

INDUKSI MUTASI DAN SELEKSI *IN VITRO* MENGGUNAKAN
ASAM FUSARAT UNTUK KETAHANAN PENYAKIT LAYU
PADAPISANG AMBON HIJAU
[Mutative Induction and In-vitro Selection Using Fusaric Acid to Resist Against
Fusarium Wilt Disease in Banana cv "Ambon Hijau"]

Endang G Lestari^H, I Mariska, I Roostika dan M Kosmiatin

BB-Biogen
Jl. Tentara Pelajar 3 A Bogor

ABSTRACT

Due to its high vitamin and nutrition content, banana (*Musa paradisiaca* L.) is deemed necessary as the mineral resources. The demand on the disease free seedlings are recently increasing. However, facing the problems of *Fusarium* attack in the production centers, health seedlings in the sufficient number are difficult to be provided. Hence, to solve the problems, mutative induction and *in vitro* selection to the shoot tip explants has been carried out in banana cv "Ambon Hijau", This research was conducted at the tissue culture laboratory of Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development. On level of 500; 750; 1000; and 1500 rad, Gamma ray radiation have been applied, continued by *in vitro* selection by using 0, 30 and 45 mg/l fusaric acid. The selected explant about 0,5 cm were treated for 2 x 4 week selection period. The result showed that the best medium for regeneration was MS basal medium contains 3 mg/l BA. The irradiation could increase somaclonal variation as well as created some new somaclones that resistant to fusaric acid. However irradiation and *in vitro* selection caused inhibition of culture growth. The more dosage of irradiation and concentration of fusaric acid decreased regeneration rate of explant. Inoculation by using conidia (5 g/kg soil) provided 18 putative mutant and higher concentration of conidia (10g/10kg soil) produced 37 mutant that resistant to *Fusarium*.

Kata Kunci: Seleksi *in vitro*, penyakit layu fusarium, pisang (*Musa paradisiaca* L.), cv "Ambon Hijau".

PENDAHULUAN

Pisang (*Musa paradisiaca* L.) adalah tanaman buah asli Indonesia. Kebutuhan akan buah pisang saat ini cukup tinggi karena kandungan vitamin dan gizinya yang tinggi dan merupakan sumber mineral. Salah satu masalah yang sering dihadapi pada pertanaman pisang disentra-sentra produksi adalah penyakit layu yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* Schlecht. sp. *cubense* (Deptan, 2000). Untuk mengatasi masalah tersebut, salah satu cara yang dapat diterapkan adalah penggunaan varietas yang tahan dan bermutu tinggi.

Dalam perakitan varietas unggul tanaman diperlukan adanya keragaman genetik yang tinggi karena dari populasi yang tersedia dapat dilakukan seleksi terhadap sifat-sifat unggul yang diinginkan. Tanaman pisang selalu diperbanyak secara vegetatif sehingga keragamannya rendah. Untuk mendapatkan keragaman genetik yang tinggi dapat dilakukan dengan memberikan perlakuan fisik menggunakan sinar gamma atau menggunakan bahan mutagen tertentu (IAEA, 1977; Van Harten, 1998; Ahloowalia, 1997). Mutasi secara alami terjadinya sangat lambat (Daud, 1986) sehingga induksi mutasi buatan (baik fisik maupun bahan kimia)

merupakan salah satu cara yang efektif untuk meningkatkan keragaman genetik pada berbagai spesies tanaman (Maluszynski *et al.*, 1995).

Salah satu cara perbaikan tanaman untuk ketahanan terhadap layu bakteri adalah menggunakan teknik seleksi *in vitro* yang dikombinasikan dengan keragaman somaklonal (Pedrieri, 2001; Witjaksono, 2003; Chai *et al.*, 1999). Melalui kombinasi tersebut telah banyak dihasilkan berbagai varietas baru seperti pada tanaman buah-buahan dan sayuran yang bahkan telah digunakan oleh petani dalam skala luas (Mandal *et al.*, 2000).

Variasi genetik yang didapatkan melalui kultur *in vitro* meliputi karakter agronomi seperti tahan penyakit (Van den Bulk, 1991) contohnya pada tanaman kentang telah didapatkan tanaman yang tahan terhadap beberapa patogen seperti *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* dan *Fusarium oxysporum*.

Metoda seleksi *in vitro* merupakan salah satu cara yang efektif karena perlakuan lebih dapat diarahkan kepada sifat yang diinginkan seperti untuk ketahanan terhadap penyakit, toleransi terhadap kekeringan dan lahan masam (Rajashekar, 1995). Selain

itu seleksi lebih efektif karena dapat dilakukan pada tingkat sel, dan dalam populasi yang besar sehingga dapat diperoleh kandidat somaklon yang tahan dalam jumlah yang banyak.

