

Seleksi *In-Vitro* pada Kalus Embriogenik Kacang Tanah yang Tahan terhadap berbagai Filtrat Kultur *Ras Sclerotium rolfsii*

A. Farid Hemon, Sumarjan, Laksmi Ernawati, Hanafi AR

Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Mataram
Jl. Pendidikan 37 Mataram Nusa Tenggara Barat e-mail: faridhemon_1963@yahoo.com

ABSTRAK

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan varian kalus embriogenik (embrio somatik) kacang tanah yang tahan terhadap berbagai media filtrat kultur *ras* cendawan *S. rolfsii*. Penelitian diawali dengan mengkarakterisasi dan uji anastomosis group isolat *S. rolfsii* hasil koleksi dari lapangan, menginduksi variasi somaklonal embrio somatik (ES) kacang tanah, dan seleksi *in vitro* kalus embriogenik untuk mengidentifikasi kalus embriogenik tahan terhadap media selektif filtrat kultur berbagai *race S. rolfsii*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa: (1) empat ras yang telah diidentifikasi mempunyai patogenisitas yang berbeda dan masing-masing mempunyai anastomosis grup yang berbeda antara satu dengan yang lain, (2) konsentrasi filtrat kultur 35% (l/l) merupakan konsentrasi sub letal $\geq 95\%$ yang mempunyai daya hambat pertumbuhan embrio somatik yang lebih tinggi dan selanjutnya dapat digunakan sebagai *selective agent* untuk mengidentifikasi kalus embriogenik yang tahan terhadap empat ras *S. rolfsii*, dan 3) kalus embriogenik yang diseleksi pada media seleksi lebih dari satu ras menghasilkan jumlah ES yang hidup dan jumlah ES per eksplan yang lebih sedikit dibanding seleksi hanya pada media filtrat kultur satu ras. Secara keseluruhan ES hasil seleksi pada media filtrat kultur dari empat ras *S. rolfsii* lebih tahan pada berbagai ras dibanding ES yang hanya diseleksi pada satu ras. Kalus embriogenik yang tahan selanjutnya akan diregenerasikan menjadi planlet dan diuji ketahanan pada 4 ras *S. rolfsii* pada percobaan berikutnya.

Kata kunci: variasi somaklonal, *in vitro*, *S. rolfsii*

ABSTRACT

In Vitro Selection on Groundnut Embryogenic Callus Resistant to Multiple Culture Filtrate of *Sclerotium rolfsii* Race. The objective of this research was to produce peanut embryogenic calli (somatic embryo) variants that resistant to culture filtrate medium of *S. rolfsii* races. This research was initiated of characterized and anastomosis group test of *S. rolfsii* isolate from the field collection. The next step were peanut somaclonal variation induction, *in vitro* selection to identify embryogenic calli that resistant on culture filtrate medium from *S. rolfsii* races. Result of study showed that: (1) four collected races of *S. rolfsii* had different pathogenicity and anastomosis group, (2) concentration of culture filtrate medium 35% (l/l) was sub lethal concentration $\geq 95\%$ had inhibited the growth of embryogenic calli and culture filtrate medium 35% was used as selective agent for identify embryogenic calli that resistant to *S. rolfsii* races, and (3) embryogenic calli that selected in selection medium at more than one race generated survival somatic embryo number (%) and somatic embryo number per explant fewer compared with embryogenic calli selected in culture filtrate medium only one race. All somatic embryo selected in culture filtrate medium of four races *S. rolfsii* were more resistant on culture filtrate medium of *S. rolfsii* races compared with somatic embryo that only selected in culture filtrate medium of one race *S. rolfsii*. Resistant embryogenic calli will be regenerated become planlets and tested resistance against 4 races *S. rolfsii* on next experiment.

Keywords: somaclonal variation, *in vitro*, *S. rolfsii*

PENDAHULUAN

Pengembangan kacang tanah lebih banyak diarahkan pada lahan sawah tadah hujan, tegalan atau lahan kering. Penanaman kacang tanah di lahan kering sering mendapat masalah kekurangan air terutama pada musim kemarau.

