

# Teknik Pengujian In Vitro Ketahanan Pisang terhadap Penyakit Layu Fusarium Menggunakan Filtrat Toksin dari Kultur *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Jumjunidang, N. Nasir, Riska, dan H. Handayani

Balai Penelitian Tanaman Buah Jl. Raya Solok-Aripan Km 8. Solok, 27301

Naskah diterima tanggal 1 Oktober 2004 dan disetujui untuk diterbitkan tanggal 11 April 2005

**ABSTRAK.** Sejauh ini informasi mengenai uji ketahanan pisang terhadap patogen layu fusarium menggunakan filtrat toksin patogennya masih terbatas. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2002 sampai dengan Maret 2003 di laboratorium kultur jaringan, laboratorium penyakit, dan Rumahkasa Balai Penelitian Tanaman Buah, Solok. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik pengujian dini tingkat in vitro dengan media yang mengandung filtrat toksin dari kultur *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) serta mendapatkan tanaman pisang tahan *Foc*. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan lima perlakuan dan lima ulangan. Setiap ulangan terdiri dari 10 botol, masing-masing berisi satu plantlet. Untuk perlakuan toksin asam fusarat murni, setiap ulangan terdiri dari 2 botol. Perlakuan tersebut adalah konsentrasi 0, 10, 20, 40, dan 60% filtrat toksin asam fusarat dari kultur cendawan *Foc* dan konsentrasi 0; 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,4  $\mu\text{M}$  asam fusarat murni yang berperan sebagai pembanding. Pembuatan perlakuan dilakukan dengan menambahkan filtrat toksin dari kultur *Foc* dan toksin murni sesuai konsentrasi di atas ke dalam media tumbuh. Filtrat toksin asam fusarat dari kultur *Foc* pada konsentrasi 60 dan 40% dapat digunakan sebagai media dalam pengujian ketahanan pisang tingkat in vitro. Semakin tinggi konsentrasi filtrat toksin dari kultur *Foc* dan asam fusarat murni yang ditambahkan, semakin cepat masa inkubasi atau munculnya gejala penyakit. Terjadi fenomena *recovery* dari tanaman sakit akibat perlakuan toksin murni asam fusarat dan filtrat toksin dari kultur *Foc*. Filtrat toksin dari kultur *Foc* berpeluang digunakan sebagai media pengujian dini ketahanan pisang terhadap layu fusarium.

Kata kunci: *Musa* sp.; *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; Asam fusarat; Filtrat toksin; In vitro.

**ABSTRACT.** Jumjunidang, N. Nasir, Riska, and H. Handayani. 2005. In vitro screening techniques for resistance of *Musa* to fusarium wilt disease by using filtrate toxin from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* culture. So far, study on the in vitro screening techniques for banana resistant to fusarium wilt disease by using filtrate toxin of its pathogen, was limited. The experiment was conducted at tissue culture laboratory, plant pathology laboratory and screenhouse of Indonesian Fruit Research Institute, Solok from June 2002 to March 2003. The objective of this study was to find out in vitro techniques for selecting of *Musa* to wilt disease by using filtrate toxin from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) culture and to find out resistant plant. The experiment was arranged in a randomized completely design with five treatments (concentration of filtrate toxin 0; 10; 20; 40; and 60%) and five replications, each replications consist of ten bottle of plantlets. The concentration of fusaric acid used as comparison were 0; 0.05; 0.1; 0.2; and 0.4  $\mu\text{M}$ . The results showed that concentration of filtrate toxin fusarium culture at 60 and 40% could be used as a selection medium for in vitro screening techniques for *Musa* resistance to *Foc*. The higher concentration of filtrate toxin of *Foc* culture and fusaric acid, the faster disease incubation periode appeared. There was recovery of attacked plant due to fusaric acid and filtrate toxin of culture *Foc* treatment. This filtrate can be used as an early testing medium for resistance to fusarium wilt of banana.

Keywords: *Musa* sp.; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; Fusaric acid; Filtrate toxin; In vitro.

