

PENEKANAN PERKEMBANGAN PENYAKIT BUSUK BATANG VANILI (*FUSARIUM OXYSPORUM* F.SP. *VANILLAE*) MELALUI SELEKSI ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO*

Endang Nurcahyani¹, Issirep Sumardi², Bambang Hadisutrisno³ & E. Suharyanto²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung
Email: endang_nurcahyani@yahoo.com

²Jurusan Botani, Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan,
Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada

³Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Suppression of development of vanilla foot rot disease (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*) through *in vitro* fusaric acid selection. The most biological constrain on *Vanilla planifolia* plantation recently was caused by epidemical disease that later decrease vanilla production. The most important disease on vanilla is foot rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. So far, the disease has not been successfully controlled although some experiments had been conducted. One alternative method has been introduced by using a new cultivar which was resistance to *Fusarium*). A mutant vanilla to the fungus has been initiated by *in vitro* selection on medium containing fusaric acid. The aims of this research were: (1) to investigate effective concentration of fusaric acid used for *in vitro* selection, (2) to characterize mutants which have been set up and also to test those mutants for their resistance to the fungus. The results showed that: (1) fusaric acid at the concentration of 110 ppm effectively suppressed the disease intensity up to 25% compared to the concentration of 90 ppm and 100 ppm. In other words, 110 ppm of fusaric acid has increased the category criterion from moderate to resistant, (2) there was an increase of the total phenol content and thickness of lignin in vanilla stem, and (3) the protein profile of vanilla plantlet was different from the control. There was an initiation of a new band of about 18 kD in a mutant predicted as a protein which is responsible for vanilla resistance to *Fusarium*.

Key words: the vanilla foot rot disease, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, fusaric acid

ABSTRAK

Penekanan perkembangan penyakit busuk batang vanili (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*) melalui seleksi asam fusarat secara *in vitro*. Kendala biologi dalam budidaya vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) akhir-akhir ini adalah epidemi penyakit busuk batang yang mengakibatkan turunnya produksi. Penyakit busuk batang, yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* sampai saat ini masih belum bisa diatasi secara efektif walaupun beberapa penelitian telah dilakukan. Penggunaan kultivar vanili yang tahan penyakit busuk batang dengan hasil tinggi merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting. Mutan yang resisten terhadap infeksi *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* telah diinisiasi dan diseleksi secara *in vitro* dalam medium MS dengan penambahan asam fusarat. Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui konsentrasi asam fusarat yang efektif untuk menekan jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dan mengkaji tingkat resistensi planlet vanili yang digunakan pada seleksi *in vitro*, dan (2) mengetahui dan mengkaji karakter mutan vanili resisten penyakit busuk batang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa (1) penekanan jamur *F oxysporum* f.sp. *vanillae* menggunakan asam fusarat konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 dan 100 ppm dan mampu menekan intensitas penyakit hingga 25% serta meningkatkan kriteria ketahanan dari moderat ke tahan, (2) terdapat peningkatan kandungan total fenol dan ketebalan lignin pada vanili resisten penyakit busuk batang, dan (3) profil protein daun planlet vanili resisten penyakit busuk batang berbeda dengan kontrol. Ada inisiasi pita baru \pm 18 kD yang diduga sebagai protein yang bertanggung jawab pada resistensi *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*.

Kata kunci: penyakit busuk batang vanili, *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*, asam fusarat

PENDAHULUAN

Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) merupakan salah satu tanaman industri yang mempunyai nilai

ekonomi tinggi sebagai komoditas ekspor penghasil devisa yang masih potensial dikembangkan di Indonesia. Di pasaran internasional, vanili Indonesia dikenal dengan sebutan *Java Vanilla Beans* karena mempunyai kualitas

terbaik dengan kadar *vanillin* 2,75% (Hadisutrisno, 2004). Hal tersebut menjadi modal dasar bagi Indonesia untuk terus memperluas pasaran ekspor, guna meningkatkan penerimaan devisa negara serta meningkatkan pendapatan petani. Peluang pasar komoditas vanili Indonesia masih terbuka luas karena dengan bertambahnya jumlah penduduk dunia, permintaan vanili diperkirakan terus meningkat (Pusat Data dan Informasi Pertanian, 2009). Namun demikian permintaan vanili yang tinggi tersebut tidak diimbangi dengan tingkat produktivitas yang memadai karena adanya beberapa kendala dalam pengembangan vanili di Indonesia.

Salah satu penyakit utama yang menjadi kendala dalam budidaya vanili adalah penyakit busuk batang, yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang sangat besar akibat matinya tanaman (50% - 100%), memperpendek umur produksi dari 10 kali panen menjadi dua kali, bahkan tidak dapat berproduksi, serta mutu buah sangat rendah (Hadisutrisno, 2004). Sampai saat ini penyakit busuk batang vanili telah diteliti oleh beberapa laboratorium (Lestari *et al.*, 2006; Inayati, 2002) tetapi masih belum bisa diatasi secara efektif.

Penggunaan kultivar unggul yang tahan terhadap penyakit busuk batang dengan daya hasil tinggi merupakan salah satu alternatif pengendalian penyakit yang penting dan tidak menimbulkan dampak negatif seperti penggunaan fungisida. Mutan atau kultivar yang resisten terhadap infeksi *F. oxysporum* dapat diidentifikasi melalui seleksi secara *in vitro* dalam media dengan penambahan asam fusarat (Bacon *et al.*, 1996). Asam fusarat (*5-n-butylpicolinic acid*) merupakan fitotoksin non-spesifik yang dihasilkan oleh *F. oxysporum* yang menyebabkan gejala layu serta busuk pada berbagai tanaman (Remotti & Löfner, 1996; Toyoda *et al.*, 1988 *cit.* Landa *et al.*, 2002). Selain itu asam ini dapat menyebabkan klorosis pada daun muda, bersifat toksin yang berperan menghambat oksidasi sitokinin, menghambat proses respirasi pada mitokondria, menurunkan adenosin three posphat (ATP) pada plasma membran serta mereduksi aktivitas polifenol oksidasi sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Sukmadjaja *et al.*, 2003). Namun ada korelasi positif antara ketahanan plantlet terhadap toksin dengan ketahanan tanaman terhadap *Fusarium* (Arai & Takeuchi, 1993). Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi asam fusarat toksik menyebabkan kematian tanaman, tetapi konsentrasi non toksik (di bawah 10^{-6} M) justru membantu mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Penggunaan asam fusarat sebagai