Masalah lain yang dihadapi pada budidaya kacang tanah di lahan kering adalah serangan penyakit busuk batang yang disebabkan oleh infeksi cendawan *Sclerotium rolfsii*. Infeksi patogen dapat menurunkan kuantitas dan kualitas hasil kacang tanah. Menurut Backman dan Breneman (1997), penurunan hasil akibat *S. rolfsii* berkisar antara 25–80%. *S. rolfsii* merupakan cendawan tular tanah (*soil borne*) dan *sclerotiumnya* mampu membentuk sklerotia sehingga mampu bertahan hidup cukup lama di tanah dan berkolonisasi. Kondisi lahan kering yang sulit diterapkan sistem pengairan menyebabkan inokulum cendawan sulit dihilangkan pada usaha tani lahan kering, sehingga inokulum selalu berada sepanjang musim tanam. Patogen ini juga mampu membentuk beberapa *race-race* fisiologi dan masing-masing *race* berbeda patogenisitasnya (Punja 1985; Benhamou and Chert 1996). Banyaknya ras-ras fisiologi menyebabkan sulitnya mengendalikan patogen ini dengan hanya mengandalkan gen tahan tunggal. Patogen ini dapat menyebabkan penurunan produksi dan bahkan gagal panen.

Penggunaan kultivar yang memiliki spektrum ketahanan yang luas merupakan alternatif yang praktis dan ekonomis untuk meningkatkan daya hasil kacang tanah. Di Indonesia, tetua kultivar kacang tanah yang tahan terhadap penyakit busuk batang belum ada (Yusnita dan Sudarsono 2004), sehingga persilangan konvensional dengan kultivar-kultivar lain yang berdaya hasil tinggi tidak dapat dilakukan. Oleh karena itu, penyediaan plasma nutfah kacang tanah yang tahan terhadap penyakit busuk batang menjadi sangat penting.

Upaya untuk mendapatkan plasma nutfah kacang tanah dapat dilakukan dengan meningkatkan variabilitas genetik tanaman melalui variasi somaklonal dan diikuti dengan seleksi kalus embriogenik (seleksi *in vitro*) (Karp 1995; Matsumoto *et al.* 1995).

Kultur *in vitro* dan seleksi kalus embriogenik pada tingkat sel dan jaringan dengan agens penyeleksi diharapkan dapat diperoleh karakter yang diinginkan (Jain 2001). Seleksi kalus embriogenik dapat dilakukan menggunakan filtrat kultur yang dikeluarkan *S. rolfsii* sebagai agens penyeleksi untuk mengidentifikasi sel atau jaringan tanaman kacang tanah yang tidak mati oleh filtrat kultur (Yusnita *et al.* 2005; Matsumoto *et al.* 1995). Sel atau jaringan yang tidak mati karena filtrat kultur diharapkan akan berkembang menjadi tanaman yang tahan terhadap infeksi *S. rolfsii*.

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan seleksi *in vitro* kalus embriogenik (embrio somatik) untuk ketahanan terhadap penyakit biasa dilakukan pada satu patogen dan tidak membedakan ras fisiologisnya, sehingga varietas tahan hasil penelitian tersebut lebih mudah patah ketahanannya dan menjadi rentan terhadap ras-ras baru (Hemon *et al.* 2006). Hasil pengamatan di lapangan menunjukkan galur-galur ini sangat rentan terhadap penyakit busuk batang yang disebabkan infeksi patogen *S. rolfsii* (Hemon 2009). Untuk itu, penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan varian kalus embriogenik (embrio somatik) kacang tanah yang tahan terhadap berbagai media filtrat kultur ras cendawan *S. rolfsii*.

BAHAN DAN METODE

Penyiapan Ras *S. rolfii*

Ras cendawan *S. rolfii* diisolasi dari berbagai daerah dan inang tanaman. Dari berbagai isolat yang telah dikoleksi dilakukan karakterisasi pertumbuhan koloni pada media PDA. Setelah karakterisasi pertumbuhan koloni, dilakukan uji *anastomosis group* berdasarkan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Carling *et al.* (1994) dan Bains and Bisht (1995). Pada petridis yang berisi media PDA ditempatkan tiga koloni dari isolat yang berbeda. Diameter koloni yang digunakan adalah 5 mm berumur 3 hari. Jarak antar koloni 3 cm. Pasangan kombinasi dua isolat yang lain ditempatkan pula dalam media PDA. Berbagai isolat hasil koleksi diamati kompatibilitas pertumbuhan miselium. Pertumbuhan miselium antar isolat yang tidak terjadi kompatibilitas dianggap *anastomosis group* tersendiri (ras fisiologis tersendiri).