Untuk peningkatan ketahanan terhadap *F oxysporum* umumnya seleksi dilakukan terhadap massa sel atau nodul bakal tunas yang telah diberi perlakuan induksi mutasi dan dikulturkan pada media yang mengandung komponen seleksi seperti toksin murni asam fusarat (AF) atau filtrat yang diisolasi dari patogen (Arceoni *et al.*, 1987; Latunde-Dada dan Lucas, 1988). Melalui metode tersebut telah dihasilkan tanaman yang tahan terhadap penyakit layu *Fusarium* antara lain pada anyelir (Arai dan Takeuchi, 1993), gandum (Fadel dan Wenzel, 1993, Ahmed *et al.*, 1996), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994 dan Matsumoto *et al.*, 1995), panili (Mariska *et al.*, 2000), dan abaka (Damayanti, 2002). Dalam hal ini sifat ketahanan yang diperoleh ternyata dapat diwariskan pada keturunannya. Ketahanan yang diperoleh bisa menurun atau tidak, karena perubahan yang terjadi dapat bersifat epigenetik yaitu perubahan yang tidak diturunkan atau perubahan yang bersifat genetik yaitu perubahan yang diturunkan, sehingga keturunannya akan tetap tahan (Hadi dan Bridgen, 1996).

Dari berbagai penelitian seleksi *in vitro*, dihasilkan adanya korelasi antara sel yang tahan terhadap komponen seleksi dan mampu diregenerasikan dengan ketahanan tanaman terhadap faktor biotik dan abiotik (Mariska *et al.*, 2001).

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan tanaman pisang yang tahan terhadap penyakit layu *fusarium* melalui seleksi *in vitro*

BAHANDAN METODE

Penelitian dilakukan mulai bulan April 2004 sampai dengan bulan Maret 2005 di Laboratorium Kultur Jaringan Kelompok Peneliti Biologi Sel dan Jaringan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor. Irradiasi sinar gamma dilakukan di Pusat Aplikasi Tenaga Nuklir Pasar Jumat Jakarta. Penelitian terdiri dari beberapa tahap yang berurutan yaitu (1) regenerasi dan multiplikasi tunas (2) radiasi dan seleksi *in vitro* menggunakan asam Fusarat dan (3) pengujian

di rumah kaca untuk ketahanan terhadap penyakit layu menggunakan inokulum *Fusarium oxysporum*

Regenerasi dan multiplikasi tunas

Mata tunas diambil dari lapang, disterilisasi berturut-turut menggunakan alkohol 70 % - 5 menit, HgCl₂ - 0,2 % - 2 menit dan kloroks 20 % -15 menit dan terakhir dibilas dengan aquades steril 3x. Selanjutnya mata tunas ditanam dalam media dasar Murashige dan Skoog (MS) ditambah vitamin dari grup B (pyridoksin, thiamin, nicotinamid), myoinositol 100 mg/l dan zat pengatur tumbuh BA(Benzil adenin) 3 mg/l + thidiazuron (TDZ) 0,2 mg/l. Tunas yang dihasilkan kemudian ditanam pada media perlakuan untuk mengetahui media terbaik untuk perbanyak. Perlakuan zat pengatur tumbuh untuk regenerasi tunas adalah: BA (0,1 dan 3 mg/l) + TDZ (0, 0,2 dan 0,4 mg/l), pada semua media perlakuan ditambahkan polivinil piroolidon (PVP) 100 mg/l.