Penyakit layu yang disebabkan oleh cendawan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), merupakan faktor pembatas utama pada produksi tanaman pisang. Di Indonesia, penyakit ini dilaporkan telah menyebar hampir di seluruh daerah pertanaman pisang. Serangan berat dilaporkan terjadi di beberapa daerah sentra produksi di Sumatera Utara di mana sekitar 1.300 ha pisang barangan milik petani rusak berat akibat serangan *Foc*. Sedangkan di Riau, pada tahun 1991/1992 sampai 1995 kerugian sekitar 18

milyar rupiah telah terjadi akibat rusaknya 300 ha perkebunan pisang cavendish dengan tujuan ekspor ke Singapura (Siregar 1998 Komunikasi pribadi). Dilaporkan telah terjadi kerugian 2,4 milyar rupiah pada tahun panen 1992/1993 pada berbagai jenis pisang komersial di Lampung, akibat serangan *Foc* dan bakteri *Pseudomonas solanacearum* (Nurhadi et al. 1994). Survei di Lampung yang diadakan pada tahun 1998 dan 2002 mengindikasikan bahwa kerusakan tersebut

sangat didominasi oleh patogen *Foc*. Sebuah perusahaan yang menanam cavendish seluas 2.100 ha di Lampung, terancam punah oleh serangan *Foc* dengan meluasnya serangan sampai 1.700 ha (Nasir & Jumjunidang 2003).

Sampai saat ini belum ada satupun metode pengendalian yang benar-benar mampu mengendalikan penyakit ini. Beberapa pengendalian menggunakan agens hayati dilaporkan cenderung menekan serangan *Foc* pada pisang, namun masih terbatas pada respons tanaman selama periode vegetatif. Djatnika *et al.* (2003) mendapatkan bahwa penggunaan *Pseudomonas fluorescens* atau *Gliocladium* sp. yang disiramkan pada tanah di sekitar bibit tanaman pisang, dapat menekan perkembangan penyakit sampai dengan 8 bulan setelah tanam di lapangan. Pengendalian menggunakan kultivar tahan terhadap *Foc* merupakan salah satu alternatif pengendalian yang dianjurkan. Namun kultivar formosana yang berasal dari Taiwan dan telah teruji ketahanannya di daerah asalnya, juga ditemukan terserang ketika ditanam dan dikembangkan oleh Nusantara Tropical Fruit di Lampung (Nugroho 2004 Komunikasi pribadi). Dalam rangka pengendalian penyakit layu fusarium ini, penelitian terus diarahkan untuk memperoleh tanaman yang resisten, baik secara in vitro dengan seleksi keragaman somaklonal, mutasi dengan radiasi, mutagen kimia dan fusi protoplas, maupun dengan pemuliaan konvensional melalui penyilangan.

Uji ketahanan tanaman pisang hasil in vitro terhadap *Foc* umumnya dilakukan dengan cara menginokulasi isolat *Foc* pada lapisan tanah yang digunakan untuk penanaman bibit setelah diaklimatisasi. Cara tersebut dinilai kurang efektif dan membutuhkan waktu yang lama, karena tanaman harus ditumbuhkan dulu atau diaklimatisasi. Selain itu, dengan metode tersebut tanaman sering terhindar dari penyakit (*disease escape*) dan juga bila penanganannya kurang hati-hati, inokulum patogen dapat tertinggal atau tercecer di lokasi percobaan.

Pengujian ketahanan tanaman terhadap penyakit pada tingkat in vitro telah berhasil dilakukan pada beberapa tanaman. Pada tanaman gandum pengujian ketahanan terhadap patogen *F. graminearum* dan *F. culmorum* dengan seleksi somaklonal yang resisten terhadap toksin menggunakan teknik kultur *double layer* (Ahmed *et*

*al.* 1991) dan dengan pengkulturan kalus pada media tumbuh yang mengandung filtrat toksin (Ahmed *et al.* 1996). Penelitian Jin *et al.* (1996) menunjukkan bahwa toksin yang dihasilkan oleh *F. solani* penyebab *sudden death syndrome* (SDS) pada kedelai dapat menyebabkan gejala yang sama, sehingga toksin tersebut dapat digunakan sebagai agens untuk seleksi ketahanan pada tanaman pisang. Matsumoto *et al.* (1995) melaporkan bahwa penambahan toksin *Foc* ras 1 pada media tumbuh selain dapat dipakai dalam seleksi ketahanan juga dapat meningkatkan ketahanan terhadap patogennya. Sedangkan hasil penelitian Karsinah *et al.* (1999), mengindikasikan terbentuknya ketahanan tanaman terhadap *Foc* pada pengkulturan plantlet/globular pada media dengan toksin *Foc* secara *double layer*. Berdasarkan hal tersebut di atas, maka dilakukan pengujian ketahanan pisang terhadap *Foc* dengan penambahan filtrat toksin asam fusarat dari kultur *Foc* pada media tumbuh. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan teknik pengujian dini tingkat in vitro dengan media yang mengandung filtrat toksin dari kultur *Foc*, dan mendapatkan tanaman pisang tahan *Foc*.

## BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kultur Jaringan, Laboratorium Penyakit, dan Rumahkasa Balai Penelitian Tanaman Buah, Solok sejak bulan Juni 2002 sampai dengan Maret 2003. Rancangan yang digunakan adalah acak lengkap dengan lima perlakuan konsentrasi filtrat toksin, yaitu 0; 10; 20; 40; dan 60% dengan lima ulangan. Setiap ulangan terdiri atas 10 botol yang masing-masing berisi satu plantlet per botol dengan ukuran  $\pm 3$  cm. Sebagai pembanding digunakan toksin asam fusarat murni konsentrasi 0; 0,05; 0,1; 0,2; dan 0,4  $\mu\text{M}$  menggunakan rancangan percobaan yang sama. Namun setiap ulangan terdiri dari dua botol plantlet.

Kultivar pisang yang digunakan adalah cavendish. Eksplan dikulturkan dengan media inisiasi MS+2 ppm BAP selama 4 minggu, kemudian disubkulturkan pada media yang sama selama 8 minggu sampai tiga kali subkultur untuk mendapatkan plantlet sebagai bahan uji pada media yang mengandung toksin.

Filtrat toksin asam fusarat yang digunakan,

diisolasi dari kultur *Foc* yang berumur 7 hari pada media czapex. Media disaring dengan *milipore* 0,2 mm untuk mendapatkan filtrat toksin. Perlakuan dilakukan dengan cara menambahkan filtrat toksin dan toksin murni, sesuai konsentrasi pada media tumbuh. Plantlet yang sudah disiapkan ditanam pada media tumbuh yang sudah mengandung toksin. Kultur dipelihara dan dilakukan pengamatan saat terjadinya layu pada masing-masing perlakuan. Plantlet yang bertahan hidup selanjutnya disubkulturkan pada media multiplikasi tunas atau regenerasi plantlet, yaitu MS + 5 ppm BAP yang mengandung toksin sesuai perlakuan. Pengamatan meliputi masa inkubasi, yaitu sejak penanaman pada media yang mengandung toksin sampai munculnya gejala layu, plantlet yang menunjukkan gejala layu, plantlet hidup, perkembangan kondisi plantlet dari populasi yang layu dan yang hidup setelah perlakuan, serta pengamatan kualitatif pada plantlet, seperti warna daun dan akar.

Perlakuan yang berpengaruh nyata terhadap peubah yang diamati, dilakukan uji pembeda dengan DMRT taraf 5%.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa masa inkubasi penyakit pada plantlet yang dikulturkan pada media yang mengandung filtrat toksin dari kultur *Foc* terjadi rata-rata pada hari ke-9 dengan perlakuan 60, 40, dan 20% konsentrasi filtrat toksin. Gejala ditunjukkan dengan perubahan warna daun menjadi kuning pucat dan pada pengamatan hari selanjutnya daun berubah menjadi coklat, kehitaman, dan layu. Pada perlakuan konsentrasi filtrat yang lebih rendah (10%), gejala layu muncul lebih lambat, yaitu rata-rata 19 hari (Tabel 1). Bila dibandingkan dengan perlakuan toksin asam fusarat murni, gejala layu lebih cepat muncul. Pada konsentrasi 0,4 dan 0,2  $\mu$ M masa inkubasi penyakit adalah 6,8 hari, berbeda nyata dengan perlakuan konsentrasi 0,1 dan 0,05  $\mu$ M. Masa inkubasi semakin lama dengan makin rendahnya konsentrasi toksin (Tabel 2). Hal yang sama juga ditemukan pada tanaman gladiol, di mana semakin tinggi konsentrasi filtrat toksin yang ditambahkan pada media seleksi, makin cepat muncul gejala dan makin banyak tanaman yang terserang (Badriah 2001).

