

**ANALISIS KANDUNGAN KLOOROFIL
HASIL KETAHANAN TERIMBAS *Fusarium oxysporum* terhadap
Spathoglottis plicata SECARA IN VITRO**

Gardis Andari¹), Endang Nurcahyani²)

¹Department of Animal Husbandry, University of Musamus, Merauke, Indonesia
e-mail correspondence: gardizandari@yahoo.co.id

²Dosen Department of Biological Science, University of Lampung, Bandar Lampung, Indonesia

ABSTRAK

*Penyakit layu fusarium yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (Fo) merupakan penyakit penting yang menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek (Palmer, 2011). Kerugian akibat penyakit ini sangat tinggi yaitu dapat menyebabkan kematian tanaman hingga 50% bahkan bisa mencapai 80% (Hadisutrisno, 2001). Penggunaan kultivar *S. plicata* yang tahan Fo diharapkan dapat menjadi alternatif dalam mengendalikan penyakit tersebut. Penelitian pengimbasan ketahanan anggrek tanah tahan terhadap Fo telah dilakukan secara in vitro dalam medium Vacin & Went (VW) padat yang ditambahkan dengan asam fusarat pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm dibandingkan dengan kontrol (0 ppm). Anggrek *S. plicata* hasil seleksi asam fusarat selanjutnya diinokulasi dengan Fo. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis kandungan klorofil total pada daun planlet *S. plicata* hasil induce resistance terhadap Fo. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Penelitian menggunakan rancangan acak lengkap. Data dianalisis ragam (Anova) dan jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji BNT taraf nyata 5%. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin meningkat konsentrasi asam fusarat, maka meningkat pula kandungan klorofil total pada planlet anggrek tanah tahan Fo. Pada konsentrasi 40 ppm, kandungan klorofil total paling tinggi yaitu $9,592 \pm 2,226 \times 10^{-1e}$*

Key Words: *Fusarium oxysporum, Ketahanan Terimbas, Klorofil, In Vitro*

ABSTRACT

*Fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* (Fo) is an important disease which is one of the obstacles in the quality and production of orchid plants (Palmer, 2011). The loss due to this disease is very high, which can cause plant death by 50% or even 80% (Hadisutrisno, 2001). The use of *S. plicata* cultivar which is resistant to Fo is expected to be an alternative in controlling the disease. Research to compensate for resistance of soil orchids resistant to Fo has been carried out in vitro on a solid Vacin & Went (VW) medium which was added with fusaric acid at concentrations of 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm and 40 ppm compared to controls (0 ppm). Orchid *S. plicata* from the selection of fusaric acid was then inoculated with Fo. This study aims to analyze the total chlorophyll content in leaves of the *S. plicata* plantlets as a result of induce resistance to Fo. The research was conducted at the Network Culture Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Lampung. The study used a completely randomized design. Data were analyzed for variance (ANOVA) and if significantly different continued with the LSD test a real level of 5%. The results showed that the higher the concentration of fusaric acid, the higher the total chlorophyll content of soil-resistant orchid plantlets was increased. At a concentration of 40 ppm, the highest total chlorophyll content is $9.592 \pm 2.226 \times 10^{-1e}$*

Key Words: *Fusarium oxysporum, Affected Resilience, Chlorophyll, In Vitro*

PENDAHULUAN

Fusarium oxysporum (*Fo*) adalah salah satu jenis patogen tular tanah yang menyebar melalui tanah atau rimpang dari tanaman sakit, dan menginfeksi tanaman melalui luka yang terjadi karena pengangkutan benih, penyiangan, atau karena serangga dan nematoda. Di dalam tanaman yang terinfeksi akan terbentuk miselium yang berkembang sampai mencapai pembuluh xilem, sehingga menyebabkan terhalangnya transportasi unsur hara dan akhirnya tanaman layu (Putri *et al*, 2014 ; Semangun, 1996). *Fusarium oxysporum* (*Fo*) dapat bertahan lama dalam tanah sebagai saprofit, pada sisa-sisa tanaman dalam bentuk miselium, konidium dan hifa. Apabila kondisi lingkungan menguntungkan, jamur akan berkecambah dan mengadakan penetrasi sehingga terjadi infeksi pada tanaman (Semangun, 1996).

