PENGARUH KONSENTRASI FILTRAT *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* ras 4 TERHADAP KALUS KEDELAI VARIETAS HAROSOY

Moralita Chatri[1], Trimurti Habazar[2], Kasli[2], Abdi Dharma[2]

ABSTRACT

The influence of filtrate of *Pseudomonas syringae* pv. glycinea on growth of soybean calli has been studied. It was used the susceptible soybean varieties Harosoy. Soybeans calli was grown on B5 medium + filtrate from *Psg* race 4 (as toxic medium) with various concentration (0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35% and 40%) to find sublethal concentration . Calli was treated three times in toxic medium with 4 weeks interval.

The result indicated that filtrate from *Psg* race 4 reduce the growth of soybeans calli. Sublethal concentratio of filtrate of *Psg* race 4 on soybeans calli was 10% - 25%.

Key Word : Filtrat, *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*, soybean calli

PENDAHULUAN

Penyakit hawar bakteri merupakan salah satu penyakit yang banyak merusak tanaman kedelai yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas syringae pv. glycinea (Psg)*. Di luar negeri, seperti Perancis, Jerman, Polandia, Hongaria, Italia, Ukraine, Yugoslavia, Amerika dan beberapa negara di Asia, tingkat serangan bakteri ini mencapai 46-62% (Kleinhempel, *et al* 1989) dan penurunan hasil panen sebesar 30% (Fulling dan Sinclair, 1991). Di Indonesia, penyakit ini terdapat hampir diseluruh daerah pertanaman kedelai, termasuk di Sumatera, Jawa, Kalimantan, Sulawesi, Bali dan Nusa Tenggara (Tantera, 1992). Penurunan hasil kedelai akibat penyakit ini dapat berbeda tergantung pada varietas kedelai, seperti pada varietas Orba dapat menurunkan hasil sampai 65,88% dan Galunggung 40,78% (Suryadi, 1989).

Cara pengendalian yang efektif terhadap patogen ini belum memadai baik penggunaan senyawa kimia maupun cara-cara lainnya. Di samping itu penggunaan senyawa kimia seringkali menimbulkan permasalahan seperti dampak negatif terhadap lingkungan. Salah satu cara pengendalian penyakit ini yang paling aman, mudah dan efektif adalah dengan menggunakan varietas tahan (Abo-Moch, *et al* 1991). Ketahanan tanaman kedelai terhadap penyakit hawar bakteri diatur oleh satu gen (monogenik) atau beberapa gen (oligogenik). Bila penurunan gen ini dilakukan secara konvensional memerlukan waktu yang lama, terutama karena patogen ini mempunyai banyak ras. Ras yang lebih dominan di daerah pertanaman kedelai adalah ras 4 (Abo-Moch, *et al.* 1991). Di Pasaman Sumatera Barat, telah dilaporkan bahwa ras yang berkembang juga ras 4 (Habazar dan Rudolph, 1997). Ras 4 ini juga paling agresif karena dapat menginfeksi semua varietas kedelai di Eropah (Abo-Moch, *et al.* 1991).

Penggunaan teknik *in vitro* dalam pemuliaan tanaman akan memungkinkan untuk memperoleh keragaman somaklonal dari tanaman dan dapat merupakan sumber keragaman genetik (Dolozel dan Novak, 1986). Selanjutnya menurut Scowcroft *et al.* (1983) keragaman somaklona adalah suatu sumber potensi ketahanan tanaman terhadap penyakit. Disamping itu ketahanan dan kerentanan tanaman dapat diperlihatkan secara *in vitro* (Helgeson, 1983).