**Tabel 1.** Masa inkubasi, persentase layu setelah 4 minggu, dan persentase *recovery* 2 bulan setelah perlakuan dengan beberapa konsentrasi filtrat toksin dari kultur *Foc* (*Incubation periode, wilting percentage after 4 weeks, recovery at 2 months after treatment by using several concentration of filtrate toxin*)

Konsentrasi filtrat toksin (% of filtrate toxin)	Masa inkubasi (Incubation period) hari	Pada hari ke-4 (4 weeks) (%)	Recovery (%)
Kontrol	-	0	-
10	19 <sup>a</sup>	57,5 (11) c	56,5 (11)
20	9 <sup>b</sup>	67,5 (11) b	0 (0)
40	9 <sup>b</sup>	97,5 (19) a	10,25 (1)
60	9 <sup>b</sup>	100 (20) a	19 (19)

Angka dalam kurung = jumlah plantlet (*Number in the bracket=total of plantlet*)

**Tabel 2.** Masa inkubasi, persentase layu setelah 4 minggu, dan persentase *recovery* dari populasi yang layu setelah 2 bulan pada perlakuan beberapa konsentrasi asam fusarat murni (*Incubation periode, wilting percentage after 4 weeks, and percentage of recovery at 2 months after treatment by using several concentration of pure fusaric acid*)

Konsentrasi asam fusarat murni (% of pure fusaric acid) (ppm)	Masa inkubasi (Incubation period) hari	Pada hari ke-4 (4 weeks) (%)	Recovery (%)
Kontrol	-	0	-
0,05	10,1 a	100 (10) a	0 (0)
0,1	8,7 b	100 (10) a	50 (5)
0,2	6,8 c	100 (10) a	0
0,4	6,8 c	100 (10) a	0

Pengamatan saat 4 minggu setelah perlakuan menunjukkan bahwa pemberian filtrat toksin tertinggi (60%) mendapatkan persentase plantlet yang bergejala mencapai 100% dan 97,5% pada konsentrasi 40%, berbeda nyata dengan perlakuan lainnya (Tabel 1). Bila dibandingkan dengan perlakuan toksin murni asam fusarat, terlihat bahwa tanaman uji mengalami layu pada semua tingkat konsentrasi toksin, walaupun dengan lama inkubasi yang berbeda (Tabel 2). Hal yang sama juga ditemukan oleh Matsumoto *et al.* (1995), yaitu pertumbuhan bonggol pisang kultivar maca dan nanicao mutlak terganggu pada media tumbuh

yang mengandung asam fusarat konsentrasi 0,1 µM. Matinya tanaman uji pada perlakuan filtrat toksin dan asam fusarat murni disebabkan oleh rusaknya sel akibat toksin tersebut. Menurut Ballio (1981), asam fusarat dapat mempengaruhi fungsi mitokondria yang dapat menghambat enzim katalase, serta mengganggu membran sel yang dapat mengakibatkan kebocoran ion.

Dalam penelitian ini, tanaman yang layu maupun tanaman yang masih bertahan hidup terus diamati sampai 2 bulan berikutnya. Dari hasil pengamatan tersebut ditemukan terjadinya penyembuhan atau *recovery* dari tanaman sakit, walaupun persentasenya tidak terlalu tinggi (Tabel 1 dan 2). Perlakuan dengan filtrat toksin dari kultur *Foc* menunjukkan bahwa makin tinggi konsentrasi yang digunakan, plantlet yang mengalami *recovery* cenderung makin sedikit. Pada perlakuan dengan toksin murni asam fusarat, plantlet yang mengalami *recovery* hanya terjadi pada konsentrasi rendah (0,1 dan 0,05 µM). Kejadian ini mungkin disebabkan toksin yang diberikan tidak mematikan semua jaringan tanaman, sehingga sel-sel yang masih hidup tetap bertahan dan berkembang, atau kemungkinan terjadinya induksi ketahanan akibat perlakuan tersebut. Morpurgo *et al.* (1994) menyatakan bahwa pada kultivar pisang resisten SH 3362, pertumbuhan tunas justru terstimulasi dengan perlakuan konsentrasi asam fusarat rendah (0,045 µM). Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa pertumbuhan tunas baru terganggu pada konsentrasi asam fusarat 0,09 µM.