Fusarium oxysporum merupakan penyakit penting yang menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek (Palmer, 2011). Salah satu usaha yang efisien, efektif, tidak menimbulkan dampak negatif seperti pestisida, dan aman untuk mengendalikan *F. oxysporum* adalah dengan menggunakan varietas unggul dan tahan terhadap *F. oxysporum* (Nurchayani, 2013). Kultivar yang resisten terhadap infeksi *F. oxysporum* dapat diidentifikasi melalui seleksi secara *in vitro* dalam media dengan penambahan asam fusarat (Bacon *et al.*, 1996). Beberapa parameter yang dapat menunjukkan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain kandungan klorofil

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 & Löfter, 1997; Toyoda *et al.*, 1988 cit. Landa *et al.*, 2002). Terdapat korelasi positif antara ketahanan planlet anggrek *Spathoglottis plicata* Bl terhadap toksin dengan ketahanan tanaman terhadap *Fusarium* (Arai & Takeuchi, 1993). 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 pisang ambon kuning (Sukmadjaja dkk., 2013), melon (Sujatmiko dkk., 2012), dan planlet abaka (Sukmadjaja dkk., 2003) menunjukkan ketahanannya terhadap penyakit layu fusarium. Penggunaan AF dalam konsentrasi yang toleran sejauh ini belum pernah dilakukan untuk menginduksi resistensi pada planlet *Spathoglottis plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Oleh karena itu, penelitian ini perlu dilakukan.

METODE PENELITIAN

a. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Botani (ruang penelitian *in vitro*), Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

b. Penyiapan Bahan

Bahan planlet anggrek *Spathoglottis plicata* B1 steril dalam botol kultur umur 6 bulan yang diperoleh dari koleksi pribadi Ibu Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. Bahan ini sudah dipropagasi secara *in vitro* dan diseleksi dengan asam fusarat konsentrasi 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm pada penelitian pendahuluan. Isolat jamur *F. oxysporum* diperoleh dari koleksi pribadi ibu Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.

c. Inokulasi dan Pengujian Resistensi *F. oxysporum* pada Planlet Anggrek *Spathoglottis plicata* B1

Inokulasi dilakukan menurut metode Hadisutrisno (1995). Inokulasi *F. oxysporum* dilakukan secara langsung pada planlet anggrek *Spathoglottis plicata* B1 dalam botol kultur hasil seleksi asam fusarat (konsentrasi 0, 10, 20, 30 dan 40 ppm), dengan 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.

Karakterisasi Planlet Anggrek *Spathoglottis plicata* B1 Resisten terhadap *Fusarium oxysporum*.

Tanggapan struktural berupa analisis kandungan klorofil total anggrek *Spathoglottis plicata* B1. Bahan untuk analisis kandungan klorofil menggunakan daun planlet *Spathoglottis plicata* yang sudah diimbas dengan AF, menggunakan metode Harbourne (1987) dengan spektrofotometer. Langkah kerjanya sebagai berikut.

Daun planlet *S. plicata* yang seragam sebanyak 0,1 g dihilangkan ibu tulang daunnya, kemudian digerus dengan mortar (*pestle*) dan ditambahkan 10 mL aseton 80%. Setelah itu larutan disaring dengan kertas *Whatmann* No. 1, dan dimasukkan ke dalam flakon serta ditutup rapat. Larutan sampel dan larutan standar (aseton 80%) di ambil sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan dalam kuvet. Setelah itu dilakukan pembacaan serapan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang (λ) 646 nm dan 663 nm, dengan ulangan tiap sampel sebanyak 3 kali. Kandungan klorofil dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Klorofil total} &= 17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663} \text{ mg/L} \\ \text{Klorofil a} &= 12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646} \text{ mg/L} \\ \text{Klorofil b} &= 20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663} \text{ mg/L} \end{aligned}$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet anggrek tanah *S. plicata* selama seleksi dengan AF berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan didukung foto. Data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) atau Anova. Analisis ragam atau anova dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) pada taraf nyata 5%

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inokulasi dan Pengujian Resistensi *F. oxysporum* pada Planlet Anggrek *S. plicata* B1

Fusarium oxysporum yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berupa monospora. Koloni *Fusarium oxysporum* yang ditumbuhkan pada medium Potato Dextrose Agar (PDA) berwarna putih baik pada permukaan bawah dan permukaan atas. Isolat monospora digunakan untuk mendapatkan sifat yang seragam dan stabil dari *Fusarium oxysporum* sehingga diharapkan dapat memberikan hasil yang konsisten (Windels, 1993) pada uji yang digunakan pada planlet anggrek tanah. Metode inokulasi yang digunakan dalam uji ketahanan planlet *spathoglottis plicata* hasil pengimbasan asam fusarat adalah dengan menginokulasikan secara langsung mikrokonidium jamur *F. oxysporum* pada planlet 1-2 tetes di dalam botol kultur secara *in vitro* 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 anggrek tanah yang diimbas, gejala daun layu pada kontrol muncul pada hari ke-4 setelah inokulasi.