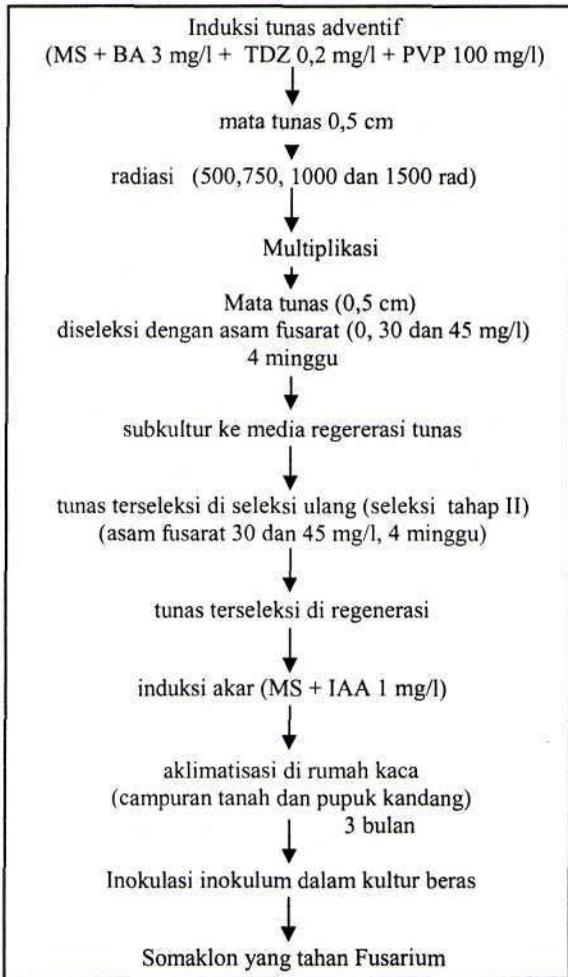
Radiasi dan seleksi *in vitro*

Biakan hasil regenerasi dan multiplikasi tunas dari berbagai perlakuan, diisolasi yang berukuran 0,5 cm kemudian ditanam pada media dasar MS tanpa zat pengatur tumbuh selanjutnya diradiasi. Irradiasi menggunakan sinar gamma pada dosis (0, 500, 750, 1000 dan 1500 rad) dosis tersebut yang digunakan karena percobaan yang sama pada tanaman abaka telah menghasilkan galur somaklon yang tahan penyakit layu *fusarium* (Damayanti, 2002).

Tunas yang di irradiasi selanjutnya disubkultur pada media untuk regenerasi yaitu MS +B A 3 mg/l + th 0,4 mg/l. Biakan yang dihasilkan selanjutnya diisolasi yang berukuran ± 0,5 cm kemudian ditanam pada media seleksi yaitu media dasar MS + AF (0,30 dan 45 mg/ l), dan diinkubasikan selama 4 minggu. Rancangan percobaan adalah acak lengkap dan masing-masing perlakuan diulang 10 kali.

Biakan yang masih tetap hidup pada media seleksi kemudian diregenerasikan dan diseleksi kembali pada media yang sama untuk seleksi tahap ke=2. Tunas yang tetap hidup kemudian diregenerasikan dan diakarkan supaya membentuk plantlet. Plantlet yang dihasilkan kemudian diaklimatisasi menggunakan media tanah dan kompos dengan perbandingan 2:1 di rumah

kaca. Uji ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* dilakukan menggunakan spora jamur *Fusarium oxysponim* yang dikulturkan pada media beras. Bahan tanaman yang diuji ketahanannya adalah bibit yang berumur 3 bulan (tinggi ± 20-30cm). Untuk inokulasi tersebut inokulum sebanyak 5 g dicampur dengan 10 kg tanah. Tanah yang digunakan terlebih dahulu disterilisasi dengan menggunakan autoklaf. Setelah inokulum dicampur dengan tanah secara merata, bibit yang akan diuji kemudian di tanam. Peubah yang diamati adalah gejala serangan *Fusarium*, jumlah tanaman yang tidak terserang (hidup) dan jumlah tanaman yang layu dan mati. Diagram alir seleksi *in vitro* untuk mendapatkan tanaman yang tahan jamur *Fusarium oxysporum* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Diagram alir seleksi *in vitro* dan pengujian sifat ketahanan menggunakan spora jamur *Fusarium oxysponim*.

HASIL

Tunas yang dihasilkan pada perlakuan media dasar MS dan BA (1-3 mg/l) + thidiazuron 0,2 dan 0,4 mg/l dapat dilihat pada Tabel 1.

Regenerasi pada media MS + BA 3 dan TDZ 0,2 mg/l pada tunas yang telah diberi perlakuan radiasi dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Pertumbuhan tunas pada media MS + BA dan thidiazuron, 8 minggu setelah tanam.

Perlakuan (mg/l)	Rataan jumlah tunas	Rataan jumlah daun	Rataan tinggi tunas
Kontrol	2,16 ab	4,41 ab	1,86 a
BA 1	1,5 ab	5,41 ab	1,88 a
BA 3	4,3 a	4,67 ab	1,20 b
TDZ 0,2	1,66 ab	4,91 ab	1,60 ab
TDZ 0,4	2,16 ab	5,04 ab	1,90 a
BA 1 + TDZ 0,2	1,83 ab	4,48 ab	1,70 ab
BA 3 + TDZ 0,2	2,5 ab	6ab	1,50 ab
BA 1 + TDZ 0,4	1,16 ab	7a	1,75 ab
BA 3 + TDZ 0,4	1 b	2,5 b	1,42 ab

keterangan: angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada uji Duncan taraf 5%
BA = Benzil Adenin, TDZ = thidiazuron

Tabel 2. Pertumbuhan tunas setelah perlakuan radiasi, minggu ke-8.

