

## Asap Cair Sebagai Pemacu Pertumbuhan dan Ketahanan Tanaman Pisang terhadap *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*

### Wood Vinegar as Plant Growth and Defense Inducer of Banana Plants against *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis*

Muhammad Evan Nurrahmawan<sup>1</sup>, Giyanto<sup>1\*</sup>, Abdjad Asih Nawangsih<sup>1</sup>, Erina Sulistiani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

<sup>2</sup>Southeast Asian Regional Centre for Tropical Biology, Bogor 16141

#### ABSTRAK

Bibit pisang hasil kultur jaringan diketahui rentan terhadap cekaman pada awal pertumbuhan di lapangan. Pra-pengondisian bibit menggunakan agens *priming* dilaporkan meningkatkan pertumbuhan dan ketahanan tanaman. Asap cair tempurung kelapa dilaporkan mampu memacu pertumbuhan dan menginduksi ketahanan tanaman. Penelitian ini bertujuan mendapatkan informasi pengaruh asap cair asal tempurung kelapa terhadap pertumbuhan dan aktivitas enzim ketahanan pada *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran serta penekanan *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*. Tahapan penelitian mencakup uji fitotoksisitas asap cair, analisis pertumbuhan *plantlet*, analisis aktivitas enzim peroksidase dan polifenol oksidase, isolasi *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, dan uji toksisitas asap cair terhadap *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan perlakuan asap cair pada konsentrasi  $\geq 1.5\%$  bersifat fitotoksik dengan gejala meliputi klorosis, nekrosis, terbentuk lendir dan kematian *plantlet*. Perlakuan asap cair pada konsentrasi  $\leq 1\%$  tidak bersifat fitotoksik, bahkan peningkatan pertumbuhan *plantlet* optimum ditunjukkan pada perlakuan asap cair 0.1%. Perlakuan asap cair menyebabkan peningkatan aktivitas enzim ketahanan pada 2, 4 dan 6 hari setelah tanam (HST), tetapi menurun pada 30 HST. Selain itu, asap cair bersifat antibakteri melalui terbentuknya zona hambat dan menyebabkan penurunan nilai kerapatan sel *R. syzygii* subsp. *celebesensis*. Penelitian ini menunjukkan potensi teknik *priming* untuk pengendalian penyakit darah pisang terutama pada bibit pisang hasil kultur jaringan.

Kata kunci: asam *pyroligneous*, penyakit darah pisang, peroksidase, polifenol oksidase, *priming*

#### ABSTRACT

Banana seedlings derived from tissue culture are known to be susceptible to stress at early growing stage in the field. Pre-conditioning of seedlings using priming agents, such as coconut shell wood vinegar was reported to enhance plant growth and resistance. This study aimed to obtain information on the effect of coconut shell wood vinegar on growth and defense-related enzymes activity of Cavendish banana plantlet in the root induction phase and suppression of *R. syzygii* subsp. *celebesensis* in vitro. Research was conducted involving evaluation of wood vinegar phytotoxicity, analysis of plantlet growth, analysis of peroxidase and polyphenol oxidase activities, isolation of *R. syzygii* subsp. *celebesensis*, and toxicity assay of wood vinegar against *R. syzygii* subsp. *celebesensis* in vitro. Application of wood vinegar at 1.5% concentration was phytotoxic, indicated by symptom development including chlorosis, necrosis, mucus secretion and plantlet death. Lower concentration of wood vinegar, i.e.  $\leq 1.0\%$  was

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680.  
Tel: 0251-8629354, Faks: 0251-8629362; Surel: giyanto@apps.ipb.ac.id

not phytotoxic; even the treatment of wood vinegar at 0.1% caused an optimum increase in plantlet growth. Application of wood vinegar also increased the activity of defense-related enzymes at 2, 4, and 6 days after planting (DAP) but decreased at 30 DAP. Furthermore, wood vinegar showed antibacterial properties through the formation of inhibition zones and it caused decreased in the value of *R. syzygii* subsp. *celebesensis* cell densities. This study shows the potential of priming techniques for controlling banana blood disease, especially for banana seedlings propagated through tissue culture.

Keywords: banana blood disease, peroxidase, polyphenol oxidase, priming, pyroligneous acid

## PENDAHULUAN

Pisang Cavendish (*Musa acuminata* Colla) dilaporkan rentan terhadap penyakit darah yang disebabkan oleh bakteri *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* (Safni *et al.* 2014). Insidensi penyakit darah dilaporkan mencapai 100% di Nanggroe Aceh Darussalam (Sahetapy *et al.* 2015) dan kehilangan hasil mencapai 64% pada tahun 1997 di Lampung (Cahyaniati *et al.* 1997). Pengelolaan penyakit darah yang telah dilakukan meliputi penggunaan varietas tahan dan bibit bebas patogen (Supriadi 2005), sanitasi peralatan (Safni *et al.* 2018), pemangkasan bunga jantan (Hermanto *et al.* 2013), pemusnahan tanaman terinfeksi secara *in situ*, pembungkusan tandan buah, panen buah dengan memotong batang semu (Drenth *et al.* 2020), aplikasi bakteri *Bacillus* sp. (Abidin 2018), aplikasi bakteri EAL15 dan EK22 (Marwan *et al.* 2020), dan aplikasi asap cair (Aisyah *et al.* 2018b).

Bibit pisang hasil kultur jaringan banyak digunakan oleh perkebunan komersil karena karakternya seragam dan bebas patogen (Bednarek dan Orłowska 2019). Akan tetapi, bibit ini memiliki kekurangan yakni (1) ketahanan bibit terhadap cekaman di lapangan rendah, (2) keragaman genetik bibit rendah, (3) penggunaan bahan kimia sintetik berlebihan selama produksi, dan (4) eliminasi mikroba menguntungkan pada bibit akibat perlakuan aseptik. Ketahanan bibit hasil kultur jaringan pada awal pertumbuhan di lapangan sangat menentukan keberhasilan budi daya pisang komersil. Salah satu solusi menjanjikan ialah *priming* ketahanan tanaman.

