

ELIMINASI PMWaV PADA EKSPAN NANAS DENGAN PERLAKUAN AIR PANAS DAN PENGARUHNYA TERHADAP VIABILITAS EKSPAN

Oleh :

Mimi Sutrawati

(Jurusan Perlindungan Tanaman, Fakultas Pertanian UNIB)

ABSTRACT

*Mealybug wilt of pineapple (MWP) is the devastating disease found in all the major pineapple growing regions of the world. MWP were associated with Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) and transmitted by *Dysmicoccus brevipes* Cockerell dan *D. neobrevipes* Cockerell (Homoptera : Pseudococcidae). This research was conducted to develop elimination method for PMWaV-free plant by hot water treatment. PMWaV infected plant (crown) were given two hot water treatment consisting of 35 °C for 24 hour as pre-treatment followed immediately by hot water treatment either 56 °C for 60 minute or 58 °C or 40 minute in a water bath. Axillary and lateral shoot explants cultured at MS medium and transplanted to B2N1 medium. Axillary shoot explants was grow 1 week after initiation, lateral shoot explants was grow 2 week after initiation. Growth of the explants marked by swelling of the shoot and more dark. Explants did not indicated significant development until 12 week after initiation. The obstructed of bud and root growth on explants may cause by alteration of plant growth hormon, and alteration of explants viability after hot water treatment.*

PENDAHULUAN

Salah satu kendala dalam produksi nanas adalah penyakit layu nanas yang juga telah menjadi masalah serius dalam budidaya nanas di seluruh dunia. Penyakit layu nanas berasosiasi dengan infeksi Pineapple mealybug wilt-associated virus (PMWaV) (Tryono 2006; Sether & Hu 2002a). Di lapangan, virus ini dapat ditularkan dengan efektif oleh dua spesies kutu putih yaitu *Dysmicoccus brevipes* Cockerell dan *D. neobrevipes* Cockerell (Homiptera : Pseudococcidae) (Sether *et al.* 1998).

Penyakit layu telah dilaporkan menyebabkan banyak kerugian pada industri nanas dunia seperti di Hawaii mencapai 35% (Sether & Hu 2002b) atau di Kuba mencapai 40% (Anonim 1989 dalam Borroto *et al.* 2007). Di Indonesia, penyakit ini telah menjadi masalah serius di sentra-sentra produksi nanas nasional. Kejadian penyakit layu di beberapa pertanaman nanas di Bitar sudah mencapai 90%, Subang 60-70%,

Simalungun 50-60%, dan Bogor 50% (Hutahayan 2006). Penyakit layu menyebabkan petani mengalami gagal panen, karena buah yang dihasilkan berukuran sangat kecil dan matang prematur. Rata-rata bobot buah dari tanaman bergejala layu 35% lebih rendah dari pada bobot buah tanaman bebas virus, dan 30% lebih rendah dari pada tanaman terinfeksi PMWaV-1 (Sether & Hu 2002b).

Penggunaan bibit bebas PMWaV akan meredakan jumlah sumber inokulum PMWaV di lahan sehingga pejuang penyebarannya menjadi kecil meskipun ada serangga vektor. Perkembangan penyakit layu pada 3 bulan pertama pertumbuhan tanaman nanas dapat menyebabkan penurunan bobot buah sampai 55% (Sether & Hu 2002b). Dengan demikian, penggunaan bibit bebas PMWaV diharapkan dapat mencegah terjadinya penyakit layu pada fase awal pertumbuhan tanaman nanas sehingga dapat mengurangi resiko kehilangan

hasil akibat penyakit layu. Rendahnya laju penyebaran penyakit layu akan memberikan banyak peluang bagi petani untuk membudidayakan nanas dengan tanaman *in vitro* sampai beberapa generasi.

Sistem perbanyakan massal tanaman nanas dapat dilakukan melalui teknik kultur jaringan *in vitro* dan *in situ*. Kedua cara ini dapat menghasilkan bibit nanas yang seragam dalam jumlah besar dan dalam waktu relatif singkat. Cara perbanyakan tanaman ini apabila dikombinasikan dengan metode eliminasi PMWaV diharapkan dapat digunakan untuk menghasilkan bibit nanas bebas virus. Dalam penelitian ini eliminasi PMWaV pada ekspilan dengan termoterapi yaitu perlakuan air panas pada ekspilan dalam perbanyakan massal nanas dengan kultur jaringan. Penelitian ini bertujuan mengetahui efektifitas perlakuan air panas untuk mengeliminasi PMWaV pada ekspilan nanas, dan pengaruh perlakuan air panas terhadap daya tumbuh ekspilan.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Virologi Tumbuhan Departemen Proteksi Tanaman IPB dan Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Kajian Buah Tropika (PKBT) IPB sejak Agustus sampai Desember 2008.