Dosis radiasi (rad)	Rataan jumlah tunas
0	5 ±0,15
500	1,8 ± 1,25
750	1,75 ±0,70
1000	2,5 ±0,75
1500	2,1 ± 1,19

Tunas yang telah diberi perlakuan radiasi dan seleksi menggunakan asam fusarat kemudian diregenerasikan, rataan jumlah tunas yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 3.

Seleksi *in vitro* menggunakan asam fusarat menyebabkan kematian pada eksplan, persentase tunas yang mati pada minggu ke-8 setelah tanam dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 3. Pengaruh radiasi dan media seleksi asam fusarat terhadap pertumbuhan tunas, 8 minggu setelah tanam.

Dosis radiasi	Rataan jumlah tunas		
	AF 0 mg/l	AF 30 mg/l	AF 45 mg/l
0	7 ±0,10	5 ±0,16	5 ±0,18
500	5 ± 0.62	5 ±0.57	4 ±0,70
750	5 ± 0.70	3.4 ±1.41	3 ±0.70
1000	5 ±0,27	3,2 ±0,43	3 ±1.01
1500	4 ±0,35	2.5 ±0,45	2 ±1.0

AF: asam fusarat

Tabel 4. Persentase tunas yang mati setelah perlakuan seleksi menggunakan asam fusarat (AF), minggu 8 setelah tanam.

Dosis radiasi (rad)	Persentase (% ase)		
	AF0	AF 30%	AF 45 %
0	0	25	80
500	0	60	60
750	0	60	60
1000	0	40	26
1500	0	67	75

Kultur yang tumbuh setelah dilakukan seleksi tahap II disajikan pada Tabel 5

Pertumbuhan dan jumlah tanaman yang tetap hidup setelah inokulasi menggunakan *Fusarium*, pada minggu ke 12 dapat dilihat pada Tabel 6. Jumlah tanaman yang tetap hidup setelah seleksi dan inokulasi tidak sama karena kondisi fisiologi eksplan beragam akibat perlakuan radiasi.

Serangan oleh jamur fusarium dapat dilihat pada Foto 1 dan menunjukkan adanya tanaman yang mati

Gejala awal serangan oleh jamur fusarium dapat dilihat pada Foto 2.

PEMBAHASAN

Produksi tunas *in vitro*

Penambahan BA 3 mg/l pada media dasar MS dapat menghasilkan tunas lebih banyak dibanding BA 1 mg/l. Pada penelitian ini jumlah tunas terbanyak dihasilkan pada media MS yang mengandung BA 3 mg/l yaitu sebanyak 4,3 buah. Penambahan TDZ 0,2 s/d 0,4 mg/l pada media yang sudah mengandung BA 1 dan 3 mg/l tidak dapat meningkatkan jumlah tunas demikian pula perlakuan tunggal TDZ. Dengan demikian BA yang ditambahkan pada konsentrasi yang

Tabel 5. Pertumbuhan kultur pisang ambon pada seleksi tahap II, 8 minggu setelah tanam.

Dosis radiasi	AF0		AF 30%		AF 45%	
	Rataan tinggi tunas (cm)	Rataan jumlah tunas	Rataan tinggi tunas (cm)	Rataan jumlah tunas	Rataan tinggi tunas (cm)	Rataan jumlah tunas
0	6±0,12	7,2±0,U	0,5 ±0,11	9 ±0,12	0,28±0,14	10 ±1,49
500	5,1±0,67	6,1±0,56	0,1 ±0,43	4,6±2,64	0,8 ±0,18	3,4±2,50
750	5,3±0.69	5,2±0,61	0,5 ±0,42	4,2 ±2,21	0,6 ±0,30	4,72 ±,55
1000	5,4±0,61	4,9±0,71	0,7 ±0,24	5,2 ±3,18	0,49 ±0,27	4,08 ±2,31

Tabel 6. Jumlah tanaman yang tetap hidup setelah inokulasi dengan *Fusarium*, 12 minggu setelah tanam.

Dosis radiasi	AF 0 mg/l	AF 30 mg/l	AF 45 mg/l	Jumlah Tanaman yang hidup
0	5(0)	5(1)	11(4)	5
500	5(0)	0(0)	4(0)	0
750	10(1)	11(4)	5(0)	5
1000	12(5)	5(0)	12(3)	8

Keterangan: 5(0) = dari 5 tanaman tidak ada yang hidup.



Foto1. Serangan jamur pada daun yang mengakibatkan tanaman mati.



Foto2. Beberapa nomor tanaman sudah tampak mulai menunjukkan gejala serangan oleh *Fusarium*

dicobakan sudah mampu memacu multiplikasi tunas (Tabel 1).