agen penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap asam fusarat, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten atau toleran terhadap infeksi patogen. Metode ini telah dilakukan antara lain pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), dan nanas (Borras *et al.*, 2001), menunjukkan ketahanannya terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Sejauh ini masalah penyakit busuk batang vanili belum bisa diatasi secara efektif dan belum ada kultivar unggul vanili yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* penyebab penyakit busuk batang. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian penekanan jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* melalui seleksi dengan asam fusarat secara *in vitro*. Dari penelitian ini diharapkan diperoleh kultivar atau mutan vanili tahan penyakit busuk batang yang selanjutnya akan dapat meningkatkan kembali mutu dan produksi vanili di Indonesia dengan kualitas yang sesuai dengan permintaan pasar. Tujuan penelitian ini adalah: (1) mengetahui konsentrasi asam fusarat yang efektif untuk menekan jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dan mengkaji tingkat resistensi plantlet vanili dan (2) mengidentifikasi karakter mutan vanili resisten terhadap penyakit busuk batang.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada; Laboratorium Struktur dan Perkembangan Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, serta Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada, mulai April 2011 sampai Maret 2012.

Penyiapan Bahan. Bahan galur murni vanili (*V. planifolia* Andrews) diperoleh dari unit pelaksana teknis (UPT), Dinas Pertanian, Perkebunan dan Kehutanan, Kabupaten Magelang. Bahan ini sudah dipropagasi secara *in vitro* dan diseleksi dengan asam fusarat konsentrasi 0 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, dan 120 ppm pada penelitian pendahuluan. Isolat jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*, berasal dari perkebunan vanili di daerah Cangkringan, Sleman, Yogyakarta.

Penyiapan Isolat

a. Isolasi Isolat *F. oxysporum* f.sp. *vanilla*. Isolasi dilakukan mengikuti metode Hadisutrisno (1995). Batang vanili yang menunjukkan gejala sakit dibersihkan,

selanjutnya didesinfeksi dengan alkohol 70 %. Batang pada batas yang sakit dan sehat diambil secara aseptik dengan *scalpel* steril, selanjutnya diletakkan di atas medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) dalam cawan petri berdiameter 10 cm. Sayatan batang sakit dalam medium PDA kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 5-7 hari. Koloni patogen yang tumbuh dipisahkan dari kontaminan sampai diperoleh biakan murni.

b. Isolasi Monospora. Biakan murni yang berumur 2-3 minggu pada medium PDA dalam tabung reaksi ditambah dengan air steril sebanyak 10 ml, digojok perlahan-lahan sehingga dihasilkan suspensi konidium. Suspensi konidium ini diambil dengan jarum ose dan digoreskan pada medium PDA dalam cawan petri berdiameter 10 cm secara zig-zag, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 18-20 jam. Satu konidium diambil dan selanjutnya ditumbuhkan dalam cawan petri berdiameter 9 cm yang berisi medium PDA. Pada setiap cawan petri diletakkan 4 konidia secara terpisah dan diinkubasikan selama 5-7 hari pada suhu kamar (25 °C). Identifikasi varian dilakukan pada hari ke-5 dengan menggunakan kunci identifikasi varian menurut Lahlon dan Basson (1983) yang dimodifikasi menurut Hadisutrisno (1987). Varian yang menunjukkan isolat kuat selanjutnya dipindahkan ke agar miring untuk pengujian selanjutnya (Hadisutrisno, 1995). Semua pengujian dalam penelitian ini menggunakan isolat monospora.

Inokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* pada Planlet Vanili. Inokulasi dilakukan menurut metode Hadisutrisno (1995). Inokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dilakukan

secara langsung pada planlet vanili dalam botol kultur hasil seleksi asam fusarat (konsentrasi 0, 90, 100, dan 110 ppm), dengan ulangan tiap-tiap perlakuan sebanyak 4 kali. Mikrokonidium jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per ml diteteskan pada planlet 1-2 tetes, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke tiga setelah inokulasi selama 4 minggu dengan mengamati dan menghitung jumlah daun yang menunjukkan gejala layu atau kuning. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan jumlah daun yang menunjukkan gejala daun kuning (layu) dengan indeks kelayuan menurut He *et al.* (1983 *cit.* Wibowo, 2002) yang telah dimodifikasi (Tabel 1).

Intensitas penyakit (IP) dihitung dengan rumus:

$$IP = \frac{\sum(n \times v)}{N \times Z} \times 100\%$$

dengan:

IP = Intensitas penyakit

n = jumlah tanaman pada skor v

v = nilai skor tertentu

N = jumlah tanaman yang diuji

Z = nilai skor tertinggi.

Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Hanudin (1989 *cit.* Wibowo, 2002) (Tabel 2).

Karakterisasi Varian atau Mutan Vanili Resisten Penyakit Busuk Batang. Peubah pengamatan meliputi tanggapan kimiawi, tanggapan struktural dan profil protein planlet vanili.

