

PERAN BERAT MOLEKUL PROTEIN ENZIM EKSTRAKSELULER *FUSARIUM OXYSPORUM* FS.P. *CUBENSE* SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI PADA TANAMAN PISANG

The Role of Extracellular Enzym Protein Molecule Wight of Fusarium oxysporum f.sp. cubense as Virulence Factor on Banana Plant

Abdul Azis Ambar

ambar_gama@yahoo.co.id

*Fak. Pertanian, Peternakan, dan Perikanan
Universitas Muhammadiyah Parepare*

ABSTRACT

The research aims to study the role of extracellular enzymes molecule wight on the virulence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Foc). The study was conducted in the glass house, laboratory of plant pathology. The isolates used in this research are Bnt 1 and Bnt 2 from Yogyakarta, Btu 3 from Malang, Wsb 3 from Wonosobo, Lmp 3 from Lampung and, Kjj 3 from Kalimantan. Banana cultivar ambon kuning is used as tested plant. Pathogenicity test is conducted by using hydroponic system. The plant roots are injured with a needle and then put into filled with sterile water. The suspension of Foc conidia is added in to plastic cup up to 10^6 spore/ml in concentration. Observation of symptom was conducted at 6 week by counting the score of necrotic symptom (RDI/Rhizome Discoloration Index) on banana cob which cut horizontally. Analysis extracellular enzymes is done by using sodium dodecyl sulphate polycrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

The result of pathogenicity test showed that the virulence of six isolates of Foc is not significantly different. Est of extracellular enzyme activity on six isolates of Foc showed that there is significant different between extracellular enzymes activity on isolates of Bnt 2, Wsb 3, Lmp 3, Kjj 3, and control but not for isolates of Bnt 1 and Btu 3. The six isolates have protein variation both amount and type that is probably related to its pathogenicity. The result of SDS-PAGE showed that the six isolates of Foc have same protein pattern at 55,6 kDa. Protein pattern of Bnt 1, Bnt 2, Btu 3, Wsb 3, and Lmp 3 is laid on 42.84 kDa. Isolate of Bnt 2 has protein pattern at 36.5 kDa and Btu 3 has protein pattern at 20 kDa. The protein pattern that approaches to the pattern of polygalacturonase is Bnt 2 at 36.5 kDa molecule weight.

Keys Word: Extracellular Enzym Molecule Wight, Fusarium oxysporum f.sp. cubense, Virulence, Banana

PENDAHULUAN

Fusarium oxysporum f.sp. *cubense* disingkat (Foc) penyebab penyakit layu fusarium pada pisang atau “penyakit panama”. Penyakit ini dapat menurunkan hasil tanaman pisang, baik

secara kualitas maupun kuantitas pada pertanaman pisang di Lampung, Mojokerto, Jawa Barat, dan Sulawesi Selatan (Djatnika dan Nuryani, 1995).

Kemampuan Foc mematahkan ketahanan pisang diakibatkan kemampuan Foc menghasilkan senyawa

kimia, seperti toksin dan enzim. Enzim ekstraseluler merupakan enzim pemecah dinding sel yang berperan penting dalam patogenisitas dan berperan penting terhadap timbulnya penyakit layu pisang (Collmer and Keen, 1986 *cit.* Di Pietro *et al.*, 1996).

Enzim jamur tersusun oleh protein dengan berat molekul yang berbeda-beda, yang mempunyai fungsi dan peranan sangat besar dalam metabolisme tubuh. Disisi lain keberadaan berat molekul protein (BM protein) dan peranannya sebagai virulensi patogen perlu diselidiki lebih mendalam, sehingga akan tampak hubungan antara berat molekul protein yang menyusun enzim dengan tingkat virulensi Foc pada tanaman pisang.