Persiapan Ekspilan Nanas

Bahan tanaman yang digunakan untuk kultur jaringan adalah *in vitro* buah (*cross*) nanas cv *Sonoch Cayene* yang diambil dari perintaran nanas di Desa Bembayu, Kecamatan Jelawang, Kabupaten Serang, Jawa Barat. Verifikasi infeksi PMWaV pada *cross* yang digunakan sebagai bahan kultur jaringan dilakukan dengan *in situ* *Mor immunoscopy* (TBIA) berdasarkan metode Hu *et al.* (1997). Sebagai kontrol negatif digunakan *cross* tanaman sehat. Ekspilan yang digunakan untuk inisiasi kultur nanas yaitu nanas *in vitro* dan nanas apikal yang diambil dari *cross*.

Verifikasi Infeksi PMWaV dengan Teser Riset Immunoscopy (TBIA)

PMWaV pada tanaman dideteksi secara serologi dengan TBIA berdasarkan metode Hu *et al.* (1997). Daun dipotong melintang pada bagian dasar daun dengan potongan yang rata. Potongan ini kemudian dibakar pada 0,45 µm *Niro AF microcollator membrane* (Amersham Pharmacia Biotech, USA) selama 60 detik. Pola jaringan pembuluh daun menyerupai dan meninggalkan jejak pada membran. Membran dapat disimpan kering di antara lipatan kertas saring pada suhu ruang sampai siap dianalisis.

Membran yang telah dibakar ditempatkan dalam wadah plastik dan dibungkus dengan 2% (wt/vol) susu skim yang dilarutkan dalam larutan penyangga phosphate buffer saline (PBS) (8g sodium chloride, 1,12g sodium phosphate dibasic, 0,2g potasium phosphate monobasic, 0,2g potasium chloride, 1000 ml aquades, pH 7,4) digoyang 30 rpm dengan rotary shaker selama 30 menit pada suhu ruang. Kemudian membran ditinkubasikan dalam wadah plastik atau kantong plastik segel dengan antibodi monoklonal PMWaV (Agria Inc., USA) dengan pengenceran 1:10 dalam PBS, digoyang 30 rpm dengan rotary shaker pada suhu ruang selama 1-2 jam, lalu ditinkubasi pada suhu 4 °C selama satu malam. Kemudian membran dicuci dengan PBS (PBS + 0,02% Tween 20) digoyang 120 rpm selama 10 menit pada suhu ruang, pemucian diulang sebanyak 3 kali. Setelah pemucian, membran kemudian ditinkubasikan dengan konjugat alkaline phosphatase (Shigma Chemical Co. St. Louis, USA) pada pengenceran 1:1000 dalam PBS selama 2-3 jam sambil digoyang 30 rpm pada suhu ruang. Membran kemudian dicuci seperti di atas, diwarnai dengan substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) (Shigma Chemical Co., USA) menggunakan satu tablet BCIP/NBT yang dilarutkan dalam 10 ml



Gambar 1. Perkembangan klorofil pada sel (a) dan sel yang terinfeksi (b) dengan 1 minggu setelah infeksi (jam)

Pengamatan klorofil pada sel-sel kultur dilakukan sampai 12 jam, namun hingga 24 jam pengamatan perkembangan pada klorofil sel-sel tersebut dilakukan. Hasil yang menunjukkan tetap berwarna hijau dan tidak terlihat adanya perkembangan sel-sel maupun akar. Tidak adanya perkembangan klorofil dapat disebabkan oleh banyak faktor antara lain perubahan konsentrasi dan konsentrasi sel pengatur tumbuh, maupun perubahan daya tumbuh klorofil.

Perubahan tanaman dengan kultur jaringan menunjukkan adanya perubahan respon akar apikal, klorofil, maupun variasi tanaman terhadap konsentrasi media dan sel pengatur tumbuh. Menurut Wattanan (1988), sel pengatur tumbuh merupakan komponen yang penting dalam kultur jaringan, namun jenis dan konsentrasinya sangat berpengaruh pada jenis tanaman dan tujuan budidaya. Perkembangan dan morfogenesis tanaman in vitro dikendalikan oleh konsentrasi dan konsentrasi sel pengatur tumbuh di dalam medium tersebut. Salah satu sel pengatur tumbuh yang digunakan dalam penelitian ini adalah benzil adenin (BA) yang merupakan salah satu senyawa adenin yang cukup efektif dan NAA yang merupakan senyawa BA mampu meningkatkan produksi hormon dalam di dalam medium dan hormon dalam tersebut bekerja dalam meningkatkan organogenesis (Cane & Mages 1982). Adenin berperan dalam perambatan kultur, respon sel, pertumbuhan akar, dan berumur serta dapat stabilisasi maupun morfogenesis tanaman. Selain itu, adenin berperan dalam pembentukan klorofil, sintesis protein, serta

morfogenesis tunas dan akar (Wattanan 1988).