Tabel 1. Indeks kelayuan planlet tanaman vanili

Skor	Keterangan
0	Tidak ada gejala kuning (layu) atau tanaman sehat
1	1-2 daun kuning (layu)
2	3 daun kuning (layu)
3	4 daun kuning (layu)
4	Lebih dari 4 daun kuning (layu) atau tanaman mati

Tabel 2. Kriteria ketahanan tanaman

Intensitas Penyakit (IP) (%)	Kriteria ketahanan
= 25	Tahan
25 < IP = 50	Moderat
> 50 atau mati	Rentan

a. Tanggapan Kimiawi. Berupa pembentukan senyawa fenol total oleh planlet dengan menggunakan analisis fenol total metode *Folin-Ciocalteu Micro Method* (Waterhouse, 1999). Larutan sampel dibuat menggunakan metode Ozygi *et al.* (2007), yang telah dimodifikasi. Batang planlet vanili 2 g (kering angin) diambil lalu dilumat dengan menggunakan mortir gelas dan diekstrak menggunakan 25 ml etanol 80% (*Sigma Chemical Co.*) selama 4x24 jam pada suhu 5 °C. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan 1 ml etanol 80 % + 5 ml akuabides + 250 µl pereagen *Folin-Ciocalteu*, setelah didiamkan selama 5 menit kemudian ditambah 1 ml Na₂CO₃ stok. Larutan sampel kemudian didiamkan pada suhu 20 °C dalam kondisi gelap selama 1 jam. Larutan sampel dan larutan kalibrasi (standar) di ambil sebanyak 3 ml, kemudian dimasukkan dalam kuvet. Setelah itu dilakukan pembacaan serapan dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 760 nm. Dasar perhitungan dibuat regresi senyawa fenol total standar, yaitu persamaan regresi antara serapan dengan kepekatan larutan standar.

b. Tanggapan Struktural. Berupa analisis anatomi jaringan yaitu pembentukan lignin pada batang vanili. Pengamatan lignifikasi pada irisan melintang batang vanili yang telah dilakukan pengimbasan asam fusarat dan diinokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dengan menggunakan metode Sass (*cit.* Ruzin, 1999).

Planlet vanili dikeluarkan dari media tanam dalam botol kultur, kemudian dibersihkan batangnya. Batang dipotong lebih kurang 1 cm, lalu difiksasi dengan cara direndam dalam FAA dan disimpan selama 24 jam, selanjutnya dijepit dibagian tengah gabus, dan diiris secara melintang dengan ketebalan 5-10 µm dengan *sliding mikrotom*. Potongan irisan melintang direndam dalam *phloroglucinol* 0,5-1,0 gram + 50 ml etanol 95% selama 15 menit, kemudian direndam dalam larutan HCl+akuades (1:3) selama 5 menit. Sediaan irisan semipermanen lalu dibubuhi dengan gliserin 87%, dan potongan batang diletakkan di atas gelas preparat dan ditutup dengan gelas penutup. Selanjutnya preparat diamati di bawah mikroskop. Jaringan batang yang terlignifikasi akan tampak berwarna merah-ungu.

c. Profil Protein Planlet Vanili (SDS-PAGE). Untuk mendeteksi protein yang terekspresi, dilakukan dengan cara membandingkan profil protein daun planlet yang diperlakukan dengan asam fusarat dan telah diinokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dibandingkan dengan kontrol. Penentuan profil protein dilakukan dengan

metode *Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) menurut Maniatis *et al.* (1982). Berat Molekul (BM) protein sampel pada setiap jarak migrasi diperoleh dengan cara mengekstrapolasikan setiap jarak pita protein sampel yang dikehendaki pada jarak migrasi 2 pita protein marker yang mengapit pita protein sampel yang dimaksud, sehingga diperoleh log BM, maka BM pita protein yang dimaksud dapat diketahui (Khunsook *et al.*, 2003). Untuk mendeteksi protein spesifik dilakukan dengan cara membandingkan profil protein daun planlet yang resisten terhadap penyakit BBV dibandingkan dengan kontrol.

Analisis Data. Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan didukung foto. Data kuantitatif dari setiap parameter seperti jumlah daun kuning (layu), intensitas penyakit ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan ulangan 4 eksplan per perlakuan.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial, sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan Uji F. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) pada taraf kepercayaan 95% (Soemartono, 1972).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Isolat dan Monospora *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*. Hasil isolasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* batang vanili dari kebun vanili di Cangkringan, Sleman menunjukkan variasi warna koloni, pertumbuhan miselium udara, dan kemampuan membentuk konidium. Warna koloni setiap isolat yang ditumbuhkan selama 5-7 hari bervariasi, dari putih kemerahan sampai keunguan (Gambar 1A), sedangkan koloni yang ditumbuhkan selama 4 minggu berwarna putih (Gambar 1B). *Fusarium* adalah salah satu jamur yang mempunyai variabilitas tinggi karena sifat genetik dan respon fenotipiknya terhadap perubahan lingkungan (Windels, 1993). Oleh karena itu untuk mendapatkan sifat yang seragam dan stabil dari jamur ini perlu dilakukan isolasi monospora sehingga diperoleh varian yang stabil. Hasil isolasi monospora *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* berwarna putih dalam medium PDA (Gambar 1C). Monospora inilah yang digunakan untuk pengujian resistensi planlet vanili terhadap penyakit busuk batang. Menurut Salleh (1995), aktivitas pertumbuhan *Fusarium* sp. terjadi pada kelembaban tinggi, demikian pula Nel *et al.* (2006) mengemukakan bahwa kisaran suhu untuk pertumbuhan *F. oxysporum* secara *in vitro* adalah 25° – 30 °C.



Gambar 1. Koloni *F. oxysporum* f.sp. *vanilla*. (A) umur 7 hari, (B) umur 4 minggu dalam medium PDA dan (C) koloni monospora *F. oxysporum* f.sp. *vanillae*.

Armstrong dan Armstrong (1981 *cit.* Soesanto *et al.*, 2003) menyatakan bahwa jamur mempunyai kenampakan secara *in vitro* berupa miselium udara berwarna putih, yang kemudian akan berubah menjadi warna ungu sampai ungu tua, tergantung dari strainnya. Perbedaan warna koloni dapat terjadi karena kemampuan jamur menghasilkan berbagai metabolit sekunder. Menurut Booth (1971) biakan jamur *F. oxysporum* berwarna merah muda kekuningan, merah kekuningan, atau ungu pada pH 6,5-7,0.