Gambar 1. Koloni *F. oxysporum* (A) umur 7 hari, (B) umur 4 minggu dalam medium PDA

Hasil dan Pembahasan

1. Analisis Kandungan Klorofil

a. Kandungan Klorofil a

Kandungan klorofil a daun planlet angrek tanah yang di tanam pada medium *Vacin & Went* (VW) dengan penambahan berbagai konsentrasi asam fusarat di sajikan pada (Tabel 1).

Tabel 1. Kandungan klorofil a daun planlet *Spathoglottis plicata*

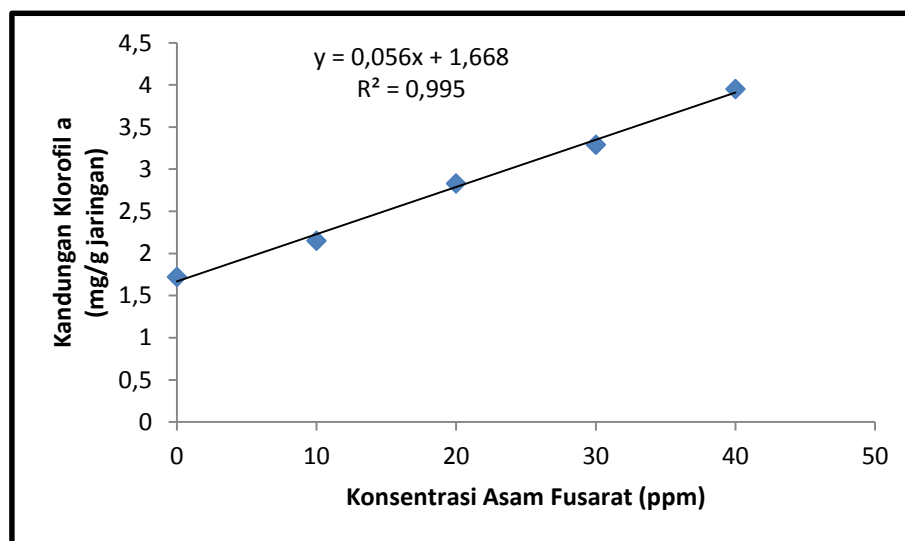
Konsentrasi asam fusarat (ppm b/v)	Kandungan Klorofil a (mg/g Jaringan)
0 (Kontrol)	$1,722 \pm 1,130 \times 10^{-2a}$
10	$2,157 \pm 4,739 \times 10^{-2b}$
20	$2,834 \pm 5,819 \times 10^{-3c}$
30	$3,297 \pm 2,952 \times 10^{-4d}$
40	$3,957 \pm 1,889 \times 10^{-2e}$

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata

pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan tabel 1. Menunjukkan bahwa penambahan asam fusarat pada medium vw engan berbagai konsentrasi berpengaruh nyata terhadap kandungan klorofil a daun planlet *S. plicata* pada konsentrasi asam fusarat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm berbeda nyata terhadap kontrol.

Perbandingan kandungan klorofil a planlet *S. plicata* yang ditanam pada medium vw dengan berbagai konsentrasi asam fusarat disajikan pada gambar 2.



Gambar 2 : Grafik batang kandungan klorofil a planlet *S. plicata*

Berdasarkan gambar 1 menunjukkan bahwa kandungan klorofil a daun planlet *S. plicata* mengalami peningkatan pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm.

b. Kandungan Klorofil b

Kandungan klorofil b daun planlet anggrek tanah yang di tanam pada medium *Vacin & Went* (VW) dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan pada (Tabel 2).