Hasil karakterisasi pertumbuhan koloni dan uji *anastomosis group* diperoleh 4 ras *S. rolfii*, yaitu ras 1, ras 6, ras 8, dan ras 9. Setelah diperoleh 4 ras *S. rolfii*, selanjutnya dilakukan uji patogenitas. Hasil uji patogenitas menunjukkan ke empat ras tersebut berbeda patogenitasnya terhadap kacang tanah. Empat ras tersebut selanjutnya dikulturkan pada media PDA sebagai stok untuk keperluan pembuatan media filtrat kultur. Filtrat kultur (toksin metabolit) diperoleh dengan cara menumbuhkan 4 ras patogen pada media MS0. Pada umur 14 hari setelah tanam, cendawan tersebut disterilkan untuk mendapatkan filtrat kultur (toksin metabolit).

Pengembangan Populasi Kalus Embriogenik = Embrio Somatik (ES)

Sebelum dilakukan seleksi *in vitro*, induksi kalus embriogenik dilakukan untuk mendapatkan populasi kalus embriogenik. Seleksi *in vitro* dilakukan pada jaringan mutan yang berasal dari benih kacang tanah generasi M4 (hasil iradiasi sinar Gamma).

Benih kacang tanah hasil panen dikupas dari polong dan disterilkan dengan perendaman dalam larutan NaOCl (*Clorox*) 25% selama 20 menit. Benih kacang tanah yang telah steril selanjutnya dibilas dengan aquades steril. Poros embrio diisolasi dari benih kacang tanah steril dan diambil leaflet sebagai sumber eksplan.

Media induksi ES terdiri atas media dasar MS (Murashige dan Skoog, 1962), vitamin B5 (Gamborg *et al.* 1968), gula sukrosa (30 g/L), agar-agar (8 g/L), dan zat pengatur tumbuh (auksin 16–20 μ M). Media diatur dengan pH 5,6 sebelum sterilisasi. Setelah agar-agar larut dalam media dengan pemanasan, media dituangkan dalam botol kultur dan ditutup dengan plastik. Media yang telah disiapkan disterilkan dengan pemanasan autoklaf.

Setiap empat minggu sekali, eksplan yang ditanam dipindahkan ke media regenerasi yang masih segar untuk menjamin tersedianya nutrisi yang diperlukan bagi perkembangan jaringan eksplan. Sub-kultur eksplan dilakukan terus menerus sampai terbentuknya ES primer. Kultur yang ditanam diinkubasikan dalam ruang kultur dengan temperatur yang diatur konstan 24°C siang dan malam. Ruangan dijaga dalam kondisi gelap selama 24 jam.

Pembentukan ES sekunder dapat dilakukan dengan menanam ES primer dalam media regenerasi. Untuk menginduksi pembentukan ES sekunder, eksplan ES primer yang didapat dari percobaan sebelumnya ditanam lebih lanjut dalam media regenerasi embrio somatik sekunder. Media induksi regenerasi embrio somatik sekunder menggunakan media yang

sama dengan media induksi ES primer. Eksplan ES primer ditanam dalam media induksi sebanyak 5 kalus embriogenik per botol. Eksplan embrio somatik primer disubkultur dalam media yang sama yang masih segar dan sub-kultur dilakukan terus-menerus sampai terbentuk kalus embriogenik. Kalus embriogenik dan embrio somatik sekunder yang didapat selanjutnya diisolasi dan ditanam kembali dalam media induksi yang masih segar selama beberapa periode sub-kultur. Kalus embriogenik disubkultur secara terus menerus untuk membentuk embrio somatik sekunder dan variasi somaklonal. Induksi variasi somaklonal diantara embrio somatik sekunder dilakukan selama 3–4 periode sub-kultur dalam media induksi.