Inokulasi dan Pengujian Resistensi Planlet Vanili terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanilla*. Metode inokulasi yang digunakan dalam uji ketahanan planlet vanili hasil pengimbasan asam fusarat adalah dengan menginokulasikan secara langsung mikrokonidium jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per ml pada planlet 1-2 tetes di dalam botol kultur secara *in vitro*, dengan ulangan tiap-tiap perlakuan sebanyak 4 kali kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 24 jam (Hadisutrisno, 1995). Pengamatan dilakukan setiap hari selama 4 minggu dengan menghitung jumlah daun planlet yang menunjukkan gejala layu.

Berdasarkan pengamatan terhadap planlet vanili yang diimbas, gejala daun layu pada kontrol muncul pada hari ke-5 setelah inokulasi. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 90 ppm dan 100 ppm kecuali pada botol kultur dengan kode 100-2, namun planlet tersebut pada hari ke-25 muncul gejala daun layu dimulai dari tepi daunnya. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 110 ppm kecuali pada botol kultur dengan kode 110 -1 dan 110-2. Berdasarkan pengamatan, gejala tersebut menunjukkan gejala penyakit layu *Fusarium* sehingga nantinya dapat dilakukan perhitungan persentase daun layu atau kuning setiap harinya dan ditentukan kriteria ketahanannya (Tabel 3), sedangkan hasil inokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* pada planlet vanili umur 29 hari setelah perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 3 menunjukkan bahwa pada hari ke-5 setelah inokulasi persentase daun layu atau kuning pada kontrol telah mencapai rata-rata 31,2%. Pada perlakuan 90 ppm persentase daun layu atau kuning hampir sama dengan perlakuan 100 ppm yaitu mencapai sekitar 25,0%. Persentase daun layu terendah ditunjukkan pada perlakuan 110 ppm yaitu sebesar 0%, nilai ini tidak berbeda secara nyata dengan kontrol.

Hasil pengamatan hari ke-13 menunjukkan bahwa persentase daun layu atau kuning pada perlakuan 90 ppm meningkat menjadi 41,6%. Peningkatan persentase daun layu atau kuning juga terjadi pada perlakuan 100 ppm yaitu menjadi 31,2%, namun nilai tersebut tidak berbeda nyata dengan kontrol, sedangkan pada perlakuan 110 ppm persentase daun layu atau kuning menjadi 6,2%, nilai ini berbeda secara nyata dengan kontrol. Kenaikan persentase daun layu atau kuning pada pengamatan hari ke-21 terjadi pada kontrol, perlakuan 90 ppm dan 100 ppm (93,7%; 91,6%; dan 50,0%). Sedangkan untuk perlakuan 110 ppm tidak mengalami kenaikan persentase daun layu atau kuning. Persentase daun layu atau kuning pada hari ke-29 setelah inokulasi, pada kontrol meningkat menjadi 100% dan pada perlakuan 90 ppm terjadi peningkatan menjadi 99,9%, sedangkan pada perlakuan 100 ppm tidak mengalami kenaikan persentase tetap 50,0%, dan pada perlakuan 110 ppm menjadi 18,7%. Persentase daun layu atau kuning pada perlakuan 100 ppm dan 110 ppm ini berbeda nyata dengan kontrol.

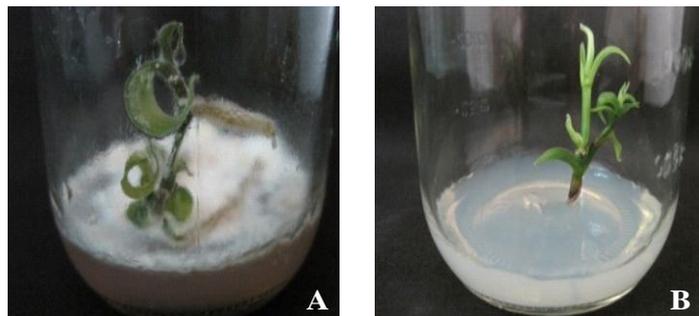
Dari uraian di atas dapat dikatakan bahwa ada pengaruh konsentrasi asam fusarat sebagai bahan pengimbas yang mampu menurunkan persentase daun layu atau kuning pada perlakuan 110 ppm hingga menjadi 18,7% dibandingkan dengan kontrol. Berdasarkan pengamatan dan uraian di atas dapat dibuat suatu histogram hubungan antara hari pengamatan dan indeks kelayuan (Gambar 3).

Berdasarkan skoring terhadap gejala daun layu atau kuning yang muncul maka dapat diketahui intensitas

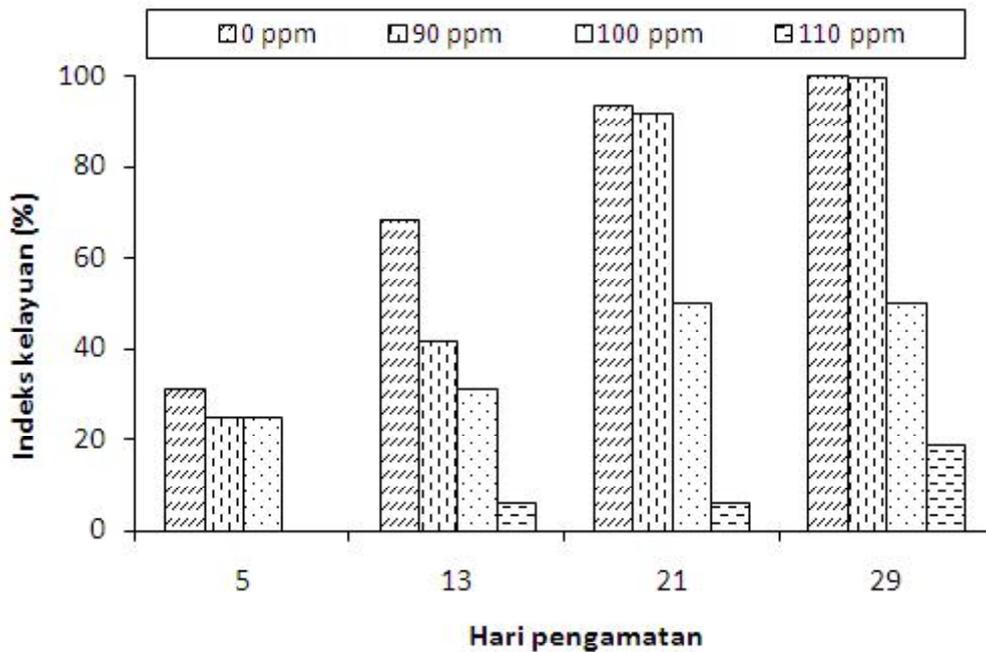
Tabel 3. Persentase daun layu atau kuning pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Hari pengamatan				
	0	5	13	21	29
0 (kontrol)	0	31,25 a	68,75 b	93,75 b	100,00 b
90	0	25,00 a	41,67 ab	91,67 b	99,99 b
100	0	24,99 a	31,25 ab	50,00 ab	50,00 a
110	0	0,00 a	6,25 a	6,25 a	18,75 a

Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji Duncan ($p > 0,05$), setelah ditransformasikan akar $x+1$.



Gambar 2. Hasil inokulasi *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* pada planlet vanili umur 29 hari setelah perlakuan. (A) planlet vanili kontrol dan (B) planlet vanili hasil pengimbasan asam fusarat 110 ppm.



Gambar 3. Histogram hubungan antara hari pengamatan dengan indeks kelayuan (%) pada hari ke-5, 13, 21, dan 29.

penyakit dari masing-masing perlakuan (Tabel 4). Dari Tabel 4 tersebut dapat dikatakan bahwa pada pengamatan hari ke-29, intensitas penyakit tertinggi ditunjukkan oleh kontrol dan perlakuan 90 ppm (100%),

sehingga dinyatakan rentan terhadap penyakit layu Fusarium, sedangkan perlakuan 100 ppm memiliki intensitas penyakit 50%, dan kriteria ketahanannya adalah moderat. Pada perlakuan 110 ppm intensitas

penyakit sebesar 25% sehingga kriteria ketahanannya adalah tahan. Berdasar hal tersebut dapat diketahui bahwa intensitas penyakit akibat perlakuan 110 ppm asam fusarat tidak mengalami peningkatan sejak pengamatan hari ke-13 hingga hari ke-29. Berdasarkan pengamatan dan uraian di atas dapat dibuat suatu histogram hubungan antara hari pengamatan dan intensitas penyakit (Gambar 4).

Dari data intensitas penyakit dan kategori ketahanannya, dapat diketahui bahwa perlakuan 110 ppm asam fusarat mampu mengimbas ketahanan yang paling baik, sehingga mampu menurunkan nilai intensitas penyakit hingga 25% dan menaikkan kriteria ketahanan dari moderat menjadi tahan. Hal tersebut menunjukkan bahwa asam fusarat mampu mengimbas ketahanan tanaman vanili terhadap penyakit layu fusarium. Hal ini sesuai dengan pendapat Arai & Takeuchi (1993) yang menyatakan bahwa toksin murni asam fusarat dan filtrat

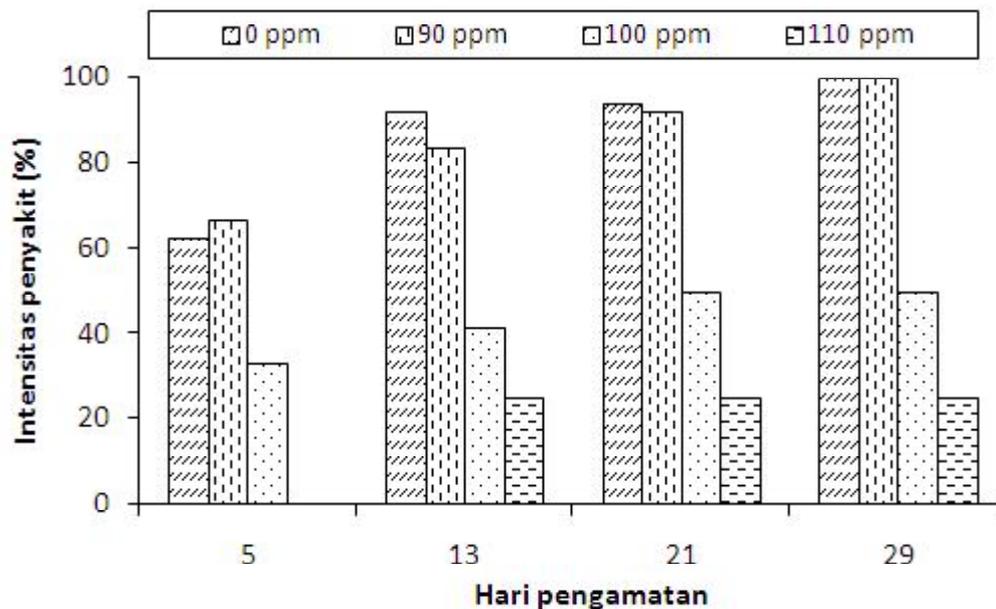
asam fusarat dapat digunakan sebagai komponen seleksi karena adanya korelasi antara ketahanan terhadap toksin dengan ketahanan terhadap penyakit. Hasil penelitian ini juga mendukung pernyataan Agrios (1997) yang menyatakan bahwa ekspresi dari pengimbasan ketahanan adalah dengan menurunnya intensitas penyakit.

Karakterisasi Mutan Vanili Resisten Penyakit Busuk Batang. Hasil interaksi inang, patogen, ataupun senyawa kimia dapat memberi tanggapan pada tanaman bersifat struktur dan kimiawi yang berbeda (Agrios, 1997).

a. Tanggapan Kimiawi. Berupa pembentukan senyawa fenol total oleh planlet, menggunakan analisis fenol total metode *Folin-Ciocalteu Micro Method* (Waterhouse, 1999).

Tabel 4. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan dan tingkat ketahanan vanili pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Hari pengamatan							
	5		13		21		29	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
0 (kontrol)	62,50	Rentan	91,67	Rentan	93,75	Rentan	100,00	Rentan
90	66,67	Rentan	83,33	Rentan	91,67	Rentan	100,00	Rentan
100	33,33	Moderat	41,67	Moderat	50,00	Moderat	50,00	Moderat
110	00,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan



Gambar 4. Histogram hubungan antara hari pengamatan dengan intensitas penyakit (%) pada hari ke-5, 13, 21, dan 29.