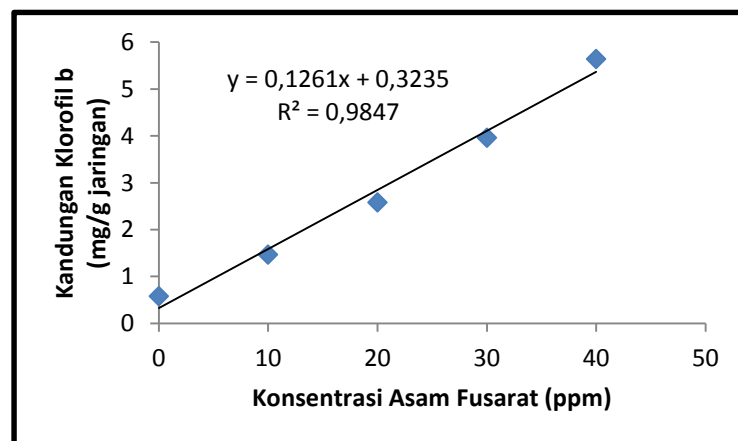
Tabel 2. Kandungan klorofil b daun planlet *Spathoglottis plicata*

Konsentrasi asam fusarat (ppm b/v)	Kandungan Klorofil b (mg/g Jaringan)
0 (Kontrol)	$0,585 \pm 2,553 \times 10^{-2a}$
10	$1,470 \pm 1,323 \times 10^{-2a}$
20	$2,582 \pm 1,830 \times 10^{-3b}$
30	$3,966 \pm 9,140 \times 10^{-3c}$
40	$5,642 \pm 3,674 \times 10^{-1d}$

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan Tabel 2 uji BNT pada taraf nyata 5% menunjukkan bahwa penambahan asam fusarat pada medium VW *S. plicata* berpengaruh nyata terhadap kandungan klorofil b. Sehingga kandungan klorofil b. pada planlet *S. plicata* yang telah diimbasi dengan asam fusarat pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, 40 ppm berbeda nyata terhadap kontrol.

Perubahan kandungan klorofil b planlet *S. plicata* yang ditanam pada media VW dengan berbagai konsentrasi asam fusarat disajikan pada gambar 3.



Gambar 3 : Grafik batang kandungan klorofil b planlet *S. plicata*

c. Kandungan Klorofil Total

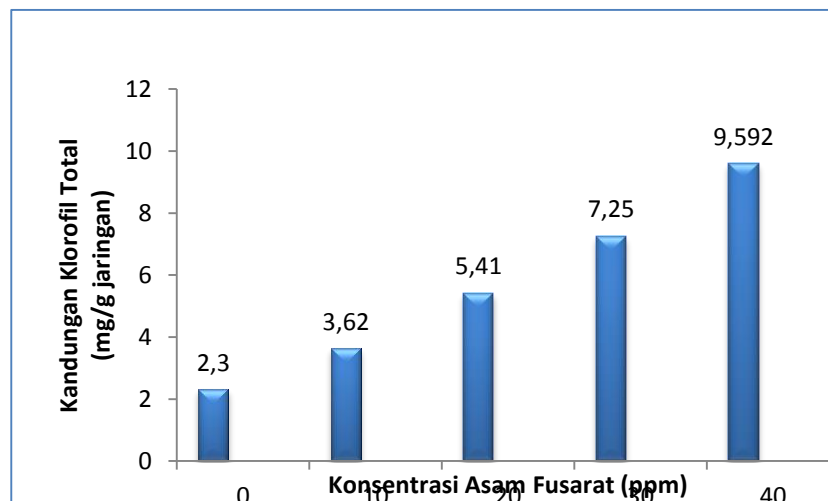
Kandungan klorofil total daun planlet anggrek tanah yang di tanam pada medium *Vacin & Went* (VW) dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan pada (Tabel 3).

Tabel 3. Kandungan klorofil daun planlet *S. plicata*

Konsentrasi asam fusarat (ppm b/v)	Kandungan Klorofil total (mg/g Jaringan)
0 (Kontrol)	2,309 ± 2,750x10 ^{-2a}
10	3,625 ± 1,050x10 ^{-1b}
20	5,413 ± 8,159x10 ^{-3c}
30	7,258 ± 6,136x10 ^{-3d}
40	9,592 ± 2,226x10 ^{-1e}

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan Tabel 3 di atas dapat diketahui adanya kecendrungan pola peningkatan kandungan klorofil secara keseluruhan dengan sejalan semakin meningkatnya cekaman AF. Uji BNT pada taraf nyata 5% menunjukkan bahwa kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total daun planlet anggrek tanah pada konsentrasi AF 40 ppm berbeda terhadap kontrol.