Di dalam medium kultur sel pengatur tumbuh antara lain IAA (indoleacetic acid), dan N^6 -(2-isopentenyl) adenin (ip), N^6 -(2-isopentenyl) adenin (ip), kaurin (K), zeatin ribosida (ZR), dan N^6 -furfuryladenin (FA) yang bentuk pada bagian dasar dan. Pengaruh BA dan NAA dari medium kultur menyebabkan perangsang level ZPT sehingga pada di dan IAA yang kemudian terlihat dalam proses organogenesis tunas (Aar *et al.* 1999).

Pembuatan ZPT klorofil BA (2 mg/L) dan NAA (1 mg/L) merupakan konsentrasi terbaik untuk meningkatkan perkembangan sel-sel pada tingkat kultur, dan selanjutnya dapat diketahui di dan IAA untuk meningkatkan organogenesis tunas (Aar *et al.* 1999). Dalam penelitian ini media kultur yang digunakan adalah ZPT klorofil berupa BA (2 mg/L dan NAA (1 mg/L) namun tidak terjadi perkembangan tunas dan akar. Perubahan air pada pada klorofil sel-sel berpengaruh terhadap sel pengatur tumbuh sehingga pada tanaman sel-sel juga berpengaruh pada daya tumbuh klorofil. Perubahan jenis klorofil dapat menyebabkan sel-sel adenin, adenin, dan giberelin, serta meningkatkan adenin acid (ABA) dan sel-sel pada tanaman (Hadi *et al.* 1994). Perubahan konsentrasi sel pengatur tumbuh pada tingkat sel-sel berpengaruh terhadap variasi klorofil sel-sel, tidak ada yang sel-sel menghambat perkembangan tunas dan akar pada klorofil tanaman sel-sel yang terlihat (Purkay

larutan penyangga *Alkaline Phosphate* (AP). Pewarnaan dilakukan pada suhu ruang sampai terjadi perubahan warna pada membran. Warna ungu pada membran menandakan hasil deteksi positif terinfeksi PMWaV. Reaksi pewarnaan dibersihkan dengan mencuci membran menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan. Tanaman yang positif terinfeksi PMWaV kemudian digunakan sebagai sumber ekspitan.

Perlakuan Air Panas

Cross dari tanaman yang terinfeksi dan yang tidak terinfeksi PMWaV (kontrol negatif) diberi *pre-treatment* air panas 35 °C selama 24 jam di dalam penangas air. Kemudian cross diberi perlakuan air panas 36 °C selama 60 menit atau 58°C selama 40 menit. Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap dengan perlakuan (1), perlakuan air panas 36 °C selama 60 menit; (2), perlakuan air panas 58°C selama 40 menit; (3), tanpa perlakuan pemanasan (kontrol positif); serta (4), cross sehat tanpa perlakuan air panas (kontrol negatif). Setiap perlakuan diulang 3 kali, setiap ulangan terdiri dari 5 botol kultur dengan 10 ekplan/botol sehingga terdapat 150 unit percobaan. Perubah yang diamati adalah pertumbuhan ekplan dan ada tidaknya infeksi PMWaV pada ekplan.

Kultur Jaringan Nanas

Dasar cross dipotong dari bonggol, kemudian bonggol direndam dalam larutan detegon selama 30 menit dan dibilas dengan air mengalir selama 30-60 menit. Mata tunas akuler dan tunas apikal dari bonggol cross diambil dengan menggunakan *scalpel* kemudian direndam dalam larutan fungisida dan bakterisida selama 30 menit, dan dibilas dengan aquades steril sebanyak 2 kali. Selanjutnya, mata tunas tersebut direndam

dalam NaOCl 20% dan 10% masing-masing selama 5 menit, dan dibilas dengan aquades steril. Mata tunas tersebut kemudian ditanam pada media inisiasi yaitu media MS dasar yang terdiri dari larutan makro, larutan mikro A, larutan mikro B ditambah NAA 2 mg/l, BA 2 mg/l dipelihara sampai 12 minggu, selanjutnya tunas dipindahkan ke media B2N1 untuk menginduksi pembenturan tunas dan akar.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh Perlakuan Air Panas terhadap Daya Tumbuh Ekplan