Pengaruh asam fusarat terhadap pembentukan senyawa fenol pada tanaman vanili dapat dilihat pada Tabel 5. Senyawa fenol merupakan hasil metabolisme tanaman yang terbentuk dengan salah satu fungsi sebagai sistem ketahanan kimiawi tanaman yang mampu mencegah pertumbuhan dan perkembangan patogen.

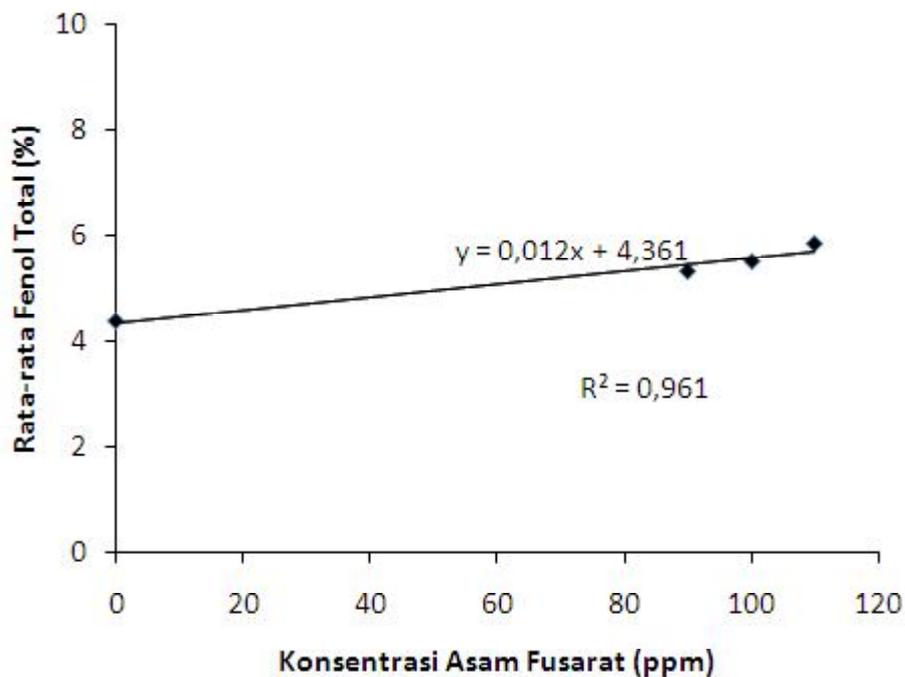
Konsentrasi senyawa fenol ditemukan pada semua perlakuan asam fusarat. Hasilnya menunjukkan adanya indikasi meningkatnya kandungan total fenol pada daerah dinding sel xilem, yaitu pada perlakuan 90 ppm 5,3%, 100 ppm 5,5%, 110 ppm 5,8% dan kontrol 4,3%. Semakin tinggi konsentrasi asam fusarat maka semakin meningkat pula kandungan total fenolnya. Pada konsentrasi asam fusarat 110 ppm, kandungan fenol total terbesar yaitu 5,87%, dibanding perlakuan konsentrasi asam fusarat yang lain. Hubungan antara konsentrasi asam fusarat dengan kandungan fenol total disajikan dalam bentuk regresi linear (Gambar 5). Peningkatan kandungan fenol total pada tanaman diduga karena terimbas oleh asam fusarat ke dalam jaringan tanaman. Asam fusarat yang digunakan diserap oleh vanili pada

saat perlakuan dalam media, kemudian ditranslokasi secara sistemik. Tanaman akan memberikan tanggapan secara kimiawi setelah senyawa tersebut dikenali. Tanggapan inilah yang bertanggungjawab dalam ketahanan terimbas, diantaranya senyawa fenol (Agrios, 1997).

b. Tanggapan Struktural. Berupa pembentukan lignin pada batang vanili. Pengamatan lignin pada irisan melintang batang vanili menggunakan pereaksi *phloroglucinol* untuk mendeteksinya. Hasil yang diperoleh adalah terbentuknya lapisan lignin yang ditandai dengan adanya perubahan warna merah muda pada jaringan yang mengandung lignin. Hasil pengamatan pada jaringan tanaman menunjukkan bahwa baik pada kontrol maupun perlakuan asam fusarat terbentuk lapisan lignin. Dengan demikian pengaruh perlakuan asam fusarat baru bisa dilihat secara detail antara lain melalui ketebalan ligninnya. Lignin lebih sering terbentuk pada jaringan pengangkutan terutama xilem dibandingkan sel epidermis. Stein *et al.* 1993 (*cit.*

Tabel 5. Kandungan fenol total (%) pada vanili setelah perlakuan dengan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Rata-rata kandungan fenol total (%)
0 (kontrol)	4,39 ± 0.02
90	5,34 ± 0.01
100	5,52 ± 0.02
110	5,87 ± 0.01



Gambar 5. Garis regresi hubungan antara konsentrasi asam fusarat (pp) dengan fenol total (%)

Agrawal *et al.* 1999), menyatakan bahwa pada fase awal infeksi patogen pada tanaman tahan, lignin atau bahan fenolik lain akan terkumpul pada dinding sel tanaman yang berhubungan dengan patogen. Lignin akan terbentuk dalam jumlah besar dan menghambat perkembangan hifa patogen. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa adanya lignifikasi dapat membantu meningkatkan ketahanan tanaman vanili terhadap infeksi fusarium.