*Priming* ialah pengondisian sel atau organisme agar lebih cepat dan kuat dalam mengaktifkan respons ketahanan terhadap

cekaman yang akan datang (Conrath 2009). *Priming* dapat diinduksi oleh agens kimia ( $\beta$ -aminobutyric acid, asam salisilat, asam piperolik, dan asam jasmonat), patogen (bakteri, cendawan, virus), mikroba menguntungkan, dan serangga herbivora (Hilker *et al.* 2016). Kelebihan *priming* ialah meningkatkan efisiensi dalam proteksi tanaman sekaligus meningkatkan pertumbuhan dan produksi tanaman (van Hulten *et al.* 2006).

Salah satu agens *priming* yang berpotensi digunakan ialah asap cair tempurung kelapa. Asap cair (AC) adalah produk samping dari pirolisis biomassa tumbuhan yang telah melalui kondensasi (Cheng *et al.* 2021). Aisyah *et al.* (2018b) melaporkan aplikasi AC tempurung kelapa 0.5% dapat memacu pertumbuhan, meningkatkan aktivitas enzim ketahanan, dan menekan insidensi penyakit darah pada bibit pisang kepok. Aplikasi AC tempurung kelapa juga dilaporkan menekan infeksi penyakit bercak daun *Cercospora* sp. pada padi gogo (Ahadiyat *et al.* 2020).

Penelitian dilakukan untuk mempelajari pengaruh perlakuan AC tempurung kelapa terhadap pertumbuhan dan aktivitas enzim ketahanan pada *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran serta penekanan terhadap *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*.

## BAHAN DAN METODE

### Penyediaan *Plantlet* Pisang

*Plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran berasal dari Laboratorium Kultur Jaringan, Southeast Asian Regional Centre of Tropical Biology (SEAMEO BIOTROP), Bogor. *Plantlet* dipilih berdasarkan morfologi yang seragam yakni memiliki tiga daun, telah

melalui fase multiplikasi, tidak terkontaminasi dan tidak mengalami *browning*.

### Penyediaan Asap Cair

Asap cair yang digunakan berbahan dasar tempurung kelapa diproduksi oleh Koperasi Wana Dewi Sri, Cianjur (no. reg. TDI:503/6531/05:23/TGI/BPPTPM/2013). Spesifikasi asap cairnya ialah *Grade 3* yang merupakan hasil pirolisis pada suhu 300 °C.

### Uji Fitotoksisitas Asap Cair

Pengujian bertujuan menentukan kisaran konsentrasi AC nonfitotoksik. Uji disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan tiga ulangan dan unit percobaan terdiri atas lima *plantlet* setiap perlakuan. Terdapat 11 perlakuan konsentrasi AC yang diuji dengan cara menambahkan larutan AC (v/v) ke dalam medium induksi perakaran (IP): 0.0%; 0.5%; 1.0%; 1.5%; 2.0%; 2.5%; 3.0%; 3.5%; 4.0%; 4.5%; dan 5.0%. Medium IP terdiri atas medium MS (Murashige dan Skoog 1962) tanpa zat pengatur tumbuh, setengah hara makro, dan 2 g L<sup>-1</sup> arang aktif (Sulistiani dan Yani 2012). Medium IP tanpa perlakuan AC digunakan sebagai kontrol.

Tahap selanjutnya, *plantlet* diinkubasi pada suhu 25 °C, diberi perlakuan penyinaran terang:gelap 18:6 jam selama 30 hari. Pengamatan dilakukan pada 30 HST, meliputi waktu muncul gejala fitotoksik, jumlah *plantlet* yang mengalami fitotoksik, pertambahan tinggi *plantlet* (cm), dan panjang akar (cm). Gejala fitotoksik ditandai dengan klorosis dan nekrosis. *Plantlet* fitotoksik dihitung berdasarkan Sriamornsak *et al.* (2014), yaitu:

*Plantlet* fitotoksik (%) =  $\frac{A}{B} \times 100\%$ , dengan

A, jumlah *plantlet* bergejala fitotoksik pada perlakuan yang sama; dan B, total jumlah *plantlet* yang digunakan pada perlakuan yang sama.

### Pengaruh Asap Cair terhadap Pertumbuhan *Plantlet*

Uji ini disusun dalam RAL dengan tiga ulangan dan unit percobaan terdiri atas

lima *plantlet* setiap perlakuan. Konsentrasi AC nonfitotoksik yang digunakan ialah 0.0%; 0.1%; 0.3%; 0.5%; 0.7%; 0.9%; dan 1.0% (v/v) dalam medium IP. *Plantlet* diinkubasi pada suhu 25 °C dengan penyinaran terang:gelap 18:6 jam selama 30 hari. Medium IP tanpa perlakuan AC digunakan sebagai kontrol.

Peubah yang diamati yakni pertambahan tinggi *plantlet* (cm), panjang akar (cm), jumlah daun, jumlah akar, bobot basah total (g) dan bobot kering total (g). Seluruh peubah diamati pada 30 HST.

### Pengaruh Asap Cair terhadap Aktivitas Enzim Ketahanan

*Plantlet* yang telah diberi perlakuan AC nonfitotoksik digunakan dalam analisis aktivitas enzim. Analisis ini disusun dalam RAL dengan tiga ulangan. Aktivitas enzim yang diamati yakni peroksidase (POD) dan polifenol oksidase (PPO). Analisis dilakukan pada 2, 4, 6, dan 30 HST. Sampel uji ialah daun komposit dari seluruh *plantlet* pada setiap perlakuan.

Ekstraksi dan analisis enzim dilakukan berdasarkan metode Zheng dan van Huystee (1992) dan Cho dan Ahn (1999). Sebanyak 0.25 g sampel komposit dihomogenkan dengan 1.5 mL *potassium phosphate buffer* (PPB) 100 mM pH 6.5. Selanjutnya suspensi disentrifugasi pada 10 000 rpm selama 20 menit pada suhu 4 °C. Supernatan dijadikan ekstrak kasar untuk analisis aktivitas enzim. Aktivitas POD dilakukan dengan mencampur 1 mL ekstrak enzim ke dalam 1.7 mL PPB (100 mM, pH 6.5); 0.1 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3%); dan 0.1 mL *guaiacol* (0.2%). Campuran reaksi diukur nilai absorbansi pada 470 nm setiap 20 detik selama 2 menit. Analisis aktivitas PPO dilakukan dengan mencampur 1 mL ekstrak enzim ke dalam 0.9 mL PPB (100 mM, pH 6.5) dan 1 mL *catechol* (50 mM). Campuran reaksi diukur nilai absorbansi pada 420 nm setiap 5 detik selama 1 menit. Nilai absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer (*Spectronic 20D+*). Sampel blanko terdiri atas campuran reaksi yang sama tanpa penambahan ekstrak kasar enzim.