Pembuatan Media Filtrat Kultur *S. rolf sii*

Media filtrat kultur merupakan campuran media dasar MS (Murashige dan Skoog 1962), vitamin B5 (Gamborg *et al.* 1968), gula sukrosa (30 g/L), agar-agar (8 g/L), dan filtrat kultur *S. rolf sii* (konsentrasi 0, 25, 30, 35%). Media diatur dengan pH 5,6 sebelum sterilisasi. Setelah agar-agar terlarut dalam media dengan pemanasan, media dituangkan dalam botol kultur ukuran 150 mL masing-masing sebanyak 25 mL dan ditutup dengan plastik. Media yang telah disiapkan disterilkan dengan pemanasan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 15 psi selama 20 menit. Setelah didinginkan, media filtrat kultur digunakan untuk uji pertumbuhan *in vitro* kalus embriogenik.

Seleksi *In Vitro* Kalus Embriogenik

Kalus embriogenik ES selanjutnya ditanam pada media selektif filtrat kultur *S. rolf sii*. Sebanyak 5 eksplan kalus embriogenik, masing-masing dengan 10–12 ES/botol, ditanam dalam media selektif ras 1 (MS-P16-FK-1). Kalus embriogenik dan ES yang tahan pada media MS-P16-FK-1 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 1 (**KE-Ras-1**).

Kalus embriogenik KE-Ras-1 selanjutnya ditanam kembali pada media selektif ras 6 (MS-P16-FK-6). Kalus embriogenik KE-Ras 1 yang tahan pada media MS-P16-FK-6 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 1 dan 6 (**KE-Ras-1-6**). Kalus embriogenik yang lain ditanam dalam media selektif MS-P16-FK-6 dan dilakukan sub kultur. Kalus embriogenik dan ES yang tahan pada media MS-P16-FK-6 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 6 (**KE-Ras-6**).

Kalus embriogenik KE-Ras-1-6 selanjutnya ditanam kembali pada media selektif MS-P16-FK-8. Kalus embriogenik dan ES yang tahan pada MS-P16-FK-8 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 1, 6, dan 8 (**KE-Ras-1-6-8**). Kalus embriogenik yang lain ditanam dalam media selektif MS-P16-FK-8. Kalus embriogenik dan ES yang tahan pada MS-P16-FK-8 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 8 (**KE-Ras-8**).

Kalus embriogenik KE-Ras-1-6-8 selanjutnya ditanam kembali pada media selektif MS-P16-FK-9. Kalus embriogenik dan ES yang tahan pada MS-P16-FK-9 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolf sii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 1, 6, 8, dan 9 (**KE-Ras-1-6-8-9**). Kalus embriogenik yang lain ditanam dalam media selektif MS-P16-FK-9. Kalus embriogenik dan SE yang tahan pada

MS-P16-FK-9 diproliferasi dalam media MS-P16 tanpa filtrat kultur *S. rolfii* dan disebut sebagai populasi kalus embriogenik yang tahan filtrat kultur ras 9 (**KE-Ras-9**) (Tabel 1).

Tabel 1. Kode populasi kalus embriogenik yang tahan pada media selektif.

Media selektif	Populasi kalus embriogenik yang digunakan	Populasi kalus embriogenik yang dihasilkan
Filtrat kultur ras 1 (MS-P16-FK-1)	Kalus embriogenik	Tahan ras 1 (KE-Ras-1)
Filtrat kultur ras 6 (MS-P16-FK-6)	Kalus embriogenik tahan ras 1 (KE-Ras-1)	Tahan ras 1 dan 6 (KE-Ras-1-6)
Filtrat kultur ras 8 (MS-P16-FK-8)	Kalus embriogenik tahan ras 1 dan 6 (KE-Ras-1-6)	Tahan ras 6 (KE-Ras-6)
Filtrat kultur ras 9 (MS-P16-FK-9)	Kalus embriogenik tahan ras 1, 6 dan 8 (KE-Ras-1-6-8)	Tahan ras 1, 6, dan 8 (KE-Ras-1-6-8)
	Kalus embryogenik	Tahan ras 8 (KE-Ras-8)
		Tahan ras 1, 6, 8 dan 9 (KE-Ras-1-6-8-9)
		Tahan ras 9 (KE-Ras-9)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakterisasi Ras *S. rolfii*

Hasil koleksi 9 isolat cendawan *S. rolfii* yang diisolasi dari berbagai sentra kacang tanah dan inang tanaman, selanjutnya dikarakterisasi pertumbuhan koloninya pada media PDA. Hasil pengamatan morfologi miselia dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Morfologi miselia isolat *S. rolfii*.