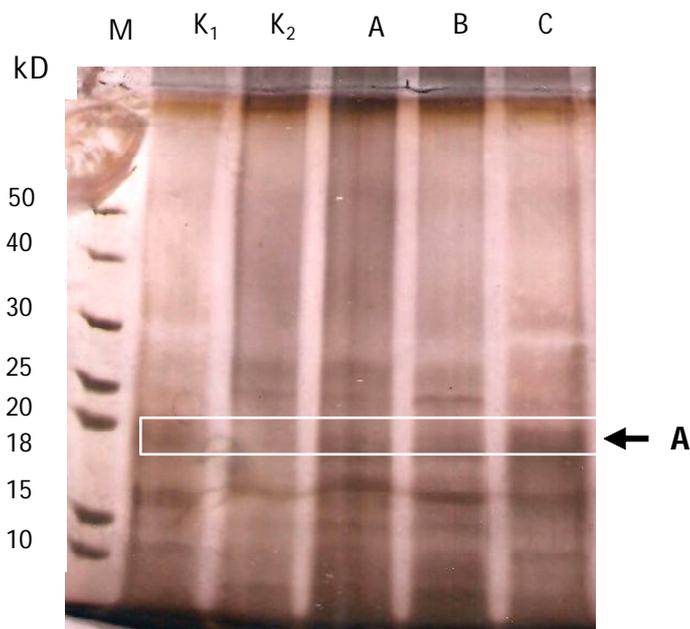
Pengaruh konsentrasi asam fusarat terhadap ketebalan lignin vanili dapat dilihat pada Tabel 6. Tabel tersebut menunjukkan adanya indikasi meningkatnya ketebalan lignin pada daerah dinding sel xilem pada perlakuan 90 ppm 14,59 μm ; 100 ppm 18,16 μm ; dan 110 ppm 19,39 μm dibandingkan kontrol 10,28 μm . Semakin tinggi konsentrasi asam fusarat maka semakin tinggi pula ketebalan ligninnya. Hal ini menunjukkan bahwa vanili memberi tanggapan ketahanan yang lebih baik setelah diperlakukan dengan asam fusarat. Sistem ketahanan tanaman bergantung pada interaksi inang,

patogen, dan lingkungan. Lignin merupakan sistem ketahanan struktur tanaman yang berfungsi menghambat patogen dan terbentuk karena adanya tanggapan terhadap penetrasi oleh patogen atau kerusakan yang terjadi secara mekanik (Vance *et al.* 1980 dan Sticher *et al.*, 1997). Menurut Bouizgarne *et al.* (2006) dan Kuzniak *et al.* (1999), penambahan asam fusarat pada konsentrasi non-toksik mengakibatkan peningkatan dan pengaktifan O_2 dan H_2O_2 . Aktivitas H_2O_2 berhubungan dengan peroksidase dalam pembentukan lignin. H_2O_2 merupakan pendonor peroksidase untuk pembentukan lignin.

c. Pengamatan Profil Protein pada Vanili Hasil Pengimbasan Asam Fusarat dengan Metode SDS-PAGE. Dalam penelitian ini ditemukan bahwa perlakuan konsentrasi asam fusarat mempengaruhi sintesis protein total daun planlet vanili. Hasil analisis profil protein menggunakan elektroforesis SDS-PAGE vertikal diketahui adanya pita baru pada perlakuan asam

Tabel 6. Pengaruh konsentrasi asam fusarat (ppm) terhadap ketebalan lignin dalam batang vanili

Perlakuan (ppm)	Rata-rata ketebalan lignin (μm) dengan n: 30
0 (kontrol)	10,28 \pm 1,09
90	14,59 \pm 2,38
100	18,16 \pm 2,65
110	19,39 \pm 1,51



Gambar 5. Profil protein daun planlet *Vanilla planifolia* Andrews resisten penyakit busuk batang hasil pengimbasan asam fusarat dengan metode SDS-PAGE 1D; (M) Marker, (K1) Kontrol +, (K2) Kontrol -, (A) 90 ppm, (B) 100 ppm dan (C) 110 ppm. Tanda panah A= pita protein baru yang terbentuk pada planlet vanili resisten penyakit busuk batang (± 18 kD).

fusarat 90, 100, dan 110 ppm dibandingkan dengan kontrol (Gambar 5).

Perubahan yang terjadi pada tingkat morfologi, anatomi maupun kimia menggambarkan adanya perubahan di tingkat molekuler. Gen membutuhkan waktu dan kondisi yang tepat untuk diekspresikan pada siklus pertumbuhan dan perkembangan tumbuhan. Memasuki suatu tahapan perkembangan baru, tumbuhan membutuhkan ekspresi beberapa gen untuk menghasilkan protein yang berperan dalam setiap reaksi metabolisme dalam sel. Pada perlakuan asam fusarat 90, 100, 110 ppm, tampak terbentuk pita protein baru yang tidak terdapat pada tanaman kontrol dan setelah dibandingkan dengan protein standar (*marker*) diketahui BM protein tersebut sekitar 18 kD. Sintesis protein berukuran sekitar 18 kD ini kemunculannya menyerupai protein antifungal dari biji takana jepang (*Brassica juncea* var. *integrifolia* (18,9 kD) yang diteliti oleh Ye & Ng (2009). Pita protein baru yang muncul pada planlet vanili dengan perlakuan asam fusarat 90, 100, dan 110 ppm tersebut diprediksi merupakan mutan protein hasil pengimbasan asam fusarat. Untuk membuktikan kebenarannya maka perlu penelitian lebih lanjut.

SIMPULAN

Penekanan perkembangan jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* menggunakan seleksi asam fusarat pada konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 dan 100 ppm dan mampu menekan intensitas penyakit hingga 25% serta meningkatkan kriteria ketahanan terhadap penyakit busuk batang dari moderat ke tahan. Semakin meningkat konsentrasi asam fusarat maka meningkat pula kandungan total fenol dan ketebalan lignin di daerah xilem pada vanili resisten penyakit busuk batang. Profil protein pada planlet vanili resisten penyakit busuk batang mengindikasikan adanya pita protein baru \pm 18 kD yang dihasilkan dari pengimbasan asam fusarat.

SANWACANA

Sebagian riset ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Disertasi Doktor, DIPA Universitas Gadjah Mada, No. Kontrak LPPM-UGM/894/BID.I/2011 tanggal 21 April 2011, dan BPPS DIKTI. Untuk semua itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih.