Gambar 1 Penampang melintang buah pisang ambon yang terinfeksi *R. syzygii* subsp. *celebesensis* penyebab penyakit darah dengan gejala berupa garis berwarna merah kecokelatan pada bagian mesokarp (panah merah).

### Isolasi *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

Bakteri *R. syzygii* subsp. *celebesensis* diisolasi dari buah pisang ambon bergejala penyakit darah yakni garis berwarna merah kecokelatan pada bagian mesokarp (Gambar 1). Buah diperoleh dari tempat pengepul pisang di Ciawi, Bogor (6°41'00.5"S 106°52'21.8"E). Permukaan kulit buah disterilkan permukaannya, kemudian daging buah disuspensikan dalam larutan dH<sub>2</sub>O steril. Suspensi diencerkan berseri, disebarkan pada medium 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TZC), dan diinkubasi selama 3–4 hari pada suhu ruang. Koloni yang tumbuh diseleksi sesuai karakteristik *R. syzygii* subsp. *celebesensis* pada medium TZC (Drenth *et al.* 2020) dan disimpan sebagai galur murni.

Deteksi molekuler galur murni menggunakan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Ekstraksi DNA total bakteri mengikuti metode Ahmed dan Dablood (2017). Amplifikasi DNA dan program PCR mengikuti metode Aisyah *et al.* (2018a) menggunakan primer spesifik 121F (5'-CGT ATT GGA TGC CGT AAT GGA-3') dan 121R (5'-AAG TTC ATT GGT GCC GAA TCA-3') berukuran 317 pb (Hadiwiyono 2011). Amplikon DNA bakteri dielektroforesis dalam gel agarosa 1% pada tegangan 100 V selama 50 menit. Pita DNA dalam gel yang telah ditambahkan pewarna Fluorovue (SMOBIO) divisualisasi menggunakan *Transluminator* UV.

### Uji Toksisitas Asap Cair terhadap *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*

Pengujian dilakukan melalui metode difusi cakram dan pengukuran nilai kerapatan sel bakteri berdasarkan Cappuccino dan Sherman (2014). Pengujian disusun menggunakan RAL dengan tiga ulangan. Galur bakteri *R. syzygii* subsp. *celebesensis* sebanyak 100 µL dengan kerapatan 10<sup>8</sup> cfu mL<sup>-1</sup> disebar pada medium agar Mueller-Hinton. Selanjutnya, setiap cakram kertas saring (diameter 6 mm) direndam dalam larutan AC nonfitotoksik (v/v) selama 30 detik kemudian diletakkan di atas medium. Kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang hingga muncul zona hambat. Cakram kertas saring yang hanya ditambahkan dH<sub>2</sub>O steril digunakan sebagai kontrol.

Kerapatan sel bakteri diukur menggunakan spektrofotometer. Galur bakteri *R. syzygii* subsp. *celebesensis* sebanyak satu koloni dimasukkan ke dalam tabung reaksi secara terpisah berisi 3 mL medium *Luria Broth* yang telah ditambahkan perlakuan AC nonfitotoksik (v/v). Kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang. Setelah itu, kerapatan sel diukur nilai absorbansi pada panjang gelombang A600 nm. Tabung hanya berisi medium *Luria Broth* digunakan sebagai kontrol.

### Analisis Data

Seluruh data dianalisis menggunakan uji analisis varian (ANOVA) satu arah. Perlakuan yang berpengaruh secara nyata dianalisis lanjut dengan uji Tukey pada taraf 5%.

## HASIL

### Fitotoksisitas Asap Cair

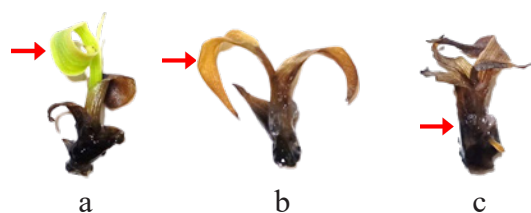
Asap cair dengan konsentrasi  $\geq 1.5\%$  menimbulkan gejala fitotoksik pada *plantlet*, juga menghambat pertumbuhan tinggi *plantlet* dan panjang akar (Tabel 1). Gejala klorosis muncul pada 9 hingga 12 HST, kemudian menjadi nekrosis, dan akhirnya *plantlet* mati berwarna coklat-kehitaman disertai lendir pada 30 HST (Gambar 2). Sebaliknya, perlakuan AC  $\leq 1.0\%$  tidak menimbulkan



Tabel 1 Rerata waktu muncul gejala fitotoksik, *plantlet* fitotoksik, penambahan tinggi *plantlet*, dan panjang akar pada *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran setelah diberi perlakuan asap cair

Asap cair (%)	Muncul gejala fitotoksik (HST)	<i>Plantlet</i> fitotoksik (%)	Pertambahan tinggi <i>plantlet</i> (cm)	Panjang akar (cm)
0.0	-	0.0 ± 0.00 d	0.66 ± 0.10 ab	7.45 ± 1.05 a
0.5	-	0.0 ± 0.00 d	1.02 ± 0.44 a	6.59 ± 0.92 a
1.0	-	0.0 ± 0.00 d	0.49 ± 0.09 bc	3.77 ± 1.51 b
1.5	12.0 ± 0.40 a	33.3 ± 11.55 cd	0.24 ± 0.093 c	0.36 ± 0.15 c
2.0	11.4 ± 0.20 ab	53.3 ± 30.60 bc	0.22 ± 0.097 c	0.29 ± 0.08 c
2.5	10.7 ± 0.12 bc	73.3 ± 11.55 abc	0.16 ± 0.03 c	0.15 ± 0.03 c
3.0	10.5 ± 0.31 cd	73.3 ± 23.10 abc	0.16 ± 0.02 c	0.10 ± 0.03 c
3.5	10.0 ± 0.12 cde	80.0 ± 20.00 ab	0.13 ± 0.006 c	0.07 ± 0.01 c
4.0	9.8 ± 0.40 def	86.7 ± 11.55 ab	0.14 ± 0.05 c	0.05 ± 0.11 c
4.5	9.3 ± 0.12 ef	93.3 ± 11.55 ab	0.13 ± 0.02 c	0.02 ± 0.004 c
5.0	9.0 ± 0.40 f	100.0 ± 0.00 a	0.14 ± 0.03 c	0.01 ± 0.004 c