Pertumbuhan ekplan di dalam media inisiasi mulai terlihat sejak 1 minggu setelah inisiasi (msi) pada media inisiasi. Pertumbuhan ekplan tunas apikal menunjukkan perbedaan dengan ekplan mata tunas lateral. Tunas apikal mulai tumbuh dengan merambat dan sejak 1 msi (Gambar 1a) namun belum menunjukkan pertumbuhan akar, sedangkan tunas lateral belum menunjukkan tanda pertumbuhan tunas maupun akar (Gambar 1b). Pertumbuhan ekplan tunas lateral mulai terjadi sejak 2 msi ditandai dengan terjadinya pembengkakan mata tunas dan perubahan pada mata tunas sehingga terlihat berwarna gelap. Setelah 4 msi mata tunas dari ekplan tunas lateral mulai pecah dan berwarna hijau menunjukkan calon tunas akan muncul. Namun sampai ekplan berwarna 12 msi tidak terjadi perubahan yang signifikan pada mata tunas tersebut. Selanjutnya ekplan dipindah ke media B2N1 untuk menginduksi pembenturan tunas dan akar. Selama 12 msi pada media B2N1, ekplan juga tidak menunjukkan pertumbuhan yang berarti namun mata tunas tetap hijau, menandakan ekplan tersebut hidup.

adalah penurunan daya tumbuh eksplan akibat perubahan metabolisme pada tanaman nanas sakit. Tanaman yang terserang penyakit layu mengalami perubahan metabolisme antara lain peningkatan kadar asam absisat, protein terlarut, prolin dan fenol, munculnya peroksidase dan aktivitas asam invertase (Nieves *et al.* (1996) dalam Borroto *et al.* 2007). Perubahan metabolisme dalam tanaman sakit tersebut diduga mempengaruhi daya tumbuh eksplan yang berasal dari tanaman sakit. Terhambatnya pertumbuhan tunas dan akar dapat disebabkan oleh perubahan keseimbangan dan konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta penurunan viabilitas eksplan akibat perlakuan air panas pada eksplan. Dengan demikian perlakuan air panas pada eksplan belum dapat diaplikasikan bersamaan dengan teknik kultur jaringan nanas untuk mendapatkan bibit bebas PMWaV.

KESIMPULAN

Crown yang diberi perlakuan panas mengalami kegagalan pembertukan tunas dan akar pada eksplan nanas. Nodul yang terbentuk pada eksplan tunas lateral tetap berwarna hijau menandakan bahwa eksplan tersebut hidup namun tidak menunjukkan pertumbuhan tunas maupun akar. Terhambatnya pertumbuhan tunas dan akar dapat disebabkan oleh perubahan keseimbangan dan konsentrasi zat pengatur tumbuh, serta penurunan viabilitas eksplan akibat perlakuan air panas pada eksplan. Dengan demikian perlakuan air panas pada eksplan belum dapat diaplikasikan bersamaan dengan teknik kultur jaringan nanas untuk mendapatkan bibit bebas PMWaV.

DAFTAR PUSTAKA

Auer CA, Motyka V, Breziszová A, Kamínek M. 1999. Endogenous cytokinin accumulation and cytokinin oxidase activity during shoot organogenesis of *Penstemon hybridus*. *Physiol. Plant.* 105:141-147.

- Borroto FEG, Torres AJA, Laimer M. 2007. RT-PCR detection and protein-protein interaction of viral component of pineapple mealybug wilt-associated virus-2 in Cuba. *Plant Pathology*. 89:435-439.
- Hadidi A, Khetarpal RK, Koganezawa H. 1998. *Plant Virus Diseases Control*. USA: APS.
- Hu JS, Sether DM, Liu XP, Wang M. 1997. Use of tissue blotting immunoassay to examine the distribution of pineapple Closterovirus in Hawaii. *Phytopathology* 88:1150-1154.
- Hutahayan AJ. 2006. Peranan strain dan Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus dan kutu putih (*Dysmicoccus spp.*) dalam menginduksi gejala layu pada tanaman nanas. [Thesis] Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Sether DM, Hu JS. 2002a. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. *Phytopathology* 92: 928-935.
- Sether DM, Hu JS. 2002b. Yield impact and spread of pineapple mealybug wilt-associated virus-2 and mealybug wilt of pineapple in Hawaii. *Plant Diseases* 85: 867-874.
- Sether DM, Uffman DE, Hu JS. 1998. Transmission of pineapple mealybug wilt-associated virus by two species of mealybug (*Dysmicoccus Spp.*). *Phytopathology* 88:1224-1230.
- Tryono R. 2006. Deteksi dan identifikasi Pineapple Mealybug Wilt-associated Virus penyebab penyakit layu pada tanaman nanas di Indonesia. [Tesis] Sekolah Pascasarjana IPB, Bogor.
- Wattimena GA. 1988. *Zat Pengatur Tumbuh*. Pasat Antar Universitas, Institut Pertanian Bogor, Bogor. 247 hal.
- Zaers, J. B. and M. O. Mapes. 1982. Action of growth regulation. In J. M. Bonga and D. J. Durzan (*Eds*). *Tissue Culture in Forestry*. Martinus Nijhoff Publ. The Hague.