Radiasi dan seleksi *in vitro*

Perlakuan iradiasi menyebabkan pertumbuhan tunas menjadi lambat, kondisi ini dimungkinkan karena adanya kerusakan pada sel-sel meristem yang sangat radiosensitif, hasil yang sama didapatkan pada radiasi kalus abaka, semakin tinggi dosis radiasi yang diberikan maka semakin rendah kemampuan kalus beregenerasi (Sukmadjaja *etal.*, 2002). Iradiasi dapat menyebabkan pembelahan sel menjadi terhambat yang selanjutnya menghambat jumlah sel. Aktifitas zat pengatur tumbuh seperti IAA yang berperan untuk pembelahan dan pemanjangan sel juga terganggu setelah mengalami radiasi. Regenerasi tunas setelah perlakuan radiasi dengan dosis 500 rad sudah menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan tunas (Tabel 2).

Pengaruh radiasi pada kematian tunas ditandai oleh perubahan warna mata tunas menjadi coklat dan hitam selain itu tunas yang dihasilkan daya regenerasinya sangat lambat. Tunas yang tahan terhadap iradiasi sinar gamma, tampak tetap hijau dan daya regenerasinya tidak menurun.

Pada perlakuan tanpa radiasi dihasilkan tunas sebanyak 5 buah sedangkan pada perlakuan radiasi 500 rad hanya 1,8, demikian pula dosis radiasi lebih tinggi (750-1500 rad). Pengamatan terhadap tunas yang ditumbuhkan dalam media seleksi menunjukkan bahwa asam fusarat menyebabkan pertumbuhan kultur menjadi terhambat dan sebagian tunas menjadi mati. Efek penghambatan pertumbuhan tunas semula diakibatkan oleh pengaruh radiasi setelah itu ditambah oleh perlakuan seleksi. Iradiasi dan seleksi *in vitro* menyebabkan pertumbuhan tunas semakin terhambat dan ada kecenderungan bahwa semakin tinggi dosis radiasi dan

konsentrasi asam fusarat yang digunakan maka tunas yang dihasilkan semakin sedikit dan semakin pendek (Tabel 3).

Kemampuan regenerasi tunas tersebut semakin menurun pada perlakuan asam fusarat 45 mg/l. Asam fusarat merupakan komponen organik yang bersifat toksin yang dapat menghambat oksidasi sitokinin, menghambat proses respirasi pada mitokondria, menurunkan ATP pada plasma membran dan mereduksi aktifitas polifenol oksidase sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Sukmadjaja *et al.*, 2002). Peningkatan konsentrasi filtrat *F oxysporum* mengakibatkan penurunan daya regenerasi juga diperoleh pada penelitian Mariska *et al.*, 2001 pada tanaman abaka dan pada tanaman panili (Mariska *et al.*, 2000). Adanya daya hambat filtrat *F oxysporum* terhadap kemampuan regenerasi kalus menunjukkan bahwa filtrat yang digunakan mengandung komponen kimia yang bersifat toksis terhadap jaringan tanaman. Tunas yang tetap hidup pada seleksi tahap pertama tersebut diseleksi kembali menggunakan asam fusarat dengan konsentrasi yang sama, supaya ada peningkatan tingkat ketahanan terhadap penyakit layu.

Tunas yang tidak tahan pada media seleksi tampak berubah warnanya menjadi coklat dan hitam dan akhirnya mati. Penghambatan pertumbuhan tunas pada media seleksi tersebut diduga bahwa asam fusarat yang digunakan sudah berperan sebagai komponen seleksi. Hasil yang sama didapatkan oleh Thakur *et al.*, 2002 pada seleksi *in vitro* tunas anyelir, seleksi menggunakan 15% kultur filtrat *F oxysporum*, mampu menghasilkan tunas yang tahan terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Pada umumnya tunas yang diberi perlakuan radiasi dengan dosis 1500 rad dan kemudian diseleksi menggunakan asam fusarat 30 dan 45 mg/l, menjadi mati diduga pada dosis tersebut tingkat kerusakan sel cukup tinggi. Dengan demikian dapat dianggap bahwa dosis tertinggi untuk tunas pisang ambon hijau adalah 1000 rad, pada dosis tersebut sebagian tunas masih mampu bermultiplikasi dan tahan terhadap media seleksi.

Pertumbuhan pada tunas yang diseleksi tahap kedua tampak lebih terhambat, pada seleksi tahap kedua tersebut kultur yang mengalami kematian tampak lebih banyak (Tabel 4).