Nilai adalah rata-rata dari tiga ulangan diikuti standar deviasi. Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji lanjut Tukey.



Gambar 2 Gejala fitotoksik pada *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran setelah perlakuan asap cair. a, Daun mengalami klorosis; b, Nekrosis; dan c, Seluruh jaringan *plantlet* mati berwarna coklat-kehitaman disertai lendir.

gejala fitotoksik hingga akhir pengamatan (Tabel 1). Oleh karena itu, AC ≤ 1.0% digunakan untuk uji lanjutan.

#### Asap Cair pada Pertumbuhan *Plantlet*

Perlakuan AC 0.1% meningkatkan penambahan tinggi *plantlet* sebesar 249% (Tabel 2). Perlakuan AC tidak menyebabkan perbedaan terhadap panjang akar, jumlah daun, dan jumlah akar. Sementara itu, hasil pengamatan bobot basah total dan bobot kering total menunjukkan peningkatan berbeda nyata pada perlakuan AC 0.1% dan 0.3%. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi AC yang digunakan, semakin rendah tingkat pertumbuhan *plantlet*

pisang Cavendish pada fase induksi perakaran (Gambar 3).

#### Pengaruh Asap Cair terhadap Aktivitas Enzim Ketahanan

Seluruh perlakuan AC menunjukkan peningkatan aktivitas POD dan PPO, kecuali perlakuan AC 1.0% yang menunjukkan penurunan pada 30 HST. Aktivitas POD dan PPO meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi AC dan hari setelah tanam hingga mencapai puncak aktivitas enzim kemudian menurun. Perlakuan AC 0.1% dan AC 0.3% meningkatkan aktivitas POD dari 2 HST hingga 6 HST, kemudian menurun pada 30 HST (Tabel 3). Sebaliknya, aktivitas PPO pada perlakuan AC 0.1% dan 0.3% mengalami peningkatan dari 2 HST hingga 4 HST kemudian menurun pada 6 HST hingga 30 HST (Tabel 4).

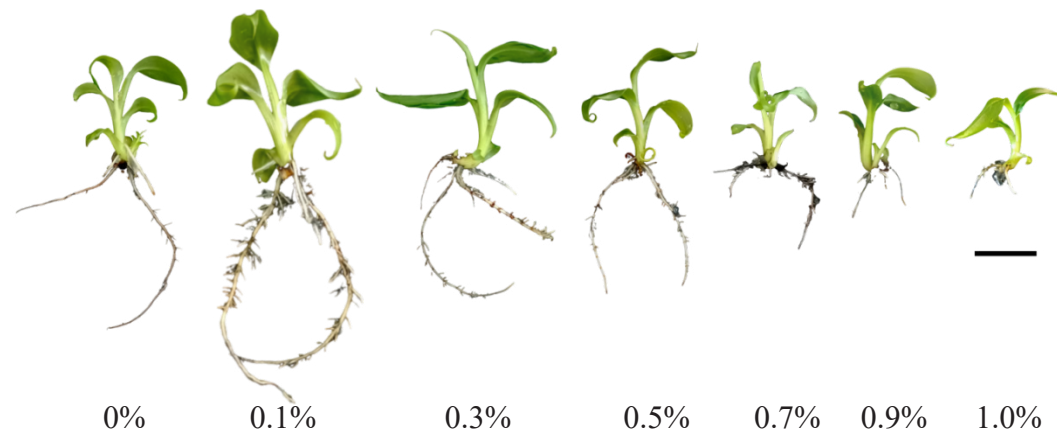
#### Karakteristik *R. syzygii* subsp. *celebesensis*

Morfologi galur bakteri pada medium TZC memiliki karakteristik isolat *R. syzygii* subsp. *celebesensis* yaitu Gram negatif, koloni berbentuk bulat, berwarna putih susu dengan lingkaran merah-gelap di tengah, berdiameter 0.5–2 mm, tepian rata, elevasi cembung, permukaan licin, dan cenderung lengket pada

Tabel 2 Respons pertumbuhan *plantlet* pisang Cavendish pada berbagai konsentrasi asap cair pada pengamatan 30 HST

Asap cair (%)	Pertambahan tinggi <i>plantlet</i> (cm)	Panjang akar (cm)	Jumlah daun	Jumlah akar	Bobot basah total (g)	Bobot kering total (g)
0.0	0.43 ± 0.04 d	7.08 ± 0.43 ab	7.30 ± 0.48 ab	7.45 ± 0.75 ab	0.88 ± 0.04 bcd	0.036 ± 0.005 bc
0.1	1.49 ± 0.12 a	8.74 ± 1.80 a	9.39 ± 1.28 a	9.79 ± 2.52 a	1.37 ± 0.09 a	0.061 ± 0.010 a
0.3	0.95 ± 0.11 b	6.60 ± 1.72 ab	8.97 ± 1.72 a	9.31 ± 3.36 a	1.27 ± 0.03 a	0.057 ± 0.001 a
0.5	0.86 ± 0.19 bcd	6.04 ± 0.91 ab	8.36 ± 0.59 a	8.28 ± 0.26 ab	1.10 ± 0.06 abc	0.049 ± 0.005 ab
0.7	0.88 ± 0.24 bcd	5.32 ± 1.28 ab	7.86 ± 0.84 ab	7.87 ± 0.80 ab	0.88 ± 0.21 cd	0.042 ± 0.003 abc
0.9	0.85 ± 0.08 bcd	5.09 ± 1.59 ab	7.69 ± 0.89 ab	6.10 ± 1.94 ab	0.63 ± 0.27 d	0.031 ± 0.010 bc
1.0	0.45 ± 0.21 cd	3.77 ± 1.51 b	5.60 ± 0.15 b	3.79 ± 0.98 b	0.63 ± 0.06 d	0.028 ± 0.006 c

Nilai adalah rata-rata dari tiga ulangan diikuti standar deviasi. Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji lanjut Tukey.