Tingkat ketahanan yang tinggi dari tanaman jagung dapat diperoleh melalui seleksi serial pada medium yang berisi konsentrasi sublethal dari T-toksin dan ketahanan ini terlihat stabil pada regenerasi tanaman yang berasal dari kultur kalus (Gengenbach, *et al.* 1977, cit Scowcroft *et al.* 1983). Kalus kentang yang di subkultur 3 kali pada medium toksik yang mengandung kultur filtrat *Phytophthora infestans* setelah diregenerasi, plantletnya menunjukkan reaksi tahan terhadap jamur *P. Infestans* (Behnke, 1980). Menurut Dixon dan Gonzales (1995), konsentrasi sublethal toksin adalah konsentrasi yang menghambat pertumbuhan kultur sel tanaman 50-96%. Sampai saat ini belum ada informasi tentang pengaruh filtrat *Psg* terhadap pertumbuhan kalus kedelai dan kaitannya dengan induksi ketahanan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh konsentrasi filtrat *Psg* ras 4 terhadap

[1] Alumni Program Studi Hama dan Penyakit Tanaman PPs Unand
[2] Dosen Pascasarjana Universitas Andalas

kalus kedelai dan mendapatkan konsentrasi sublethal filtrat *Psg* ras 4, yang diharapkan dapat menginduksi ketahanan kalus kedelai.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan dan kultur jaringan Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang mulai bulan Agustus 1996 sampai April 1997.

1. Penginduksian kalus kedelai

Eksplan berasal dari kotiledon kedelai varietas Harosoy. Eksplan ini ditanam pada medium MS yang ditambahkan 2,4-D 1 mg.l^{-1} dan dan IAA 1 mg.l^{-1} kemudian diinkubasi selama 4 minggu. Untuk memperbanyak kalus, maka kalus tersebut disubkultur lagi dalam medium yang sama dan diinkubasi lagi 1 bulan.

2. Penyediaan filtrat *Psg*

Isolat *Psg* yang digunakan adalah P_7B (koleksi bagian bakteriologi jurusan HPT, Fak Pertanian Universitas Andalas). Isolat ini diremajakan pada medium King's B, kemudian dipindahkan kedalam 25 ml medium cair Wooley (dalam labu Erlenmeyer volume 100 ml) dan diinkubasi selama 4 hari pada automatic shaker pada suhu 18-19°C (preculture). Untuk main culture, 0,5 ml biakan preculture dipindahkan kedalam medium cair Woolley dan diinkubasi dengan cara yang sama dengan preculture. Biakan bakteri ini ditambahkan dalam medium B5, kemudian disterilkan dalam otoklaf.

3. Induksi Ketahanan Kalus Kedelai

Kalus kedelai disubkultur 3 kali pada medium B5 yang ditambahkan 2,4 D 1 mg.l^{-1} mengandung filtrat *Psg* dengan berbagai konsentrasi (medium toksik dengan interval 4 minggu). Percobaan ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan, masing-masing perlakuan terdiri atas 4 ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 5 botol kalus. Perlakuan terdiri atas beberapa konsentrasi *Psg* (0.5, 10, 15, 20, 25%).

Pada subkultur I, pertumbuhan kalus kedelai pada medium toksik dengan filtrat *Psg* tertinggi (25%) masih bagus dan belum dapat ditentukan konsentrasi sublethal dari filtrat tersebut, maka pada subkultur berikutnya (medium toksik II) konsentrasi filtrat *Psg* ditingkatkan menjadi 30%, 35% dan 40%.

Kalus pada semua perlakuan disubkulturkan lagi pada medium toksik III untuk menentukan bobot basah, bobot kering dan volume dari kalus. Data bobot basah, bobot kering dan volume dianalisis secara sidik ragam dengan uji DNMRT.

HASIL DAN PEMBAHASAN

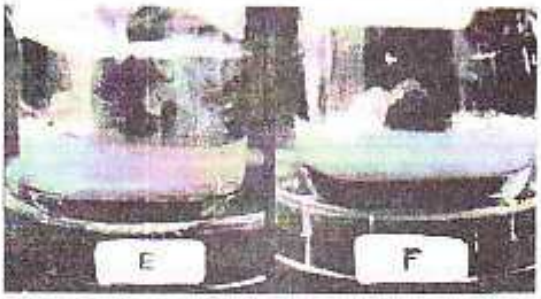
1. Persentase kalus yang tumbuh baik.

Umumnya persentase kalus yang tumbuh baik pada medium toksik I menurun sampai 2 minggu setelah tanam (mst), kemudian kembali meningkat (Tabel 1). Peningkatan persentase kalus yang tumbuh baik setelah 3 mst ditandai dengan munculnya kalus-kalus kecil yang berwarna kuning atau hijau pada kalus yang mengalami nekrotik (berwarna coklat). Kalus-lakus kecil ini selanjutnya ada yang berkembang melebihi besar kalus yang mengalami nekrotik (Gambar 1).