METODE PENELITIAN

1. Uji Patogenisitas

Isolat Foc diperoleh dari laboratorium mikologi Fakultas Pertanian UGM, kemudian biakan murni diperbanyak pada medium PDB dan digojok menggunakan *shaker* selama 7 hari, kemudian disaring menggunakan kertas saring. Akar dilukai sebelum direndam dalam suspensi Foc konsentrasi 10^6 spora/ml air steril. Kontrol, menggunakan air. Tanaman ditempatkan dalam rumah kaca selama 6 minggu, keparahan penyakit dihitung dengan mengamati nekrotik pada bonggolnya dengan menggunakan Skor *rhizome discoloration index* (RDI) penyakit layu fusarium sebagai berikut (Ho *et al.*, 2004)

1 = tidak ada gejala nekrotik pada bonggol dan batang bawah

- 2 = tidak ada gejala nekrotik pada bonggol, terdapat gejala pada bagian akar
- 3 = gejala nekrotik 5% di sekitar batang bawah
- 4 = gejala nekrotik 6 – 20% di sekitar bonggol
- 5 = gejala nekrotik 21 – 50% di sekitar bonggol
- 6 = gejala nekrotik lebih dari 50% di sekitar bonggol
- 7 = gejala nekrotik sudah meluas dibagian bonggol dan stele
- 8 = tanaman mati

Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan 5 ulangan.

2. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis)

Ekstraksi protein ekstraseluler. Suspensi Foc dalam 100 ml medium SM digojok dengan shaker (150 rpm; 7 hr; 28°C), kemudian sentrifugasi 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan yang dihasilkan dicampur dengan amonium sulfat 90% (54 g/100 ml) kemudian dihomogenisasi. Suspensi diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4°C, kemudian disentrifugasi pada 6.000 rpm selama 15 menit. Pellet protein yang dihasilkan dilarutkan dengan *phosphat buffer salin* (PBS) 0,02 M pH 7,2. Selanjutnya didialisis dengan membran dialisis dalam 1 liter PBS 0,02 M pH 7,2 sebanyak 3 kali selama 24 jam. Sampel protein kemudian ditera dengan spektrofotometer dan dielektroforesis (Joko, 1999).

Pembuatan gel Elektroforesis. Konsentrasi gel pemisah (*separating gel*) adalah 12%. Komposisi larutan gel

pemisah 1,75 ml aquades; 2 ml acrylamide : bis-acrylamide (30:0,8%); 1,5 ml tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); 25 µl SDS 20%; 25 µl *ammonium persulfat* (APS 10%) dan 2,5 µl TEMED. Larutan gel pemisah dituangkan terlebih dahulu diantara 2 lempeng kaca setinggi 5 cm, sisa ruang digunakan untuk *stacking gel*. Akuades steril dituangkan pada bagian atas gel pemisah sampai penuh sehingga membentuk lapisan sendiri. Selanjutnya gel dibiarkan berpolimerasi selama 60 menit.

Lapisan akuades dituang dari gel yang telah mengental, kemudian *stacking gel* dicampur dalam gelas beker dengan komposisi 1,5 ml akuades; 325 µl acrylamide:bis-acrylamide (30:0,8%); 312,5 µl Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8); 12,5 µl SDS 20%; 12,5 µl APS 10% dan 2,5 µl TEMED. Campuran tersebut dituangkan di atas gel yang telah membeku dan dibiarkan selama 30 menit, kemudian dipindahkan ke dalam alat elektroforesis dengan menambahkan 1 X SDS buffer.

Setiap 5 µl sampel protein ditambahkan 1 µl SDS *loading buffer* dan dipanaskan pada suhu 95°C selama 3–5

menit. Selanjutnya sampel protein tersebut dimasukkan ke sumuran gel elektroforesis dengan voltase 100 V, 15 mA dan 5 Watt, hingga *bromophenol blue* dalam buffer sampel mencapai dasar gelas plate. Kemudian gel direndam dengan larutan *fixing solution*, kemudian diberi larutan pewarna (*coomassie brilliant blue*) selama 1-3 jam setelah itu dicuci dalam larutan *destaining solution* sampai pita protein tampak hasil pengecatannya (Ed Rybicki & M. Purves, 2006). Hasil elektroforesis difoto dan dibandingkan dengan penanda berat molekul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Uji Patogenisitas

Tanaman yang terinfeksi *Foc* menunjukkan gejala khas berupa bercak coklat, merah bata, hingga hitam pada jaringan bonggol pisang bila dibelah membujur. Menurut Endah dan Novizan (2002), pada batas akar dan batang dipotong melintang, akan tampak ada berkas cincin berwarna coklat kehitaman kemudian busuk basah pada berkas pembuluh.