Terima kasih pula penulis ucapkan kepada Unit Pelaksana Teknis (UPT) Dinas Pertanian, Perkebunan dan Kehutanan, Kabupaten Magelang, atas bantuan bibit galur murni *Vanilla planifolia* Andrews.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal AA, Tuzun S & Bent E. 1999. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores, Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- Agrios GN. 1997. *Plant Pathology*. 4th Ed. Academic Press. New York. 922 p.
- Arai M & Takeuchi M. 1993. Influence of Fusarium Wilt toxin(s) on Carnation cell. *Plant Cells, Tissue and Organ Culture* (34): 287 – 293.
- Bacon CW, Porter JK, Norred WP & Leslie JF. 1996. Production of Fusaric Acid by *Fusarium* Species. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 4039 – 4043.
- Booth C. 1971. *The Genus Fusarium*. Common. Mycol. Inst. Kew, Surrey, England.
- Borras O, Santos R, Matos AP, Cabral RS & Arzola M. 2001. A first attempt to use a *Fusarium subglutinans* culture filtrate for the selection of pineapple cultivars resistant to fusarioid disease. *Plant Breeding* 120: 435 – 438.
- Bouzigarne B, El-Maarouf Bouteau H, Frankart C, Rebutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y & El Hadrami I. 2006. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: Toxic and signalling effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.
- Hadisutrisno B. 1995. Kajian pengendalian hayati penyakit busuk batang vanili dengan isolat lemah *Fusarium batatatis* Tucker. *Buletin Ilmiah Azolla* 21: 27-35.
- Hadisutrisno B. 2004. Taktik dan strategi perlindungan tanaman menghadapi gangguan penyakit layu Fusarium. *Simposium Nasional I*. Purwokerto, 2-3 Maret 2004.
- Inayati A. 2002. Seleksi Ketahanan Tunas Vanili Terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* Secara *In Vitro* Menggunakan Teknik Double Layer, Kultur Filtrat, dan Asam Fusarat. *Tesis*. (Tidak dipublikasikan).
- Khunsook S, Bary SB, Susan RMG & Jack AA. 2003. Purification and characterization of plasma membrane-associated human spermá-L-Focoidase. *Biol. Reprod.* 709 – 716.

- Kuzniak E, Patykowski J & Urbanek H. 1999. Involvement of the antioxidative system in tomato responses to fusaric acid treatment. *Journal of Phytopathology* 147: 385-390.
- Landa BB, Cachinero-Diaz JM, Lemanceu P, Jimenez-Diaz RM & Alabouvette C. 2002. Effect of fusaric acid and phytoanticipans on growth of rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
- Lestari EG, Sukmadjaja D & Mariska I. 2006. Perbaikan ketahanan tanaman panili terhadap penyakit layu melalui kultur *in vitro*. *Jurnal Litbang Pertanian*: 25(4).
- Maniatis T, Fritsch EF & Sambrook J. 1982. *Molecular Cloning*. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Printed in The United States of America.
- Matsumoto K, Luz Barbosa L, Sauoca AC & Teixeira JB. 1995. Race fusarium wilt tolerance on banana plant selected by fusaric acid. *Euphytica* 103 : 131-136.
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N & Viljoen A. 2006. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy bananas plants. *Plant Pathology* 55: 207 – 216.
- Ozygi II, Kahraman MV & Ercan O. 2007). Relation between explant Age, total phenol and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.) . *African Journal of Biotechnology* 6: 3-8.
- Pusat Data & Informasi Pertanian. 2009. Outlook komoditas perkebunan. http://www.deptan.go.id/pusdatin/admin/PUB/outlook.komoditas_perkebunan.pdf. Diakses 17 Juni 2010.
- Remotti PC & Löffler HJM. 1996. The Involvement of Fusaric Acid in The Bulb-Rot of *Gladiolus*. *J. Phytopathol.* 144: 405 – 411.
- Remotti PC, Löffler HJM & Loten-Doting LV. 1997. Selection of cell lines and regeneration of plants resistance to fusaric acid from *Gladiolus x grandiflorus* c.v. 'Peter Pear'. *Euphytica* 96: 237 – 245.
- Ruzin SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York.
- Salleh B. 1995. Perkembangan Mutakhir Penelitian Fusarium di Kawasan Tropika. *Prosiding Kongres Nasional X dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*, Jakarta.
- Soemartono. 1972. *Pola Percobaan*. Yayasan Pembina Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Soesanto L, Soedarmono, Prihatiningsih N, Manan A, Iriani E & Pramono J. 2003. Penyakit busuk rimpang jahe di sentra produksi jahe Jawa Tengah: Identifikasi dan Sebaran. *Tropika* 11(2): 107 – 220.
- Sticher L, Mauch-Mani B & Mettraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 35: 235-270.
- Sukmadjaja D, Mariska I, Lestari EG, Tombe M & Kosmiatin M. 2003. Pengujian planlet abaka hasil seleksi terhadap *F. oxysporum*. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman. Balai penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Bogor*.
- Toyoda H, Hasyashi H & Yamamoto K. 1984. Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 538 – 540.
- Vance CP, Kirk K & Sherwood RT. 1980. Lignification as a Mechanism of Disease Resistance. *Annual Review Phytopathology* 18: 259-288.
- Wibowo A. 2002. Pengendalian penyakit layu fusarium pada pisang dengan menggunakan Isolat nonpatogenik *Fusarium* sp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* Vol. 6: 65-70.
- Waterhouse A. 1999. Follin-Ciocalteu Micro method for Total Phenol in Wine. <http://www.waterhouse.ucdavis.edu/phenol/folinmicro.htm>. Diakses 15 Maret 2011.
- Windels CE. 1993. Fusarium. pp. 115-128 In: *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic fungi*. Singleton LL, Mihail JD & Rush CM. eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.
- Ye X & Ng TB. 2009. Isolation and characterization of juncin, an antifungal protein from seeds of Japanese takana (*Brassica juncea* var. *integrifolia*). *J. Agric. Food Chem.* 57(10):4366-71.