

Pengimbasan Ketahanan Anggrek Tanah Dengan Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap Aktivitas Peroksidase

Induced Resistance Of Orchid Land As Result Of The In Vitro Fusaric Acid Selection Toward To Activities Peroxidase

Endang Nurcahyani¹⁾, R. Agustrina¹⁾, Tundjung TH¹⁾, dan CE Isharnani²⁾

¹⁾Dosen Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung

²⁾Mahasiswa Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Lampung

Email: endang_nurcahyani@yahoo.com

ABSTRACT

The most production constrain on Orchid Land (Spathoglottis plicata Bl.) plantation recently has been caused by fusarium wilt caused by Fusarium oxysporum (Fo) and until now still can not be solved effectively. The use of fusarium wilt resistant cultivar has been introduced, which has high yield expected as one alternative method for controlling this disease. A resistant Orchid Land plantlet has been initiated by in vitro selection on Vacin & Went (VW) medium containing fusaric acid (FA), and found indications tolerant FA concentration for selection plantlets were resistant. Peroxidase enzyme activity as a mechanism of resistance against Fo plantlets of S. plicata was measured using the Saravanan et. al. (2004) method, the plantlets were scanned FA (concentration of 10, 20, 30, and 40 ppm) and control. The results showed indications of increased activity of peroxidase enzyme significantly from four different FA stress concentration. At a concentration of 10 ppm FA produce peroxidase activity of 0.26 U/ mg/ min, the concentration of 20 ppm lead of 0.35 U/mg/min, at a concentration of 30 ppm FA produces 0.37 U/mg/min and the concentration of 40 ppm produces of 0.52 U/mg/min. In controls, the peroxidase activity of 0.12 U/mg/min. The research results prove the presence of increasing concentrations of FA stress will improve also the peroxidase enzyme activity. Indications of increased activity of peroxidase significant stress concentrations of four different FA, is suspected because stress can cause an increase in compound peroxide (H₂O₂) in the culture medium and can lead to increased activity of the enzyme peroxidase.

Keywords: spathoglottis plicata Bl., fusarium oxysporum, in vitro, fusaric acid, peroxidase activity

Diterima: 10 April 2015, disetujui 24 April 2015

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan dengan keragaman varietas dan jenis tanaman hortikultura, misalnya tanaman anggrek (Ramadiani, dkk. 2008). Namun, dalam pembudidayaannya tanaman anggrek memiliki banyak kendala yang dihadapi seperti munculnya jamur patogen atau yang lebih dikenal dengan penyakit layu fusarium. Seleksi ketahanan terhadap layu fusarium dapat dilakukan dengan menggunakan filtrat dari kultur fusarium atau menggunakan racun murni fusarium yaitu asam fusarat (AF).

Pengaruh pengimbasan asam fusarat (AF) terhadap planlet anggrek tanah dapat diketahui pula dengan melakukan analisis aktivitas enzim peroksidase. Secara fisiologis, mekanisme ketahanan terhadap virus melibatkan peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang berperan dalam mekanisme ketahanan terhadap suatu cekaman (Artlip and Funkhouser, 1995). Saravanan *et al.* (2004) menyatakan bahwa gen yang mengatur aktivitas enzim peroksidase merupakan gen ketahanan hipersensitif dominan pada tanaman sehingga membantu membentuk suatu mekanisme ketahanan terhadap suatu penyakit.

Penelitian bertujuan mengetahui dan menganalisis karakter ekspresi yang spesifik pada planlet *Spathoglottis plicata* tahan asam fusarat secara *in vitro* meliputi aktivitas enzim peroksidase

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan bulan Maret 2015 di Laboratorium Botani (ruang penelitian *in vitro*), Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penelitian dilaksanakan dalam rancangan acak lengkap dengan 5 perlakuan dan 6 ulangan. Perlakuan adalah penambahan asam fusarat ke dalam medium VW (Vacin and Went) dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Satuan percobaan adalah planlet *Spathoglottis plicata* yang ditanam pada medium VW tersebut. Analisis ragam dan uji BNT dilakukan pada taraf nyata 5%.

Pelaksanaan Penelitian.

Persiapan medium tanam dan seleksi.