Tabel 1. Retata skor gejala nekrotik pada bonggol tanaman pisang 6 minggu setelah inokulasi

No	Perlakuan	Rerata
1	Bnt 1	3,0a
2	Bnt 2	3,6a
3	Btu 3	3,4a
4	Wsb 3	3,2a
5	Lmp 3	3,0a
6	Kjg 1	3,4a
7	Kontrol	1,0b

Keterangan: angka rerata yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak ganda Duncan pada aras 5%

Uji patogenesis dilakukan untuk mengetahui kemampuan relatif dari suatu patogen untuk menimbulkan penyakit. RDI (*Rhizome Discoloration Index*) diamati berdasarkan gejala nekrotik pada bonggol tanaman pisang 6 minggu setelah inokulasi. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa tanaman yang ditanam dengan sistem hidroponik hingga pada minggu ke-6 belum menunjukkan kelayuan karena kebutuhan air dalam jaringan tanaman dapat terpenuhi, namun pada akhir pengamatan setelah bonggol dibelah membujur tampak gejala nekrotik. Hal ini menunjukkan bahwa jamur Foc telah menginfeksi akar serta batang tanaman pisang.

Hasil uji patogenesis menunjukkan bahwa pada tanaman pisang yang diberi perlakuan dengan isolat Bnt 2 rerata gejala nekrotik pada bonggol pisang paling tinggi yaitu 3,6 kemudian isolat Btu 3 dan K'g 1 sebesar 3,4 dan Wsb 3 sebesar 3,2. Isolat Bnt 1 dan Lmp 3 sebesar 3,0. Keenan isolat tersebut berbeda nyata dengan perlakuan kontrol (1,0). Hal ini menunjukkan bahwa masing-masing isolat mempunyai kemampuan yang sama dalam menginfeksi tanaman, sedangkan

perlakuan kontrol tidak tampak adanya nekrotik pada bonggol pisang.

2. SDS-PAGE

Uji pendahuluan dilakukan dengan menumbuhkan Foc selama 2 hari pada saat ekstraksi digunakan amonium sulfat dengan konsentrasi 30, 50, 70, dan 90%, hanya diperoleh pellet protein sedikit, ini disebabkan dalam jangka waktu tersebut isolat Foc dalam medium sintetik sedikit mengeluarkan protein ekstraseluler. Isolat Foc yang ditumbuhkan dalam medium sintetik selama 1 minggu menghasilkan protein ekstraseluler yang berwarna hitam kecokelatan. Isolat Foc tersebut ditumbuhkan dengan menggunakan amonium sulfat 90%. Inkubasi selama 1 minggu mengeluarkan protein ekstraseluler yang lebih banyak dibandingkan inkubasi selama 2 hari. Hal ini dapat dilihat pada medium yang mengalami perubahan kekentalan dan setelah diekstraksi menggunakan 90% amonium sulfat menghasilkan pellet yang lebih banyak. Hasil yang diperoleh dari ekstraksi kemudian dianalisis menggunakan PBS 0,2 M pH 7,2 selama 24 jam.

Tabel 2. Berat molekul protein enzim ekstraseluler (kDa) yang dihasilkan oleh beberapa isolat Foc pada medium SM

Isolat	Berat molekul (kDa)
Bnt 1	55,6 dan 42,84
Bnt 2	55,6; 42,84 dan 36,5
Btu 3	55,6; 42,84 dan 20,0
Wsb 3	55,6 dan 42,84
Lmp 3	55,6 dan 42,84
K'g 1	55,6

Protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat Foc dianalisis dengan SDS-PAGE menggunakan penanda protein standar (Marker

Prestained Bio Rad). Hasil yang diperoleh dari keenam isolat Foc adalah memiliki pita yang sama yaitu berat molekul 55,6 kDa, masing-masing adalah 55,6; 42,8; 36,5 kDa; dan 55,6; 42,8; 20,0 kDa. Isolat Bnt 2 mempunyai pita protein 36,5 kDa, dan Bnt 3 mempunyai pita protein 20 kDa. Berat molekul protein enzim ekstrakseluler secara lengkap dapat dilihat pada tabel 2.