Isolat	Warna miselia	Struktur miselia	Ukuran sklerotia	Mulai terbentuk sklerotia (hari)
1	putih	kasar	besar	14–20
2	putih	kasar	besar	14–20
3	putih	kasar	besar	14–20
4	putih	kasar	besar	14–20
5	putih	kasar	besar	14–20
6	putih	kasar	besar	14–20
7	putih	kasar	besar	14–20
8	putih	halus tipis	kecil	4–6
9	putih	halus tipis	besar	10–14

Keterangan : Isolat 1 = kacang tanah dari daerah Lombok Utara Tanjung 1; Isolat 2 = kacang tanah dari daerah Lombok Utara Tanjung 2; Isolat 3 = kacang tanah dari daerah Lombok Utara Tanjung 3; Isolat 4 = kacang tanah dari daerah Lombok Utara Tanjung 4; Isolat 5 = kacang tanah dari daerah Lombok Barat Labu Api 1; Isolat 6 = kacang tanah dari daerah Lombok Barat Labu Api 2; Isolat 7 = kacang tanah dari daerah Lombok Utara Desa Akar-Akar; Isolat 8 = tanaman hias lili bakung; Isolat 9 = tanaman hias Alekxis.

Pada Tabel 2 terlihat bahwa dari 9 kandidat isolat yang telah dikoleksi, ternyata ada 4 isolat yang diduga berbeda berdasar karakterisasi morfologi miselia dan sclerotianya, yaitu isolat 1, isolat 6, isolat 8, dan isolat 9. Perbedaan isolat tersebut diduga karena adanya rekombinan yang terjadi secara alamiah di lapangan. Individu genotipe patogen cendawan dapat berbeda dalam berbagai karakter, seperti morfologi, fisiologi dan patogenisitasnya. Sebagian besar karakter-karakter tersebut dikendalikan oleh gen-gen yang ada pada nukleus sel dan beberapa karakter lain dikendalikan oleh gen sitoplasma (Person and Ebba 1975).

Karakterisasi ras *S. rolfii* selanjutnya dilakukan dengan identifikasi *anastomosis group* berdasarkan modifikasi metode yang dikembangkan oleh Carling *et al.* (1994) dan Bains and Bisht (1995). Kegiatan ini bertujuan untuk melihat kompatibilitas miselia antar isolat. Pertumbuhan miselium antar isolat yang tidak terjadi kompatibilitas dianggap *anastomosis group* tersendiri (ras fisiologis tersendiri). Pada sembilan isolat yang diuji dilakukan pengamatan *anastomosis group*.

Pada isolat 1 dan 5 terjadi kompatibilitas sedangkan isolat 1 dan isolat 9 tidak terjadi kompatibilitas. Begitu pula isolat 5, tidak terjadi kompatibilitas dengan isolat 9. Dari 9 isolat yang diuji hanya 4 isolat yang memberikan hasil uji anastomosis yang berbeda dan dianggap mempunyai grup tersendiri, yaitu group isolat 1, 6, 8, dan isolat 9.

Untuk lebih meyakinkan perbedaan ras dilakukan uji patogenesis untuk mengetahui apakah *anastomosis group* yang diperoleh di atas memberikan perbedaan patogenesis. Perbedaan patogenesis menunjukkan masing-masing isolat berbeda ras fisiologisnya. Empat isolat yang diperoleh (isolat 1, 6, 8, dan 9) selanjutnya diinokulasi pada tanaman muda kacang tanah.

Tabel 3. Skor gejala penyakit pada tanaman karena infeksi *S. rolfii*.

Isolat	Kultivar			
	Kelinci	Lokal Bima	G250	G300
Isolat 1	5(S)	5 (S)	4 (S)	4 (S)
Isolat 6	4 (S)	4 (S)	4 (S)	5 (S)
Isolat 8	4 (S)	3 (AR)	3 (AR)	3 (AR)
Isolat 9	5 (S)	3 (AR)	3 (AR)	3 (AR)

Keterangan : Skor 0 = Tidak ada serangan; Skor 1 = mengalami nekrosis dengan luasan hingga 0.5 lingkaran batang; Skor 2 = nekrosis antara 0.5-0.75 lingkaran batang; Skor 3 = nekrosis telah melingkari batang, muncul bercak coklat yang telah meluas pada permukaan batang yang terinfeksi; Skor 4 = seperti skor 3 dan batang yang terserang mulai terkulai dan sejumlah daun mulai layu; Skor 5 = tanaman mati; S = susceptible (rentan) AR = Moderat tahan.