Pada pengamatan selanjutnya terhadap plantlet yang masih hidup dari perlakuan filtrat toksin dari kultur *Foc* (Tabel 3), ditemukan adanya gangguan pertumbuhan seperti kerdil, perakaran tidak terbentuk, dan kadang-kadang menghitam. Dalam Tabel 3 terlihat bahwa plantlet yang tumbuh sempurna hanya terjadi pada perlakuan filtrat toksin konsentrasi rendah (10%), yaitu 13,2% dari populasi plantlet yang bertahan hidup. Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi, plantlet tumbuh tidak sempurna.

**KESIMPULAN**

**Tabel 3. Plantlet yang hidup dan kondisinya setelah 2 bulan diperlakukan dengan beberapa konsentrasi filtrat toksin dari kultur *Foc* (*Life plantlets and its condition after 2 months treatment by using several filtrate toxin concentrations*)**

Konsentrasi filtrat toksin ( <i>Filtrate toxin concentration</i> )	Plantlet hidup ( <i>Plantlet survival</i> )	Plantlet merumput ( <i>Plantlet rot</i> )	Plantlet mati ( <i>Plantlet dead</i> )
0	100	100	0
10	13,2 (17)	17,2 (22)	69,7 (91)
100	13,2	0	100
1000	13,2	0	100
60	0	0	-

\* Setelah 4 minggu (*After 4 weeks*), \*\* Setelah 2 bulan (*After 2 months*)

1. Filtrat toksin dari kultur *Foc* pada konsentrasi 40 dan 60%, dapat digunakan sebagai media pengujian dini ketahanan pisang cavendish terhadap penyakit layu fusarium pada tingkat in vitro.
2. Semakin tinggi konsentrasi filtrat toksin dari kultur *Foc* dan toksin murni asam fusarat yang ditambahkan semakin cepat masa inkubasi atau munculnya gejala penyakit.
3. Terjadi fenomena *recovery* atau induksi ketahanan dari tanaman sakit akibat perlakuan toksin murni asam fusarat dan filtrat toksin dari kultur *Foc*. Hasil terbaik ditemukan pada pemberian filtrat toksin dari kultur *Foc* konsentrasi 10%.

**PUSTAKA**

1. Ahmed, K. Z., A. Mesterhazy, and F. Sagi. 1991. *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for Fusarium-resistance. I. Double-layer culture technique. *Euphytica* 57:251-257.
2. ———, A. Mesterhazy, T. Bartok, and F. Sagi. 1996. *In vitro* techniques for selecting wheat (*Triticum aestivum* L.) for Fusarium-resistance. II. Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium*-resistance in the somaclonal. *Euphytica* 80:341-349.
3. Badriah, D. S. 2001. Uji resistensi kultivar gladiol introduksi terhadap *Fusarium oxysporum* secara in vitro. Tesis. Program Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
4. Ballio, A. 1981. *Structure activity relationship*. New York. Academic Press.
5. Djatnika, I., C. Hermanto, dan Eliza. 2003. Pengendalian hayati layu Fusarium pada tanaman pisang dengan *Pseudomonas fluorescens* dan *Gliocladium sp.* J.

- Hort.13(3):205-211.
6. Jin, H., G. L. Hartman, D. Nickell, and J. M. Widhdom. 1996. Phytotoxicity of culture filtrate from *Fusarium solani*, the causal agent of sudden death syndrome of soybean. *Plant Disease* 80(8):922-927.
  7. Karsinah, Sunyoto, Jumjunidang, dan Nurhadi. 1999. Teknik kultur *Double-layer* untuk seleksi in vitro pisang tahan *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *J. Hort.*9(2):93-98.
  8. Matsumoto, K., M. L. Barbosa, L. A. C. Souza, and J. B. Teixeira. 1995. Race 1 Fusarial wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica* 84:67-71.
  9. 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.
  10. Nasir, N. dan Jumjunidang. 2003. Karakterisasi ras *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* dengan metode vegetative compatibility group test dan identifikasi kultivar pisang yang terserang. *J. Hort.*13(4):267-284.
  11. Nurhadi, M. Rais, dan Harlion. 1994. Serangan bakteri dan cendawan pada tanaman pisang di propinsi Dati I Lampung. *Info Hort.* 2(1):37-40.