Berdasarkan pada pola protein yang diperoleh pada SDS-PAGE ke-6 isolat Foc memiliki keragaman ketebalan pita protein. Hal ini disebabkan oleh konsentrasi protein yang berbeda atau ada keragaman protein yang diproduksi oleh Foc. Dari data patogenesis, tampak bahwa isolat Bnt 2 dan Bnt 3 memberikan tingkat patogenesis paling tinggi, walaupun tidak berbeda nyata dengan isolat lainnya. Ada dugaan bahwa isolat yang memiliki 3 pita protein akan lebih mudah menginfeksi tanaman pisang. Hal ini dimungkinkan bahwa ketiga pita protein itu mempunyai fungsi yang berbeda pada sistem jaringan tanaman. Selain itu, berat molekul juga akan menentukan tingkat patogenesis. Hal ini tampak pada enam isolat yang diuji memiliki berat molekul yang sama, yaitu 55,6 kDa. Pada isolat Bnt 2 tampak memiliki berat molekul 55,6; 42,84 dan 36,5. Menurut Di Pietro *et al.* (1999) pita protein yang menunjukkan berat molekul 35 dan 37,5 kDa merupakan protein dari enzim poligalaturonase. Dari hasil elektroforesis, pita protein yang mendekati pola protein atau enzim poligalaturonase adalah isolat Bnt 2 mempunyai pita protein 36,5 kDa.

KESIMPULAN

1. Uji patogenesis dari 6 isolat Foc menunjukkan virulensi yang tidak berbeda
2. Ke-enam isolat Foc menghasilkan jenis dan jumlah enzim yang beragam yang berkaitan dengan sifat patogenesisnya.
3. Ada hubungan erat antara patogenesis dengan aktivitas enzim poligalaturonase yang dihasilkan oleh Foc
4. Pita protein 36,5 kDa mempengaruhi tingkat patogenesis isolat Bnt 2 dengan patogenesis tertinggi.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Bambang Hadisutrisno, DAA dan Ir. Arif Wibowo, M.Agr.Sc atas bantuannya menyediakan laboratorium dan isolat Foc.

DAFTAR PUSTAKA

- Djatnika, I., & N. Nuryani., 1995. Pengendalian Biologi Penyakit Layu Fusarium pada Pisang dengan Beberapa Isolat *Pseudomonas fluorescens*. *Prosiding Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah PFI 27 – 29 September*. Mataram. 422 – 425.
- Di Pietro, A., & M. Isabel. G.R., 1996. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Purification, Characterization, and Production during Infection of Tomato Plant. *American Phytopathology* (86): 12: 1324 – 1330.
- Di Pietro, M.C. Ruiz-Roldan, M.D. Huertas-Gonzales, F.I. Garcia-Marceira, M. Meglecz, A. Jimenez, Z. Caracuel, R. Sancho-Zapatero, C. Hera, E. Gomez-gomez, M. Ruiz-Rubio, C.I. Gonzalez-Verdejo, & M.J. Paez,

1999. Papel de enzimas liticas de la Pared Cellular en la Patogenicidad de *Fusarium oxysporum*. Depart. De Genetic. *Revista Iberoamericana de Micologia* 17: S47 – S53.
- Ed Rybicki & M. Purves., 2006. *SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)*. Dept Microbiology University of Cape Town.
- Ho, Y.W., Mac.C., A.A. Mohammed., & K.W. Liew., 2004. Early Screeening Technique for *Fusarium* Wilt Resistance in Banana Micropropagated Plants. University Malaysia. <http://www.foo.org/documents/slow.cdr.asp?urlfile=/docrep/007/ae216e/ae216eok.htm>.
- Joka,T., 1999. Analisis Protein Ekstraseluler dan Kajian pathogenesis Empat Patovar *Xanthomonas campestris*. *Skripsi*. Fakultas Pertanian UGM. Tidak dipublikasikan.
- Su, H.J., S.C. Hwang, & W.H. Ko., 1986. Fusarial Wilt of Cavendish Bananas in Taiwan. *Plant Disease*. 70 (9): 814 – 818.