Tabel 1. Persentase kalus kedelai varietas Harosoy yang tumbuh baik pada medium toksik I dan II

Konsentrasi Filtrat *Psg*	Medium Toksik I					Medium Toksik II				
	Minggu setelah tanamn (mst)					Minggu setelah tanam (mst)				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0 % (A)	100	100	88.24	88.24	88.24	100	100	100	100	100
5 % (B)	100	89.47	73.68	78.95	78.95	100	100	100	100	100
10% (C)	100	83.33	66.66	72.22	72.22	100	100	40	60	60
15% (D)	100	92.85	57.14	64.29	64.29	100	40	13	60	60
20% (E)	100	93.33	46.66	66.66	66.66	100	33	7	60	60
25% (F)	100	94.74	10.53	63.16	63.16	100	0	10	60	60
30% (G)	-	-	-	-	-	100	0	0	43	43
35% (H)	-	-	-	-	-	100	0	0	20	20
40% (I)	-	-	-	-	-	100	0	0	0	0

Ket : - = belum ada penanaman kalus pada konsentrasi tersebut



Gambar 1. Kalus yang baru muncul pada permukaan kalus yang sebelumnya nekrotik pada medium toksik I. E = filtrat *Psg* 20% F = *Psg* 25%

Pada medium toksik II dengan konsentrasi filtrat *Psg* 0% dan 5% (B) menunjukkan tidak terjadinya penurunan persentase kalus yang tumbuh baik. Peningkatan konsentrasi filtrat menyebabkan terjadinya penurunan persentase kalus yang tumbuh baik sampai 2 mst, sama halnya dengan medium toksik I. Pada konsentrasi filtrat tertinggi (40%) ternyata tidak ada kalus yang tumbuh baik sampai 4 mst, karena semua kalus mengalami nekrotik. Dari hasil penelitian Crino *et al* (1988), konsentrasi 50% dari kultur filtrat *P. Infestan* dapat menghambat pertumbuhan pucuk pada kentang sampai 85%. Tyler *et al* (1988), cit Ernawati (1991) menjelaskan bahwa konsentrasi elisitor yang terlalu tinggi dapat menyebabkan timbulnya gejala nekrotik, yaitu terbentuknya kalus yang berwarna kecoklatan.

Persentase kalus yang tumbuh baik pada medium toksik II (4 mst) dengan konsentrasi filtrat *Psg* 10,15,20 dan 25% adalah sama (60%), yang merupakan konsentarsi sublethal. Menurut Dixon dan Gonzales (1995) konsentrasi sublethal toksin adalah konsentrasi yang menghambat pertumbuhan kultur sel tanaman adalah 1-50%. Penggunaan konsentrasi sublethal T-toksin menurut Gengenbach *et al* (1977), cit Scowroft *et al* (1983), pada kalus jagung menunjukkan tingkat ketahanan yang tinggi dan stabil pada jagung yang diregenerasi dari kalus tersebut.

Munculnya kalus baru pada kalus yang telah nekrotik pada medium toksik I dan II, hampir sama dengan hasil penelitin Toyoda dan Ouchi (1991) pada kalus tomat yang ditanam pada medium yang mengandung kultur filtrat *F. Solanocearum*. Kalus-kalus ini menunjukkan nekrotik 10-12 hst, kemudian pertumbuhannya terhenti, tetapi kemudian muncul kalus baru.Hal ini diduga akibat beberapa sel terinduksi ketahanannya oleh agen penginduksi atau elisitor yang terdapat pada filtrat *Psg* diduga adalah LPS yang terdapat pada dinding sel bakteri. Rudolph (1995) menjelaskan bahwa induksi ketahanan oleh LPS dari *pseudomonas* merupakan efek biologi pada tanaman yang merupakan respon antibakteri pada jaringan tanaman. LPS dari *Pseudomonas syringae pv. Marsprunorum, P.s pv. phaseolicola dan P.s pv. glycinea* telah dilaporkan mampu untuk menginduksi ketahanan tanaman inang terhadap patogen.