Konsentrasi asam fusarat yang digunakan pada penelitian ini dianggap sudah tepat, dimana penggunaan 45 mg/l sudah mampu menyebabkan kematian eksplan pada tunas yang tidak diradiasi sebesar 80%. Pada tunas yang diradiasi pada dosis 500, 750 dan 1000 rad menyebabkan kematian berturut-turut sebesar 60, 60 dan 26% (Tabel 4), tingkat kematian eksplan yang lebih rendah tersebut dapat disebabkan karena radiasi yang diberikan meningkat ketahanannya terhadap faktor seleksi. Hal ini menunjukkan bahwa seleksi secara bertahap yang dilakukan pada tunas yang lolos seleksi pada tahap sebelumnya sudah efektif. Pada seleksi tahap kedua ini biakan yang diradiasi dengan dosis 1500 rad pada umumnya mati, diduga iradiasi sebesar 1500 rad menyebabkan tingkat kerusakan yang tinggi ditandai banyaknya eksplan yang mati.

Tunas yang tetap hidup setelah seleksi tahap II diduga tahan terhadap penyakit layu fusarium, tunas tersebut kemudian diakarkan pada media dasar MS + IB A 1mg/l untuk menghasilkan plantlet. Plantlet yang dihasilkan kemudian diaklimatisasi di rumah kaca.

Pengaruh perlakuan radiasi dan seleksi menggunakan asam fusarat dapat dilihat pada Tabel 5. Penghambatan pertumbuhan dapat dilihat pada jumlah tunas yang dihasilkan sedangkan pada tinggi tunas tidak dapat dibedakan pengaruh perlakuan radiasi dan seleksi.

Inokulasi bibit pisang menggunakan spora

Fusarium oxysporum

Gejala serangan *penyakit fusarium* pada tunas yang diinokulasi ditandai adanya bercak berwarna kuning yang dapat dilihat pada minggu ke-4 setelah inokulasi. Gejala pertama kali muncul pada pangkal daun kemudian melebar ke daun di atasnya akhirnya mencapai pucuk daun sehingga tanaman layu dan mati. Foto 1 menunjukkan serangan *jamur Fusarium* berupa bercak kuning yang akhirnya menyebar dan menyebabkan daun menjadi layu dan tanaman mati. Ishak (2000) menyatakan bahwa gejala serangan *penyakit fusarium* dimulai pada daun pertama dan kedua dari bawah ditandai dengan adanya perubahan warna daun menjadi kuning diikuti dengan nekrosis,

secara bertahap serangan jamur akan menyebar dan akhirnya akan menyerang pada daun keseluruhan.

Sampai minggu ke-4 setelah inokulasi, sebagian besar tanaman masih segar dan tidak menunjukkan adanya gejala serangan. Sedangkan pada minggu ke-8 setelah inokulasi, gejala serangan semakin parah. Gejala serangan berupa daun menguning dijumpai pada berbagai somaklon, pada umumnya jumlah daun yang mengalami serangan tidak lebih dari 3 daun. Pada minggu ke-10 setelah inokulasi hampir pada semua tanaman sudah mulai terserang dan serangan yang ditimbulkan sudah sampai ke daun bagian pucuk, sedangkan beberapa tanaman tampak sudah kering dan mati.

Pada minggu ke-12 setelah inokulasi, dihasilkan beberapa somaklon yang tetap hijau berasal dari tunas tanpa radiasi dan tanpa seleksi, berasal dari perlakuan radiasi 750 rad tanpa seleksi dan seleksi dengan AF 30 mg/l dan perlakuan radiasi 1000 rad tanpa seleksi dan seleksi menggunakan AF 45 mg/l. Tanaman yang diduga tahan penyakit *hyufusarium* paling banyak diperoleh dari perlakuan radiasi 1000 rad yaitu 8 tanaman. Sedangkan pada perlakuan 500 rad tidak ada yang tahan, dari perlakuan radiasi 750 rad diperoleh 5 tanaman. Dengan demikian dapat dianggap bahwa radiasi pada tunas mampu meningkatkan keragaman genetik dan ketahanan terhadap penyakit karena pada tunas yang tidak diseleksi tetapi diinokulasi dengan spora *F oxysporum* diperoleh nomor-nomor yang tahan. Hasil yang diperoleh membuktikan bahwa radiasi yang diberikan dapat mempercepat program perbaikan tanaman melalui peningkatan keragaman genetik sehingga dihasilkan varietas unggul (Karp, 1995).

Pada penelitian ini diperoleh beberapa tanaman tanpa perlakuan radiasi tetapi tahan penyakit layu pada tahap inokulasi, tanaman tersebut walaupun tidak diradiasi tetapi berasal dari biakan yang telah mengalami subkultur beberapa kali dan telah mengalami tahap seleksi menggunakan asam fusarat.

