tanaman dari empat galur yang terserang (PM1, PM2, PM13, dan PM18) dapat menghasilkan buah, akan tetapi kualitas buah yang dihasilkan kurang baik, yaitu ukuran buah lebih kecil dan kulit buah mengeras (Tabel 8 dan Gambar 5). Satu tanaman kontrol (berasal dari biakan *in vitro* tanpa perlakuan mutagen) meskipun sudah terserang namun masih dapat bertahan sampai dengan umur 11 bulan. Hwang dan Ko (2004) berhasil mendapatkan 12 klon tanaman pisang “Giant Cavendish” hasil variasi somaklonal dengan tingkat ketahanan yang tinggi setelah diuji pada lahan yang telah diinfestasi penyakit layu *Fusarium*.

KESIMPULAN

Multiple buds clump (MBC) pisang Ambon Kuning sebagai bahan target mutagenesis *in vitro* dapat diperoleh dengan penanaman mata tunas pada media dasar MS dengan penambahan BAP 10-20 mg/l. MBC dapat diregenerasikan pada media MS + BAP 0,2 mg/l + asam askorbat 10 mg/l. Daya tumbuh MBC setelah diinduksi mutagen EMS 0,1-0,5% tetap tinggi (>80%). Pertumbuhan MBC hasil induksi mutasi meningkat setelah dikulturkan ke media pemulihan MS tanpa zat pengatur tumbuh.

Peningkatan konsentrasi asam fusarat hingga 60 ppm yang digunakan sebagai agen seleksi *in vitro*

untuk ketahanan terhadap penyakit layu dapat menurunkan jumlah biakan yang hidup hingga 44%.

Pengujian ketahanan terhadap penyakit layu dengan *Foc* strain VCG 01213/16 (ras 4) pada tanaman hasil seleksi *in vitro* di rumah kaca dengan perlakuan 0,1% EMS dan 30% asam fusarat menghasilkan tanaman sehat paling banyak (23%), atau 20 tanaman sehat dari 88 tanaman yang diuji. Hasil pengujian tanaman di lahan endemik penyakit layu *fusarium* di KP. Pasirkuda, Bogor, menghasilkan 12 tanaman dari 6 nomor mutan putatif tanaman pisang Ambon Kuning yang dapat hidup sehat sampai menghasilkan buah.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Pusat Kajian Hortikultura Tropis, Institut Pertanian Bogor atas kerjasamanya dalam memberikan izin tempat pengujian tanaman di Kebun Percobaan Pasirkuda, Bogor. Penelitian ini dibiayai dari DIPA BB Biogen TA 2012 dengan kode DIPA BB Biogen TA 2012 No. 1798.011.003.014.

DAFTAR PUSTAKA

- Badan Pusat Statistik. 2004. Statistik Indonesia. Statistical Year Book of Indonesia. Badan Statistik. Jakarta, Indonesia.
- Bhagwat, B. and E.J. Duncan. 1998. Mutation breeding of banana cv. Highgate (*Musa* spp., AAA Group) for tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* using chemical mutagens. *Sci. Hortic.* 73(1):11-22.
- Bidabadi, S.S., S. Meon, Z. Wahab, S. Subramaniam, and M. Mahmood. 2012. Induced mutations for enhancing variability of banana (*Musa* spp.) shoot tip cultures using ethyl methanesulphonate (EMS). *Aus. J. Crop. Sci.* 6(3):391-401.

- Chen, Y.F., W. Chen, X. Huang, X. Hu, J.T. Zhao, Q. Gong, X.J. Li, and X.L. Huang. 2013. Fusarium wilt-resistant lines of Brazil banana (*Musa* spp., AAA) obtained by EMS-induced mutation in a micro-crosssection cultural system. *Plant Pathol.* 62:112-119.
- de Beer, Z.C., A.S. Ellis, and J.H. Husselman. 2001. Preliminary assesment of cavendish banana clones for resistance/tolerance to Fusarium wilt. p. 194-200. *In* A.B. Molina, N.H. Masdek, and K.W. Liew (eds.) *Banana Fusarium Wilt Management: Toward Sustainable Cultivation*. INIBAB-ASPNET, Los Banos.
- Eko, B. 2007. Jamur endofit agens pengendali hayati. <http://prasetya.brawijaya.ac.id/agu08.html#ekobudi>. [13 Oktober 2011]
- Hwang, S.C. 1999. Recent development on Fusarium R & D of banana in Taiwan. *In* International Workshop on the Banana Fusarium Wilt Disease. Genting Highlands Resort, Malaysia, 18-20 October 1999.
- Hwang, S.C. and W.H. Ko. 2004. Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Dis.* 88(6):580-588.
- 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.
- Kosmiatin M., I. Mariska, I. Roostika, dan E. Gati. 2006. Pembentukan pisang ambon toleran terhadap penyakit layu Fusarium melalui variasi somaklonal. *Zuriat* 17(1):16-24.
- Omar, M.S., F.J. Novak, and H. Brunner. 1989. *In vitro* action of ethylmethane sulphonate on banana shoot tips. *Sci. Hortic.* 40(4):283-295.
- Purwati, R.D. 2007. Variasi somaklonal dan seleksi *in vitro* abaka (*Musa textilis* Nee) untuk ketahanan terhadap layu Fusarium. Disertasi S3, Program Studi Biologi. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor. 145 hlm.
- Remotti, P.C. and H.J.M. Löffler. 1997. *In vitro* selection with fusaric acid: A novel approach to breed for Fusarium resistance in Gladiolus. *Acta Hortic.* 447:415-422.
- Stover, R.H. 1962. Fusarial Wilt (Panama Disease) of Bananas and Other *Musa* Species. *Phytopathol. Pap.* 4. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England.
- Strosse, H., R. Domergue, B. Panis, J.V. Escalant, and I. Cote. 2003. Banana and plantain embryogenic cell suspensions. INIBAP Technical Guidelines. 32p
- Sukmadjaja, D., R. Purnamaningsih, Y. Supriati, dan S. Rahayu. 2010. Rekayasa genetik dan mutasi pisang varietas Ambon Kuning untuk memperoleh pisang dengan produktivitas 15 ton/ha dan tahan 60% terhadap penyakit Fusarium. Laporan Hasil Penelitian Program Riset Insentif 2010. Balai Besar Litbang Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Badan Litbang Pertanian. 21 hlm.
- Wu, Y.L., G.J. Yi, and X.X. Peng. 2010. Rapid screening of *Musa* species for resistance to Fusarium wilt in an *in vitro* bioassay. *Eur. J. Plant Pathol.* 128:409-415.
-