Pada Tabel 3 terlihat bahwa masing-masing isolat mempunyai patogenesis yang berbeda terhadap 4 kultivar kacang tanah. Perbedaan patogenesis menunjukkan perbedaan ras fisiologis dari *S. rolfii*, sehingga empat isolat tersebut disebut sebagai ras 1, ras 6, ras 8, ras 9. Cendawan *S. rolfii* ini mampu membentuk beberapa ras-ras fisiologi dan masing-masing ras berbeda patogenesisnya (Punja 1985; Benhamou and Chert 1996). Banyaknya ras-ras fisiologi, menyebabkan sulitnya mengendalikan patogen ini dengan hanya mengandalkan gen ketahanan.

Efektivitas Filtrat Kultur *S. rolfii* terhadap Pertumbuhan Embrio Somatik Kacang Tanah

Setelah diketahui kemampuan filtrat kultur menghambat pertumbuhan kecambah kacang tanah, kegiatan berikutnya adalah menentukan letal dosis filtrat kultur yang dapat menghambat pertumbuhan kalus embriogenik. Pada Tabel 4 terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi filtrat kultur pada 4 ras, semakin menghambat pertumbuhan ES kacang tanah. Penggunaan konsentrasi 35% pada ras 1 mampu menghambat pertumbuhan ES sampai 95%, terutama pada penurunan total ES. Asam oksalat merupakan fitotoksin utama yang dikeluarkan *S. rolfii* ketika menginfeksi tanaman (Punja 1985). Penggunaan filtrat kultur *S. rolfii* 30% pada seleksi in vitro dapat menghambat perkembangan ES kacang tanah \geq 95% (Yusnita *et al.* 2005). Sekresi asam oksalat dapat meningkatkan virulensi pada

cendawan *Sclerotinia sclerotiorum* (Dutton and Evans 1996). Oksalat juga dapat secara langsung menjadi toksin pada tanaman inang, karena keasaman dapat menyebabkan tanaman menjadi lemah (Noyes and Hancock 1981). Berdasarkan hasil penelitian ini maka konsentrasi filtrat kultur 35% dapat digunakan sebagai agens penyeleksi untuk seleksi in vitro kalus embriogenik kacang tanah.

Tabel 4. Pertumbuhan ES kacang tanah pada berbagai ras *S. rolf sii*.

Pertumbuhan ES	Kontrol (0%)	Ras <i>S. rolf sii</i> / Konsentrasi Filtrat Kultur = FK (%)											
		1			8			6			9		
		25	30	35	25	30	35	25	30	35	25	30	35
Jumlah eksplan hidup (%)	100	65	46	37	78	54	36	60	40	34	75	45	30
Eksplan yang membentuk ES (%)	100	54	45	25	65	43	35,8	60	45,5	24,5	62,5	34,5	25,5
Jumlah ES/eksplan	13	5	3,2	2,1	6	3,4	3,0	4,5	3	3	6,5	4	3,6
PP total ES*	0	72,5	84	96,5	75,5	85,8	87,8	74,5	87,8	93,5	76,5	85,4	90,4

*) Persentase penurunan (PP) total ES dihitung dengan persamaan $PP = [(X_0 - X_t) / X_0] * 100\%$. X_0 adalah total ES pada media tanpa seleksi dan X_t – total ES dalam media dengan penambahan agens penyeleksi (FK %).

Seleksi in Vitro Kalus Embriogenik

Upaya untuk meningkatkan ketahanan tanaman kacang tanah terhadap penyakit busuk batang dari berbagai ras *S. rolf sii* dapat dilakukan dengan seleksi in vitro pada filtrat kultur yang berasal dari berbagai ras *S. rolf sii*. Populasi kalus embriogenik hasil seleksi in vitro dievaluasi kembali ketahanannya terhadap media selektif yang mengandung filtrat kultur berbagai ras. Ketahanan populasi kalus embriogenik ditentukan dengan mengamati respons kalus embriogenik terhadap cekaman filtrat kultur berbagai *S. rolf sii* 35%.