Imelda *et al*, 1997 melakukan radiasi pada pisang Raja Sere 2000 rad dan diperoleh beberapa klon yang toleran terhadap Banana Buncy Top Virus (BBTV) demikian pula penelitian Mathius dan Haris (1999) menunjukkan bahwa dengan radiasi sinar gamma pada dosis 1000 rad dan seleksi menggunakan asam fusarat

0,4 mM dapat dihasilkan beberapa lini pisang nangka yang toleran terhadap asam fusarat.

Untuk mengetahui jumlah inokulum dan umur bibit yang tepat, maka dilakukan inokulasi menggunakan bibit yang lebih muda yaitu berumur 2 bulan setelah aklimatisasi, dengan tinggi tanaman \pm 15 cm dan inokulum yang digunakan lebih banyak yaitu 10 g inokulum /10 kg tanah. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada minggu ke-4 setelah inokulasi beberapa tanaman sudah mulai terserang ditandai dengan adanya perubahan warna daun menjadi kuning (foto 2). Pada minggu ke-10 setelah inokulasi didapatkan beberapa somaklon yang hidup belum menunjukkan adanya serangan, nomor-nomor yang diduga tahan tersebut dapat dilihat pada Tabel 6.

Inokulasi menggunakan 10 g inokulum menimbulkan serangan pada beberapa somaklon hasil seleksi, walaupun somaklon tersebut lolos pada media seleksi asam fusarat. Adanya nomor-nomor tanaman yang terkena serangan *fusarium* tersebut diduga karena eksplan yang diseleksi adalah mata tunas berukuran \pm 0,5 cm dianggap terlalu besar sehingga komponen seleksi yang digunakan tidak sampai ke DNA pada inti sel yang sedang aktif membelah. Di dalam seleksi *in vitro* sebaiknya ekplan yang diseleksi berukuran sekecil mungkin agar komponen seleksi dapat masuk ke dalam sel, dan benar-benar terjadi kerusakan di dalam sel sehingga hanya sel yang tahan terhadap asam fusarat saja yang tetap dapat tumbuh. Yang menentukan keberhasilan pembentukan varietas baru melalui induksi mutasi dan seleksi *in vitro* antara lain jenis eksplan yang digunakan serta dosis radiasi dan jenis serta konsentrasi inokulum untuk seleksi. Eksplan meristem atau kalus bersifat radiosensitif sehingga lebih efektif menghasilkan mutan (Tal, 1983).

Inokulasi pada tahap II ini didapatkan nomor-nomor tanaman yang tahan lebih banyak, diduga karena kultur yang digunakan umurnya lebih lama dan sudah disubkultur beberapa kali sehingga walaupun tidak diseleksi tetapi diberi perlakuan radiasi tunas tersebut dapat menyebabkan perubahan genetik. Salah satu faktor yang menyebabkan mutasi pada eksplan adalah periode kultur yang lama dan seringnya subkultur (Ahloowalia, 1986).

KESEMPULAN

- Media yang terbaik regenerasi tunas yaitu MS + BA3mg/l
- Pada media seleksi terlihat ada pengaruh radiasi dan asam fusarat terhadap regenerasi tunas. Semakin tinggi dosis radiasi (0-1500 rad) dan konsentrasi asam fusarat (0-45 mg/l) maka semakin rendah kemampuan regenerasi tanaman yang diseleksi.
- Induksi mutasi menggunakan sinar gamma dan seleksi *in vitro* menggunakan asam fusarat dapat menghasilkan nomor-nomor harapan dianggap tahan penyakit layu *fusarium* berdasarkan inokulasi menggunakan jamur *Fusarium oxysporum*. Inokulasi menggunakan inokulum sebesar 5 g/10 kg tanah menghasilkan 18 kandidat dan inokulasi menggunakan inokulum sebesar 10 g/10 kg tanah menghasilkan 37 kandidat somaklon yang tahan.