Gambar 4. Grafik batang perbandingan klorofil total planlet *Spathoglottis plicata*

Kesimpulan

Hasil dari pengimbasan planlet angrek *Spathoglottis plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* yang telah diseleksi dengan menggunakan asam fusarat pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm pada medium VW mampu memberikan pengaruh dalam meningkatkan kandungan klorofil pada planlet *Spathoglottis plicata* dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan kandungan klorofil sejalan dengan semakin meningkatnya cekaman AF.

DAFTAR PUSTAKA

- Arai M and 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 dan Leslie JF. 1996. Production of Fusaric Acid by *Fusarium* Sp. *Applied and Environmental Microbiolog.* 62 (11): 4039-4043.
- Bouizgarne B, Bouteau HEM, Frankart C, Rebutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadramu EI. 2006. *Early Physiological Responses of Arabidopsis thaliana Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects.* *New Phytologist* 169 : 209 – 218
- Fahn A. 1991. *Anatomi Tumbuhan.* Edisi ke-3. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 943 p.
- Goodman RN, Zoltan K., dan Milton Z, 1986. *The Biochemistry and Physiology of Plant Disease.* D. Van Nostrand Company, Inc. New Jersey, Toronto, London, Melbourne.
- Hamza, A.A. Derbalah, and M. El-Nady. 2012. Identification and Mechanism of *Echinochloa crus-galli* Resistance to Fenoxapro-p-ethyl with respect to Physiological and Anatomical Differences. *Scientific World Journal.* 2012: 1-8
- Han, H.S and K.D. Lee. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, Mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences.* 1(3): 210-215
- Harbourne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia.* Terjemahan : Padmawinata K & Sudiro I. Penerbit ITB Bandung. pp : 259-261
- 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.
- Litbang Pertanian. 2015a. *Kuning Ungu Percantik Tanaman.* <http://www.litbang.pertanian.go.id/berita/one/2102/> . Diakses pada 21 April 2015
- Nurcahyani E, Sumardi I, Hadisutrisno B, dan Suharyanto E. 2012. Penekanan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum f.sp. vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro.* *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika.* *JHPTT.* 12 (1): 12-22
- Nurcahyani, E. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilia planifolia* Andrews) Hasil Seleksi *In Vitro* dengan Asam Fusarat Terhadap *Fusarium oxysporum f.sp. vanillae.* Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. *Desertasi* (Tidak dipublikasikan).
- Palmer GD. 2011. *The control of orchids.* http://www.ebow.com/info_8525784_control-fusarium-wilt-orchids.html. Di akses pada tanggal 20 January 2015

- Putri, Oktavia S.D, Ika R.S, dan Syamsuddin D. 2014. Pengaruh Metode Inokulasi Jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*(sacc.) Terhadap Kejadian Penyakit Layu *Fusarium* pada Tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Jurnal HPT Vol. 2 No.3*
ISSN : 2338 – 4336.
- Remotti PC, Lofler HJM & Lotten-Doting LV. 1997. Selection of cell lines and regeneration of plants resistance to fusaric acid from *Gladiolus x gradiflorus* c.v 'Peteer Pear'. *Euphytica* 96:237-245.
- Ruzin, SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, New York
- Semangun, H. 1996. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. UGM Press. Yogyakarta
- Sticher L, Mauch-Mani B & Metraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology* 35: 235-270.
- Sujatmiko B, Sulistyaningsih E, dan Murti RH. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis melo* L) Terhadap Layu *Fusarium* Secara *In-Vitro* Dan Kaitannya dengan Asam Salisilat. *Ilmu Pertanian*. 15(2): 1 - 18
- Sukmadjaja D, Purnamaningsih R dan Priyatno T P. 2013. Seleksi *In Vitro* dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning untuk Ketahanan terhadap Penyakit Layu *Fusarium*. *Jurnal AgroBiogen* 9(2):66-76
- Toyoda H, Hasyashi H & Yamamoto K. 1984. Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 50: 538 – 540.
- Vidhyasekaran P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defense mechanism*. Marcel Dekker. New York. 553 p
- Wahyudi, T., T.R. Panggabean, dan Pujiyanto. 2008. *Kakau Manajemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Penebar Swadaya. Hlm. 1-151
- 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