Medium yang digunakan adalah *Vacin and Went* (VW) padat dengan penambahan ZPT (Zat pengatur Tumbuh). Setelah medium dicairkan, kemudian medium disterilisasi selama 15 menit. Medium VW yang sudah disterilkan kemudian ditambah asam fusarat (AF) dengan konsentrasi 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm.

Penanaman planlet dalam medium seleksi asam fusarat.

Eksplan yang digunakan berupa planlet steril. Planlet-planlet dari botol kultur dikeluarkan dengan *scalpel* steril dan satu-persatu diletakkan di atas cawan petri berdiameter 10 cm, kemudian planlet dipilah satu-satu, setelah itu ditanam pada masing-masing botol kultur yang berisi medium perlakuan yang telah ditentukan. Masing-masing konsentrasi dilakukan 6 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 eksplan *Spathoglottis plicata* dalam setiap botol kultur.

Analisis aktivitas enzim peroksidase

Bahan untuk analisis aktivitas enzim peroksidase dengan menggunakan daun planlet *S.plicata* yang sudah diimbas dengan asam fusarat dan dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Campuran dibuat 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 mL ekstrak enzim dari daun planlet *Spathoglottis plicata*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂. Pada suhu kamar, campuran diendapkan dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer diatur dengan panjang gelombang 420 nm. Aktivitas enzim dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah aktivitas berubahnya OD 420 nm pada spektrofotometer per menit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis aktivitas enzim peroksidase menggunakan metode Saravanan *et al.* (2004), pada planlet anggrek tanah yang diimbas dengan AF pada konsentrasi 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Hasil analisis aktivitas enzim peroksidase planlet anggrek tanah yang di tanam pada medium VW dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Aktivitas enzim peroksidase planlet anggrek tanah yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30, dan 40 ppm)

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm b/v)	Aktivitas Enzim Peroksidase (unit/mg/menit)
0 (Kontrol)	0,116 ± 1,433E-05 ^a
10	0,265 ± 5,333E-06 ^b
20	0,349 ± 2,333E-06 ^c
30	0,372 ± 6,333E-06 ^d
40	0,521 ± 4,333E-06 ^e

Keterangan :

Aktivitas enzim peroksidase = $\bar{y} \pm SE$

\bar{y} = nilai rata-rata aktivitas enzim peroksidase

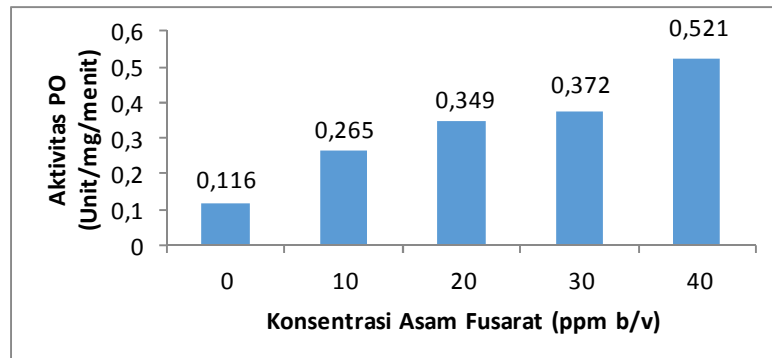
SE = standar eror

Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

BNT (0,05) = 0,008

Data pada Tabel 1, menunjukkan bahwa terjadi peningkatan pada aktivitas enzim peroksidase yang signifikan dari empat konsentrasi AF yang berbeda. Pada kontrol (0 ppm) dihasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,116 U/mg/min. Sedangkan, pada konsentrasi AF 10 ppm mengakibatkan aktivitas enzim peroksidase meningkat sebesar 0,265 U/mg/min, konsentrasi AF 20 ppm menyebabkan aktivitas enzim peroksidase menjadi 0,349 U/mg/min, konsentrasi AF 30 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase 0,372 U/mg/min, dan pada konsentrasi AF 40 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,521 U/mg/min.

Uji BNT pada taraf nyata 5% menunjukkan bahwa aktivitas enzim peroksidase daun planlet *S. plicata* pada konsentrasi asam fusarat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm berbeda nyata terhadap kontrol. Perbandingan aktivitas enzim peroksidase planlet *S. plicata* yang di tanam pada medium VW dengan berbagai konsentrasi asam fusarat disajikan pada Gambar 1. Data pada Gambar 1. menunjukkan bahwa aktivitas enzim peroksidase daun planlet *S. plicata* mengalami peningkatan pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm.