DAFTAR PUSTAKA

- Arceoni S, M Pezzotti and F Damiani F. 1987.** *In vitro* selection on alfalfa plants resistant to *Fusariumf.sp. medicaginis*. *Theor. Appl. Genet.* 74, 700-705.
- Ahloowalia BS. 1997.** Improvement of horticultural plants through *in vitro* culture and induced mutations. *Hort Biotech*, 545-549. In: Altman Aand Ziv M (Eds.) *In vitro* Culture and Breeding. Acta Hort.
- Ahmed KZ, A Mesterhazy, A 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 somaclones. *Euphytica* 91,341-349.
- Arai M and M Takeuchi. 1993.** Influence of *Fusarium* wilt toxin(s) on carnation cells. *Plant Cell Tiss and Org. Cult.* 34, 287-293.
- Chai M, YW Ho, KW Liew, A Mohd, JM Asil and AA Mohamed. 1999.** *In vitro* manipulation and mutation breeding for the improvement of banana. *INFOMUSA* 8(2).
- Damayanti F. 2002.** Seleksi *in vitro* untuk ketahanan terhadap penyakit layu *fusarium* pada tanaman abaka (*Musa textilis* Nee.) *Tesis Program Pasca Sarjana*, Institut Pertanian Bogor.
- Daud ME, 1986.** Tissue culture and the selection of resistant to pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 24, 159-186.
- Deptan 2000.** *Budidaya pisang*. BPTP Palangkaraya.
- Fadel F andG Wenzel. 1993.** *In vitro* selection for tolerance to *Fusarium* in F1 microspore population of wheat. *Plant Breeding* 110,89-95
- Hadi MS and MP Bridgen. 1994.** Somaclonal variation as a tool to develop pest resistant plants of *Torena fournieri* "Compacta Blu" *Plant Cell and Organ Culture* 45, 42-50.
- IAEA. 1977.** Manual on Mutation, Viability and Population Structure. *ActaAgric. Cand.* IV, 601-632.
- Imelda M, P Deswita and Hendratno. 1997.** Development of banana cv. Raja sere resistant to Buncy Top Virus through gamma irradiation. *Proc of the Indonesian Biotech Conf1997*, 455-567. Jakarta Indonesia, June 17-19.
- Ishak. 2000.** Improvement of banana quality through induced mutation. *Paper Presented in Seminar on Methodology for plant Mutation Breeding: Serening for Quality for Regional Nuclear Cooperation in Asia*, 24-28. Jakarta.
- Karp A. 1995.** Somaclonal Variation As A Tool For Crop Improvement. *Euphytica* 85, 295-302.
- Latunde-Dada and JA Lucas. 1988.** Somaclonal variation and resistance to verticillium wilt in lucane *Medicago sativa* L. plant regenerated from callus. *Plant Sci.* 38, 111-119.
- Maluszynski M, BS Ahloowalia and B Sigurbjornsson. 1995.** Application of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. *Euphytica* 85,303-315.
- Mandal AK, AD Chakrabarty and SK Datta. 2000.** Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of *Chrysanthemum*. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* 60,33-38.
- Mariska I. M Tombe, M Kosmiatin, Hobir dan A Ilusni. 2000.** Seleksi silang tunas panili secara *in vitro* dan pengujiannya terhadap *F. oxysporum*. *Laporan Hasil Penelitian Balitbio*.
- Mariska I, D Sukmadjaja, M Tombe, EG Lestari dan M Kosmiatin. 2001.** Peningkatan ketahanan tanaman abaka terhadap penyakit layu melalui kultur *in vitro*.

Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman, 30-31. Bogor.

Matsumoto K, ML Barbosa and LAC Souza. 1995. Race 1 fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica* **84**, 67-71.

Mathius NT dan N Haris. 1999. Induction of genetic variation of banana cv Nangka by gamma Co-60 irradiation and fusaric acid. *Menara Perkebunan* **67** (1), 13:22.

Morpurgo R, SV Lopato, R Afza and FJ Novak. 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* **75**, 121-120.

Pedrieri S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* **64**, 185-210.

Rajashekar G, DPalquist and CA Ledbetter. 1995. *In vitro* screening procedure for osmotic tolerance in *Prunus*. *Plant Cell Tiss. And Org. Cult.* **41**, 159-164.

Sukamadjaja D, I Mariska, EG Lestari, M Kosmiatin, M Tombe dan Hobir. 2002. Seleksi silang tunas

abaka dengan asam fusarat atau filtrat *F. oxysporum* dan regenerasinya membentuk plantlet. *Prosiding Seminar Hasil penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*, Bogor 26-27 Desember 2001.

Tal M. 1983. Selection Stress Tolerance. *Handbook Plant Cell Culture* 1,461-488.

Thakur M, DR Sharma and SK Sharma. 2002. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus cayophylus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. *Plant Cell Rep* **20**, 825-828.

Witjaksono, 2003. Peran bioteknologi dalam pemuliaan tanaman buah tropika. *Makalah dipresentasikan dalam Seminar Nasional Peran Bioteknologi dalam Pengembangan Buah Tropika*, Bogor 9 Mei. Kementerian Riset dan Teknologi RI dengan Pusat Kajian Buah-Buahan Tropika LP-IPB.

Van Harten AM. 1998. *Mutation Breeding. Theory and Practical Applications*. Cambridge University Press.

Van den Bulk RW. 1991. Application of cell and tissue culture and *in vitro* selection for disease resistance breeding-A review. *Euphytica* **56**, 269-285.