Pada Tabel 5 dan Tabel 6 terlihat bahwa persentase jumlah kalus embriogenik yang hidup dan jumlah ES per eksplan ditentukan oleh asal kalus embriogenik diseleksi. Kalus embriogenik yang berasal dari hasil seleksi ras 1 cenderung lebih tahan pada media filtrat kultur ras 1 (MS-P16-FK-1) dan lebih rentan pada media seleksi yang lain. Kalus embriogenik hasil seleksi pada filtrat kultur ras 1, 6, 8, 9 lebih tahan dibanding kalus embriogenik hasil seleksi yang lain ketika dievaluasi kembali pada media seleksi filtrat kultur ras 1, 6, 8, 9. Hal ini terjadi karena hasil seleksi in vitro menyebabkan terjadinya akumulasi sel/jaringan mutan yang toleran terhadap cekaman filtrat kultur *S. rolf sii*. Sel/jaringan varian yang tahan selama periode seleksi akan mengalami proliferasi sehingga akan diperoleh kalus embriogenik dalam jumlah yang banyak. Menurut Yusnita *et al.* (2005) kalus embriogenik insensitif terhadap filtrat kultur *S. rolf sii* mampu melakukan mekanisme detoksifikasi terhadap asam oksalat. Embrio somatik anggur dapat toleran pada media selektif yang mengandung filtrat kultur *Elsinoe ampelina* karena adanya induksi enzim detoksifikasi selama seleksi in vitro (Kuksova *et al.* 1997). Kalus embriogenik yang tahan selanjutnya diregenerasikan menjadi planlet dan diuji ketahanan pada 4 ras *S. rolf sii* pada percobaan berikutnya.

Ada kecenderungan bahwa kalus embriogenik yang diseleksi pada media seleksi lebih dari satu ras menghasilkan jumlah kalus embriogenik yang hidup dan jumlah ES per eksplan yang lebih sedikit dibanding hasil seleksi pada media filtrat kultur satu ras. Ini membuktikan bahwa mutan yang muncul bersifat poligenik dan peran gen tersebut bersifat minor dibanding mutan gen tunggal dengan peran gen mayor (Robinson 1987).

Tabel 5. Jumlah eksplan hidup dari berbagai populasi kalus embriogenik kacang tanah pada media filtrat kultur *S. rolfsii*.

Populasi kalus embriogenik	Jumlah eksplan hidup (%)			
	Media MS-P16-FK-1	Media MS-P16-FK-6	Media MS-P16-FK-8	Media MS-P16-FK-9
KE-Ras-1	88,6	15,4	18,0	12,4
KE-Ras-1-6	75,5	69,7	10,5	12,0
KE-Ras-6	14,5	89,6	12,3	11,0
KE-Ras-1-6-8	65,6	68,0	58,8	14,3
KE-Ras-8	13,2	9,8	85,6	10,4
KE-Ras-1-6-8-9	58,5	60,6	60,0	57,6
KE-Ras-9	14,5	12,0	12,4	87,8
KE (kontrol=tanpa seleksi)	3,5	4,5	2,4	3,0

Tabel 6. Jumlah ES per eksplan dari berbagai populasi kalus embriogenik kacang tanah pada media filtrat kultur *S. rolfsii*.

Populasi kalus embriogenik	Jumlah ES per eksplan			
	Media MS-P16-FK-1	Media MS-P16-FK-6	Media MS-P16-FK-8	Media MS-P16-FK-9
KE-Ras-1	12,8	2,3	3,0	4,3
KE-Ras-1-6	8,4	8,2	2,4	3,0
KE-Ras-6	2,0	13,5	3,0	2,5
KE-Ras-1-6-8	7,5	7,0	6,4	2,0
KE-Ras-8	3,2	3,0	14,2	3,2
KE-Ras-1-6-8-9	6,7	7,5	7,5	8,0
KE-Ras-9	3,2	2,5	2,5	14,0
KE (kontrol=tanpa seleksi)	2,0	2,2	2,2	2,6