Gambar 3 Pengamatan *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran pada 30 hari setelah perlakuan berbagai konsentrasi asap cair. Skala batang = 2.5 cm.

Tabel 3 Peningkatan aktivitas peroksidase (POD) pada *plantlet* pisang Cavendish pada berbagai konsentrasi asap cair

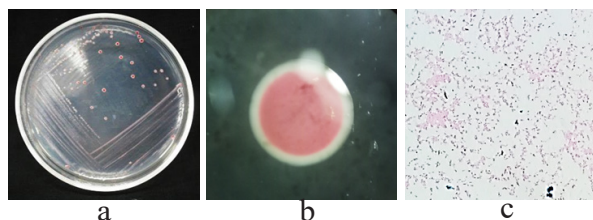
Asap cair (%)	Peningkatan aktivitas peroksidase (%)			
	2 HST	4 HST	6 HST	30 HST
0.1	11.14 e	14.79 d	15.29 d	10.10 de
0.3	15.96 de	17.66 cd	18.24 cd	13.46 cd
0.5	17.77 cd	19.46 cd	22.06 bc	20.43 c
0.7	21.08 bc	21.86 bc	24.71 abc	34.38 b
0.9	24.40 ab	25.75 ab	27.65 ab	57.40 a
1.0	28.01 a	28.14 a	28.82 a	-13.70 f

Aktivitas adalah peningkatan terhadap kontrol. Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji lanjut Tukey.

Tabel 4 Peningkatan aktivitas polifenol oksidase (PPO) pada *plantlet* pisang Cavendish pada berbagai konsentrasi asap cair

Perlakuan (%)	Peningkatan aktivitas polifenol oksidase (%)			
	2 HST	4 HST	6 HST	30 HST
0.1	48.00 a	61.54 b	49.06c	33.80 d
0.3	56.00 a	57.69 b	54.72c	45.07 cd
0.5	60.00 a	69.23 b	73.58bc	69.01 bc
0.7	60.00 a	84.62 ab	115.09ab	97.18 ab
0.9	72.00 a	92.31 ab	139.62a	111.27 a
1.0	76.00 a	134.62 a	156.60a	-28.17 e

Aktivitas adalah peningkatan terhadap kontrol. Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji lanjut Tukey.



Gambar 4 Karakteristik *R. syzygii* subsp. *celebesensis* pada medium TZC. A, biakan murni; b, koloni murni; dan c, hasil pewarnaan termasuk Gram negatif.

medium (Gambar 4). Visualisasi amplicon DNA galur bakteri menggunakan primer spesifik 121F/121R berhasil menunjukkan pita DNA berukuran 317 pb (Gambar 5).

#### Toksisitas Asap Cair terhadap *R. syzygii* subsp. *celebesensis* *in vitro*

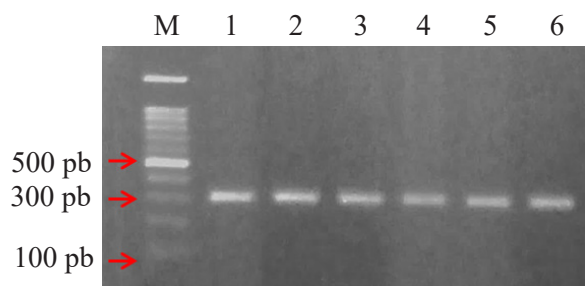
Perlakuan AC menunjukkan penghambatan pertumbuhan *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*. Zona hambat mulai terbentuk pada perlakuan AC 0.1% (Gambar 6) dan

terus meningkat seiring dengan tingginya konsentrasi perlakuan AC (Tabel 5). Perlakuan AC 0.1% juga menunjukkan penurunan nilai kerapatan sel *R. syzygii* subsp. *celebesensis* tidak berbeda nyata dan terus menurun seiring dengan tingginya konsentrasi perlakuan AC (Tabel 5).

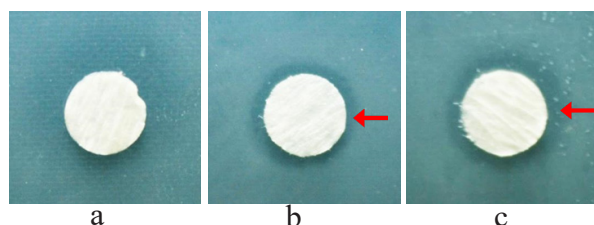
#### PEMBAHASAN

Penyakit darah adalah penyakit endemik yang sulit dikendalikan karena patogen bersifat endofit dan saprofit fakultatif serta mampu menginfeksi hampir seluruh varietas pisang lokal di Indonesia (Supriadi 2005). Pengelolaan penyakit darah yang sesuai untuk diterapkan adalah melalui pengondisian secara fisiologis bibit atau *plantlet* melalui *priming* sebelum penanaman di lapangan.

Dalam penelitian ini, perlakuan AC  $\leq 1.0\%$  tidak bersifat fitotoksik sedangkan AC  $\geq 1.5\%$  bersifat fitotoksik dan menghambat pertumbuhan *plantlet*. Hasil ini sejalan dengan



Gambar 5 Visualisasi fragmen DNA galur bakteri hasil amplifikasi dengan primer spesifik 121F/121R pada gel agarosa 1% dengan buffer TAE 1X. (M) ExcelBand™ 100 bp DNA Ladder (SMOBIO); (1-6) amplicon DNA galur bakteri.