2. Bobot Basah, bobot kering dan Volume Kalus kedelai varietas Harosoy pada medium toksik III (2 mst)

Semakin tinggi konsentrasi filtrat *Psg* dalam medium MS menyebabkan berat basah, berat kering dan volume kalus kedelai semakin menurun (Tabel 2.)

Demikian juga halnya dengan warna kalus, semakin tinggi konsentrasi filtrat *Psg* menyebabkan persentase kalus berwarna coklat semakin jelas meningkat (Tabel 3). Pada konsentrasi filtrat *Psg* 15%, 20,25,30,35 dan 40% menunjukkan berat basah, berat kering dan volume yang tergolong rendah, karena pada konsentrasi ini persentase kalus yang tumbuh baik juga tergolong rendah dan kalus lebih banyak mengalami nekrotik terutama pada konsentrasi 30%, 35% dan 40%. Pada konsentrasi ini juga tidak ditemukan pertumbuhan kalus baru yang kecil-kecil setelah jaringan kalus mengalami nekrotik.

Tabel 2. Bobot basah, bobot kering dan volume kalus kedelai varietas Harosoy pada medium toksik III (2 mst)

Konsentrasi Filtrat *Psg*	Bobot Basah Kalus (mg)	Bobot Kering (mg)	Volume (cm^3)
0 %	77,5 b	3,08 a	2.590 a
5 %	55,0 c	1,88 b	1.640 b
10%	100,0 a	1,58 bc	1.550 b
15%	37,5 d	1,03 cd	850 d
20%	37,5 d	0,80 d	830 d
25%	45,0 d	1,10 cd	950 c
30%	42,5 cd	0,83 d	750 d
35%	35,0 d	0,60 d	580 d
40%	25,0 e	0,60 d	590 d
KK	42%	37%	27%

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh superskrip huruf kecil yang tidak sama pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata pada DNMRT (taraf 0,05)

Tabel 3. Warna kalus kedelai varietas Horosoy pada medium toksik III (4mst)

Konsentrasi Filtrat *Psg*	Warna Kalus (%)			
	Hijau	Hijau kekuningan	Kuning	Coklat
0%	100	0	0	0
5%	30	70	0	0
10%	30	10	20	40
15%	7	13	40	40
20%	7	20	33	40
25%	10	0	50	40
30%	0	0	43	57
35%	0	0	20	80
40%	0	0	0	100

Berat kering tertinggi adalah pada kalus dari medium toksik dengan konsentrasi filtrat *Psg* 10%, hal ini diduga terjadinya peningkatan senyawa ektin pada dinding sel tanaman, karena strukturnya lebih keras dan kompak dari struktur kalus yang lain. Menurut Sequiera dan Graham (1976) dalam induksi ketahanan tanaman akan merangsang terbentuknya premunitas, sehingga meningkatkan aktivitas aglutinasi, hal ini ditunjukkan dengan terjadinya peningkatan kadar lektin pada dinding sel tanaman tersebut. Peningkatan bobot kering dari kalus ini diduga juga berkaitan dengan terjadinya peningkatan unsur-unsur tertentu pada sel-sel kalus, menurut Trillas-Gay dan Arnes (1993) pada kalus bungan anyelir yang disubkultur pada medium toksik yang mengandung filtrat *Fusarium oxysporum* dan sel wortel yang diberi filtrat *Erwinia caratovora* menunjukkan terjadinya peningkatan kalsium.

KESIMPULAN DAN SARAN

1. Peningkatan konsentrasi filtrat *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* pada medium B5 (medium toksik) sampai 30% menyebabkan peningkatan persentase kalus kedelai yang nekrotik.
2. Konsentrasi filtrat 20 dan 25% dalam medium toksik I menyebabkan kalus mengalami nekrotik tetapi setelah di subkulturkan lagi pada medium toksik II menunjukkan pertumbuhan kalus baru yang muncul dari kalus yang nekrotik.
3. Konsentrasi sublethal dari filtrat *Psg* ras 4 adalah 20-25% untuk mengetahui efek induksi ketahanan dari kalus yang tumbuh pada medium toksik perlu di uji ketahanannya terhadap bakteri *Psg* secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

Abo-Moch, F., A. Mavridis and K. Rudolph. 1991. *Occurence of Races of* Pseudomonas syringae pv. glycinea *Europa and Their Capability to Produce Coronatine in* Pseudomonas syringae. *Pathovars*. In Florence. Taly. 439 : 227-133.