KESIMPULAN

- Empat ras yang telah diidentifikasi mempunyai patogenesis yang berbeda dan masing-masing mempunyai anastomosis group yang berbeda antara satu dengan yang lain.
- Konsentrasi filtrat kultur 35% merupakan konsentrasi sub letal $\geq 95\%$ yang mempunyai daya hambat pertumbuhan embrio somatik yang lebih tinggi dan selanjutnya dapat digunakan sebagai selective agent untuk mengidentifikasi kalus embriogenik yang tahan terhadap empat ras *S. rolfsii*.
- Kalus embriogenik yang diseleksi pada media seleksi lebih dari satu ras menghasilkan jumlah ES yang hidup dan jumlah ES per eksplan yang lebih sedikit dibanding hasil seleksi pada media filtrat kultur satu ras. Secara keseluruhan, ES tersebut lebih tahan pada berbagai ras dibanding ES yang hanya diseleksi pada satu ras *S. rolfsii*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini terlaksana atas biaya dari Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi RI melalui skim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi dana Penelitian Desentralisasi Unram Tahun Anggaran 2015.

DAFTAR PUSTAKA

- Backman, P.A., Breneman T.B. 1997. Stem-rot. In Burelle N.K., Porter D.M., Kabana R.R., Smith D.H., Subrahmanyam P., (Ed.). Compendium of Peanut Disease. Am. Phytopath. Soc., St. Paul, MN.
- Bains, P.S. and Bisht V.S. 1995. Anastomosis group identity and virulence of *Rhizoctonia solani* isolates collected from potato plants in Alberta, Canada. *Plant Dis.* 79: 241–242.
- Benhamou, N. and Chert I. 1996. Parasitism of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum*: ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction. *Phytopath.* 86:405–416.
- Carling D.E, Rothrock C.S., MacNish G.C., Sweetingham M.W., Brainard K.A., and Winters S.W. 1994. Characterization of anastomosis group 11 (AG-11) of *Rhizoctonia solani*. *Ecology and Epidemiology* 84: 1357–1393.
- Dutton MV and Evans CS. 1996. Oxalate production by fungi its role in pathogenicity and ecology in the soil environment. *Can. J. Microbiol.* 42: 881–895.
- Gamborg OL, Miller RA, and Ojima K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50:151–158.
- Hemon AF, Ujianto L, dan Sudarsono. 2006. Seleksi berulang dan identifikasi embrio somatik kacang tanah yang insensitif polietilena glikol (PEG) dan filtrat kultur *Sclerotium rolfsii*. *Agroteksos* 16:21–32.
- Hemon AF. 2009. Penggunaan variasi somaklonal dan seleksi in vitro untuk mendapatkan plasma nutfah tanaman tahan terhadap penyakit. Seminar Nasional dan Pameran Hasil-hasil Penelitian. Dies Natalis Universitas Mataram ke-47. Lembaga Penelitian Universitas Mataram, Mataram 29–30 September 2009.
- Jain SM. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153–156.
- Karp A. 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.
- Kuksova VB, Piven NM, and Gleba YY. 1997. Somaclonal variation and in vitro induced mutagenesis in grapevine. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 49:17–27.
- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, and Teixeira JB. 1995. Race I fusarium wilt tolerance on banana plants selected by fusaric acid. *Euphytica* 84:67–71.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised media for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15:473–493.
- Noyes RD and Hancock JG. 1981. Role of oxalic acid in the sclerotinia wilts of sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 18:123–132.
- Person C and Ebba T. 1975. Genetics of fungal pathogens. *Genetics, Suppl* 79, 397–408
- Punja ZK. 1985. The biology, ecology, and control of *Sclerotia rolfsii*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 23:124–135.
- Robinson RA. 1987. Host management in crop pathosystems. Macmillan Publishing Company, New York. 262 p.
- Yusnita dan Sudarsono. 2004. Metode inokulasi dan respons ketahanan 30 genotipe kacang tanah terhadap penyakit busuk batang akibat infeksi *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Hayati* 11:53–58.
- Yusnita, Widodo, dan Sudarsono. 2005. In vitro selection of peanut somatic embryos on mediun containing cultur filtrate of *Sclerotium rolfsii* and plantlet regeneration. *Hayati* 12:50–56.