Gambar 6 Penghambatan pertumbuhan *R. solygyii* subsp. *celebesensis* oleh AC tempurung kelapa. a, kontrol tanpa penambahan AC; b, perlakuan AC 0.5%; c, perlakuan AC 1.0%. Panah merah: zona hambat.

Tabel 5 Rerata diameter zona hambat dan nilai kerapatan sel *Ralstonia solygyii* subsp. *celebesensis* pada berbagai konsentrasi asap cair

Asap cair (%)	Rerata diameter zona hambat (mm)	Nilai kerapatan sel (OD 600 nm)
0.0	0.00 e ± 0.00	0.668 a ± 0.002
0.1	8.10 d ± 0.05	0.629 b ± 0.001
0.3	8.93 c ± 0.02	0.572 c ± 0.002
0.5	9.30 bc ± 0.04	0.431 d ± 0.001
0.7	9.63 abc ± 0.01	0.429 d ± 0.003
0.9	9.93 ab ± 0.02	0.402 e ± 0.002
1.0	10.30 a ± 0.02	0.197 f ± 0.001

Nilai adalah rata-rata dari tiga ulangan diikuti standar deviasi. Angka pada kolom yang sama dan diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf signifikansi 5% menurut uji lanjut Tukey.

Aisyah *et al.* (2018b) yang melaporkan bahwa aplikasi AC tempurung kelapa 0.5% pada bibit pisang Kepok tidak bersifat fitotoksik dan meningkatkan pertumbuhan sedangkan AC

> 2.0% bersifat fitotoksik dan menghambat pertumbuhan.

Munculnya gejala fitotoksik dipengaruhi oleh senyawa asam dan fenol yang terkandung di dalam AC. Senyawa asam dilaporkan mengganggu integritas membran plasma, proses produksi energi seperti fosforilasi oksidatif dan respirasi (Valletta *et al.* 2016), dan menurunkan fungsi selektivitas membran dalam pengangkutan nutrisi (de Tunes *et al.* 2012). Senyawa fenol seperti *2-methoxy phenol*, *4-ethyl-2-methoxy phenol*, dan *4-propyl-2-methoxy phenol* dilaporkan mengakibatkan cekaman oksidatif pada membran sel, tilakoid, dan struktur klorofil sehingga terjadi klorosis dan nekrosis (Lu *et al.* 2019).

Gejala fitotoksik juga berkaitan dengan terhambatnya pertumbuhan tanaman (Luo *et al.* 2019). de Souza Silva *et al.* (2020) melaporkan penurunan perkecambahan dan pertumbuhan awal tanaman lamtoro (*Leucaena leucocephala*) ketika diberi perlakuan AC dalam konsentrasi tinggi. Selain itu, senyawa fenol *hydroxyquinone* dilaporkan menghambat pertumbuhan tanaman *leafy spurge* (*Euphorbia esula*) (Kamran *et al.* 2017).

Perlakuan AC 0.1% menunjukkan pengaruh optimum dalam memacu pertumbuhan *plantlet*. Hasil yang sama dilaporkan oleh Aisyah *et al.* (2018b) yaitu aplikasi AC tempurung kelapa 0.5% meningkatkan pertumbuhan bibit pisang kepok. Senyawa *butanolide moiety*, *karrikin*, dan etanol dalam AC dilaporkan menstimulus germinasi benih dan pertumbuhan bibit (Mungkunkamchao *et al.* 2013). Mekanisme AC dalam memacu pertumbuhan tanaman terjadi melalui asidifikasi interseluler (Lashari *et al.* 2013), peningkatan ketersediaan hara N (Sharma *et al.* 2016), peningkatan kemampuan penyerapan nutrisi, aktivitas metabolisme, respirasi, absorpsi ion, kesetimbangan hormon, dan sintesis protein (Gulzar *et al.* 2016; Latif *et al.* 2017).

Perlakuan AC 0.1% menunjukkan peningkatan aktivitas POD dan PPO hingga 30 HST. Studi sebelumnya melaporkan aktivitas enzim ketahanan seperti POD, PPO, kitinase, beta-1,3 glukonase, superoksidas



dismutase, *guaiacol*, dan katalase mengalami peningkatan setelah diberi perlakuan AC pada konsentrasi tertentu (Chen *et al.* 2020; Wang *et al.* 2019). Peningkatan aktivitas enzim ketahanan oleh agens penginduksi yang terjadi sebelum serangan patogen adalah bentuk pengondisian tanaman agar mampu mengaktifkan sistem ketahanan lebih cepat ketika terserang oleh patogen di masa mendatang (Martinez-Medina *et al.* 2016). Peningkatan aktivitas enzim ketahanan tersebut dapat bersifat permanen atau terpelihara dalam waktu yang lama, dan dapat diturunkan pada generasi berikutnya melalui mekanisme metilasi DNA, modifikasi histon, dan perubahan bentuk kromatin (Baccelli dan Mauch-Mani 2016). Hasil penelitian ini memperkuat penelitian lain yang melaporkan penggunaan agens *priming* yakni senyawa  $\beta$ -*Aminobutyric acid* (BABA) pada *Arabidopsis* menyebabkan induksi ketahanan sementara melalui peningkatan enzim ketahanan peroksidase dan polifenol oksidase, akumulasi asam aspartat, induksi asam trikarboksilik, asam salisilat dan glukosida asam salisilat bebas, konjugat asam jasmonat, derivat indolik, xantosin, dan transkripsi gen RBOHD dan GSH1 (Luna *et al.* 2014; Pastor *et al.* 2014).

Terbentuknya zona hambat dan penurunan nilai kerapatan sel *R. syzygii* subsp. *celebesensis* mengindikasikan bahwa AC tempurung kelapa memiliki sifat antibakteri. Sebelumnya Aisyah *et al.* (2018a) melaporkan bahwa senyawa asam dan fenol yang terkandung di dalam AC menghambat pertumbuhan isolat *R. syzygii* subsp. *celebesensis*. Senyawa asam seperti asam benzelsulfonik dan asam asetat menurunkan pH lingkungan sel dan menghambat pertumbuhan sel bakteri secara langsung melalui pengikatan molekul ion H<sup>+</sup> pada lapisan fosfolipid membran sel yang mengganggu interaksi van der Waals antara rantai lipid asil, mengakibatkan disintegrasi membran dan gangguan kesetimbangan ion sehingga sel bakteri mengalami lisis dan kematian (Pernin *et al.* 2019; Synowiec *et al.* 2021). Selain itu, senyawa fenol seperti *4-methoxy-phenol*, *2-methyl-1,4-benzenediol*, dan *hydroxyquinone*

juga dilaporkan mengganggu integritas membran sel bakteri melalui cekaman oksidatif yang disebabkan oleh pelepasan *reactive oxygen species* dan ion K<sup>+</sup> dari membran sel bakteri, destabilisasi membran sel, dan kebocoran kandungan sitoplasma (Jeyanthi *et al.* 2021).