Behnke, M. 1980. *General Resistance to Late Blight of* Solanum tuberosum *Plants Regenerated from Callus Resistant to Culture Filtrates of* Phytophthora infestan. Theor. Appl. Gen. 56 : 125-152.

Crino P., R. Penuela., L. Martino., A. Sonnino and G. Ancora, 1988. *In vitro Reaction of Potato Mikronodes to Culture Filtrate of* Phytopthora infestans. Proceeding of the NATO Advanced Research Workshop on Phytotoxins and Plant Pathogenesis Held at Capri, Italy, May 30 June 3.

Dixon, R.A. and R.A. Gonzales. 1995. *Plant Cell Culture*. A Practical Approach. Second Edition. Oxford University Press. Tokyo.

Dolozed, Y and F.M. Novak, 1986. *Sister Chromatic Exchanges in Garlic* (Allium sativum *L*.) Callus Cells. Plant Cell Rep. 5 : 280-281.

Ernawati, A. 1991. *Produksi Senyawa-senyawa Metabolit Sekunder dengan Kultur Jaringan Tanaman*. Dalam Bioteknologi Tanaman. Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Fulling, B.A and J.B. Sinclair. 1991. *Soybean Diseases in The Tropical Soybean Improvement and Production* (Ed) by E.A Kuenemann FAO. 61-63.

Habazar T. And K. Rudolph. 1997. *Karakteristik Isolat-isolat* Pseudomonas syringae pv glycinea *dari beberapa Daerah Sentra Produksi Kedelai di Indonesia*. Prosiding Kongres Nasional XII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia di Palembang, tgl 27-29 Oktober.

Helgeson H.P. and Haberlach. 1980. *Disease Resistance Studies with Tissue Culture in Use of Tissue Culture and Protoplast in Plant Pathologi* (Edited by Helgeson J.P and B.J. Deverall). Academic Press. London.

Kleinhempel, H.K. Naumann and D. Sparr. 1989. *Bakterielle Erkrankungen der Kulturpflanzen*. VEB Gustav Fiscer Verlag. Jena. Germany.

Rudolph. K. 1995. Pseudomonas syringae *pathovarss*. In Pathogenesis and Host Specificity *in Plant* disease by Singh, U.S, R.P. Singh and K.Kohmato, Elsevier. Sci Ltd Japan, 47-138.

Scoweroft. W.R., P.J. Larkin and R.L.S. Brettel 1983. *Genetic Variation from Tissue Culture in* (J.P. Helgeson and B.J. Deversell. eds) *Use of tissue Culture and Protoplast in Plant Pathology* Academic Press. London.

Sequiera and Graham, T.L. 1976. *Agglutination of a Virulent strains of* Pseudomonas solanacearum *by Potato lectin* (Abstr). Proceeding of American Phytopath. Soc. 3:233

Suryadi, Yadi, 1989. *Pengaruh tingkat inokulum* Pseudomonas syringae pv. *glycinea pada perkembangan Penyakit Hawar Kedelai.* Prociding Kongres Nasional X dan Seminar Ilmiah PEI, 14-16 No. Denpasar.

Tantera, D.M. 1992. *Petunjuk Bergambar untuk Identifikasi Hama dan Penyakit Kedelai di Indonesia.* Direktorat Jendral Pertanian Tanaman Pangan, Jakarta.

Toyoda. H and S. Ouchi. 1991. *Use of Somaclonal Variation for breeding of disease resistant plants in : Molecular Strategies of pathogens and host plant by Patil*, S.S., S Ouchi, D. Mills and C. Vance. Springer Verlag. New York, Berlin, Heidelberg. 230-239.

Trillas-Gay, M.I. and J.L. Araus. 1993. *Effects of* Fusarium Oxysporum *Culture Filtrate on Carnation Collus Cell Ultrastructure and Cytoplasmic Calcium Distribution.* Academic Press Limited.