Disimpulkan bahwa AC  $\geq 1.5\%$  bersifat fitotoksik pada *plantlet* pisang Cavendish pada fase induksi perakaran. Perlakuan AC 0.1% meningkatkan pertumbuhan optimum pada pertambahan tinggi *plantlet*, bobot basah total, bobot kering total, dan mampu menginduksi ketahanan melalui peningkatan aktivitas enzim POD dan PPO. Selain itu, AC menekan pertumbuhan bakteri *R. syzygii* subsp. *celebesensis* secara *in vitro*. Hasil penelitian ini menunjukkan potensi teknik *priming* untuk pengendalian penyakit darah pisang terutama pada bibit pisang hasil kultur jaringan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin A. 2018. Bakteri endofit penghasil AHL-laktonase asal tanaman pisang untuk pengendalian penyakit darah [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Ahadiyat YR, Rostaman R, Fauzi A. 2020. Pengaruh aplikasi asap cair tempurung kelapa dan pupuk NPK terhadap hama dan penyakit pada padi Gogo. J Penelit Pertan Tanam Pangan. 4(3):153–160. DOI: <https://doi.org/10.21082/jpopt.v4n3.2020.p153-160>.
- Ahmed OB, Dabool AS. 2017. Quality improvement of the DNA extracted by boiling method in Gram negative bacteria. Int. J. Bioassays 6(4):5349. DOI: <https://doi.org/10.21746/ijbio.2017.04.004>.
- Aisyah I, Giyanto, Sinaga MS, Nawangsih AA, Pari G. 2018a. Uji *in vitro* asap cair terhadap *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* penyebab penyakit darah pada pisang. J Fitopatol Indones. 14(4):145–151. DOI: <https://doi.org/10.14692/jfi.14.4.145>.
- Aisyah I, Sinaga MS, Nawangsih AA, Giyanto, Pari G. 2018b. Utilization of liquid smoke to suppress blood diseases on bananas and its effects on the plant growth. Agrivita J

- Agric Sci. 40(3):453–460. DOI: <https://doi.org/10.17503/agrivita.v40i3.1390>.
- Baccelli I, Mauch-Mani B. 2016. Beta-aminobutyric acid priming of plant defense: the role of ABA and other hormones. *Plant Mol. Biol.* 91(6):703–711. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11103-015-0406-Y>.
- Bednarek PT, Orłowska R. 2019. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 140(2):245–257. DOI: <https://doi.org/10.1007/S11240-019-01724-1>.
- Cahyaniati C, Mortensen N, Marthur S. 1997. *Bacterial Wilt of Banana in Indonesia*. Jakarta (ID): Departemen Pertanian Indonesia.
- Cappuccino JG, Sherman N. 2014. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Ed ke-10. New York (USA): Pearson Education, Inc.
- Chen YH, Li YF, Wei H, Li XX, Zheng HT, Dong XY, Xu TF, Meng JF. 2020. Inhibition efficiency of wood vinegar on grey mould of table grapes. *Food Biosci.* 38:1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100755>.
- Cheng J, Hu SC, Kang K, Li XM, Geng ZC, Zhu MQ. 2021. The effects of pyrolysis temperature and storage time on the compositions and properties of the pyrolytic acids generated from cotton stalk based on a polygeneration process. *Ind Crops Prod.* 161:1–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113226>.
- Cho YK, Ahn HK. 1999. Purification and characterization of polyphenol oxidase from potato: I. purification and properties. *J Food Biochem.* 23(6):577–592. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1999.tb00587.x>.
- Conrath U. 2009. Priming of induced plant defense responses. *Adv Bot Res.* 513:61–395. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(09\)51009-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(09)51009-9).
- de Souza Silva SI, Pimenta AS, de Oliveira Miranda N, Lourenço YBC, de Souza EC. 2020. Wood vinegar inhibits emergence and initial growth of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seedlings. *Agric Conspec Sci.* 85(2):153–158.
- de Tunes LM, Avelar SAG, Barros ACSA, Pedroso DC, Muniz MFB, de Menezes NL. 2012. Critical levels of organic acids on seed germination and seedling growth of wheat. *Rev Bras Sementes.* 34(3):366–372. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000300002>.
- Drenth A, Ray J, Subandiyah S. 2020. *Reversing The Impact of Banana Blood Disease in Indonesia*. Brisbane (AU): APBSF Project Final Report PBSF016.
- Gulzar A, Siddiqui M, Bi S. 2016. Phenolic acid allelochemicals induced morphological, ultrastructural, and cytological modification on *Cassia sophera* L. and *Allium cepa* L. *Protoplasma.* 253:1211–1221. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0862-x>.
- Hadiwiyono. 2011. Blood bacterial wilt disease of banana: the distribution of pathogen in infected plant, symptoms, and potentiality of diseased tissues as source of infective inoculums. *Nusant Biosci.* 3(3):112–117. DOI: <https://doi.org/10.13057/nusbiosci/n030307>.
- Hermanto C, Eliza E, Emilda D. 2013. Bunch management of banana to control blood disease. *Australas Plant Pathol.* 42(6):653–658. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-013-0248-5>.
- Hilker M, Schwachtje J, Baier M, Balazadeh S, Bäurle I, Geiselhardt S, Hinch DK, Kunze R, Mueller-Roeber B, Rillig MC, *et al.*. 2016. Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biological Reviews.* 91(4):1118–1133. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12215>.
- Jeyanthi V, Velusamy P, Kumar GV, Kiruba K. 2021. Effect of naturally isolated hydroquinone in disturbing the cell membrane integrity of *Pseudomonas aeruginosa* MTCC 741 dan *Staphylococcus aureus* MTCC 740. *Heliyon.* 7(5):1–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07021>.
- Kamran M, Khan AL, Ali L, Hussain J, Waqas M, Al-Harrasi A, Imran QM, Kim YH, Kang SM, Yun BW, *et al.*. 2017. Hydroquinone:

- A novel bioactive compound from plant-derived smoke can cue seed germination of lettuce. *Front Chem.* 5:30. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2017.00030>.
- Lashari MS, Liu Y, Li L, Pan W, Fu J, Pan G, Zheng J, Zheng J, Zhang X, Yu X. 2013. Effects of amendment of biochar-manure compost in conjunction with pyrolygneous solution on soil quality and wheat yield of a salt-stressed cropland from Central China Great Plain. *Field Crops Res.* 144:113–118. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2012.11.015>.
- Latif S, Chiapusio G, Weston L. 2017. Allelopathy and the role of allelochemicals in plant defence. *Adv Bot Res.* 82:19–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.001>.
- Lu X, Jiang J, He J, Sun K, Sun Y. 2019. Effect of pyrolysis temperature on the characteristics of wood vinegar derived from Chinese fir waste: A comprehensive study on its growth regulation performance and mechanism. *ACS Omega.* 4(21):19054–19062. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02240>.
- Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V, Ton J. 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158(2):844–853. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.187468>.
- Luo X, Wang Z, Meki K, Wang X, Liu B, Zheng H, You X, Li F. 2019. Effect of co-application of wood vinegar and biochar on seed germination and seedling growth. *J Soils Sediments.* 19(12):3934–3944. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02365-9>.
- Martinez-Medina A, Flors V, Heil M, Mauch-Mani B, Pieterse CMJ, Pozo MJ, Ton J, van Dam NM, Conrath U. 2016. Recognizing plant defense priming. *Trends Plant Sci.* 21(10):818–822. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.07.009>.
- Marwan H, Rainiyati R, Mulyati S. 2020. Pengaruh aplikasi bakteri endofit terhadap perkembangan penyakit darah (*Ralstonia solanacearum* Phylotipe IV) pada tanaman pisang. *J Budid Pertan.* 16(1):95–101. DOI: <https://doi.org/10.30598/jbdp.2020.16.1.95>.
- Mungkunkamchao T, Kesmala T, Pimratch S, Toomsan B, Jothityangkoon D. 2013. Wood vinegar and fermented bioextracts: Natural products to enhance growth and yield of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Sci Hortic.* 154:66–72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.02.020>.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15(3):473–497. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Pastor V, Balmer A, Gamir J, Flors V, Mauch-Mani B. 2014. Preparing to fight back: generation and storage of priming compounds. *Front. Plant Sci.* 5(295):1–13. DOI: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00295>.
- Pernin A, Guillier L, Dubois-Brissonnet F. 2019. Inhibitory activity of phenolic acids against *Listeria monocytogenes*: deciphering the mechanisms of action using three different models. *Food Microbiol.* 80:18–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.010>.
- Safni I, Cleenwerck I, De Vos P, Fegan M, Sly L, Kappler U. 2014. Polyphasic taxonomic revision of the *Ralstonia solanacearum* species complex: proposal to emend the descriptions of *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia syzygii* and reclassify current *R. syzygii* strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *syzygii* subsp. nov., *R. solanacearum* phylotype IV strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *indonesiensis* subsp. nov., banana blood disease bacterium strains as *Ralstonia syzygii* subsp. *celebesensis* subsp. nov. and *R. solanacearum* phylotype I and III strains as *Ralstonia pseudosolanacearum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 64(9):3087–3103. DOI: <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.066712-0>.
- Safni I, Subandiyah S, Fegan M. 2018. Ecology, epidemiology and disease management of *Ralstonia syzygii* in Indonesia. *Front Microbiol.* 9:419. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00419>.

- Sahetapy B, Maryana N, Manuwoto Sjafrida, Mutaqin KH. 2015. Peranan beberapa jenis serangga sebagai vektor penyakit darah pada tanaman pisang [disertasi]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.
- Sharma T, Dreyer I, Kochian L, Piñeros MA. 2016. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security. *Front Plant Sci.* 7:1488. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01488>.
- Sriamornsak P, Limmatvapirat S, Piriyaprasart S. 2014. Effect of *Azadirachta indica* A. Juss var *indica*, *Nicotiana tabacum* L., and *Derris elliptica* (Roxb.) on growth of duckweed. *Adv Mat Res.* 1060:211-214. DOI: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1060.211>.
- Sulistiani E, Yani SA. 2012. *Produksi Plantlet Tanaman dengan Menggunakan Teknik Kultur Jaringan*. Bogor (ID): SEAMEO BIOTROP.
- Supriadi. 2005. Present status of blood disease in Indonesia. Di dalam: Allen C, Prior P, Hayward A, editor. *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Minnesota (US): APS Press. hlm 394-404.
- Synowiec A, Żyła K, Gniewosz M, Klieliszek M. 2021. An effect of positional isomerism of benzoic acid derivatives on antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Open Life Sci.* 16:594-601. DOI: <https://doi.org/10.1515/biol-2021-0060>.
- van Hulten M, Pelsler M, Van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J. 2006. Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 103(14):5602-5607. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0510213103>.
- Valletta A, De Angelis G, Badiali C, Brasili E, Micheli A, Di Cocco ME, Pasqua G. 2016. Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. root cultures. *Plant Cell Rep.* 35(5):1009-1020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1934-x>.
- Wang Y, Qiu L, Song Q, Wang S, Wang Y, Ge Y. 2019. Root proteomics reveals the effects of wood vinegar on wheat growth and subsequent tolerance to drought stress. *Int J Mol Sci.* 20(4):1-23. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20040943>.
- Zheng X, van Huystee RB. 1992. Peroxidase-regulated elongation of segments from peanut hypocotyls. *Plant Sci.* 81(1):47-56. DOI: [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(92\)90023-F](https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90023-F).