Gambar 1. Grafik batang perbandingan aktivitas enzim peroksidase *Spathoglottis Plicata*

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pengimbasan asam fusarat terhadap planlet *Spathoglottis plicata* memberikan pengaruh positif terhadap peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada konsentrasi asam fusarat 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Peningkatan aktivitas enzim peroksidase sejalan dengan meningkatnya cekaman AF. Perlakuan induksi mutasi dengan AF secara *in vitro* dapat meningkatkan nilai koefisien keragaman aktivitas enzim peroksidase pada planlet anggrek tanah. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Nurcahyani (2013), bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada planlet vanili yang terkena cekaman AF. Peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang signifikan pada planlet vanili diduga karena cekaman dari AF dapat memicu peningkatan senyawa peroksida (H_2O_2). Menurut Bouizgarne *et al.* (2006) bahwa peroksida merupakan senyawa yang dapat memicu meningkatnya aktivitas enzim peroksidase.

Selain itu, hasil penelitian ini sejalan dengan Yanti (2011), semakin meningkatnya koefisien keragaman dan nilai varian dapat menunjukkan bahwa terjadi peningkatan variasi aktivitas enzim peroksidase pada mutan bibit pisang kepok. Peningkatan variasi ini terjadi akibat telah terjadinya mutasi pada gen penyandi enzim peroksidase. Hadi (2003), menyatakan bahwa tanaman karet terhadap penyakit *Corynespora* aktivitas enzim peroksidasesnya lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol. Tanaman yang tahan akan terjadi peningkatan aktivitas peroksidase, sedangkan tanaman yang peka tidak ada perubahan atau bahkan turun dibandingkan dengan tanaman dalam keadaan sehat (Agrios, 2005).

Abeles *et al.* (1990) juga menyatakan bahwa peningkatan aktivitas enzim peroksidase merupakan suatu bentuk respon umum tanaman terhadap cekaman lingkungan. Cekaman suhu rendah pada gandum dan jagung (Peruanskii *et al.*, 1991) dan cekaman polusi udara (Rao and Dubey, 1990) dapat meningkatkan aktivitas enzim peroksidase.

KESIMPULAN

Hasil dari pengimbasan asam fusarat pada konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm pada medium VW mampu meningkatkan aktivitas enzim peroksidase pada planlet *Spathoglottis plicata*. Secara signifikan, konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm memberikan pengaruh dalam peningkatan aktivitas enzim peroksidase dibandingkan dengan kontrol. Peningkatan aktivitas enzim peroksidase sejalan dengan semakin meningkatnya cekaman AF.

DAFTAR PUSTAKA

- Abeles, F.B., C L.Biles, and L.J.Dunn. 1990. *Induction of Peroxidases as a Response to Environmental Stimuli*. Monograph. British Soc. Plant Grow Regulation. (Abstract)
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York. 922 p
- Artlip, T.S. and E.A. Funkhouser. 1995. *Protein Synthetic Responses to Environmental Stresses*. In M. Pessaraki (Ed). Handbook of Plant and Crop Physiology. Marcel Dekker, Inc., New York. pp.627-644
- Bouizgarne B, El-Maarouf Bouteau H, Frankart C, Rebutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouchdouch Y & El Hadrami I. 2006. *Early physiological responses of Arabidopsis thaliana cells to fusaric acid: Toxic and Signalling effects*. New Phytologist 169. Pp: 209-218.
- Hadi H. 2003. *Analisis Genetik Sifat Ketahanan Tanaman Karet Terhadap Penyakit Gugur Daun Corynespora*. Disertasi. Sekolah Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor.
- Nurcahyani, E. 2013. *Karakterisasi Planlet Vanili (Vanilla planifolia Andrews) Hasil Seleksi In Vitro dengan Asam Fusarat Terhadap Fusarium oxysporumf.sp. vanillae*. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. Desertasi. (Tidak dipublikasikan)
- Peruanskii, Y.V., I.M. Savich, and T.L. Tazhibaeva. 1991. *Relative content and amino acid composition of the iso peroxidases in leaves of wheat and maize seedlings as criterion of resistance to low temperature stress*. Sel'skokhozyais tvennaya Biologiya 1:139-146 (Abstract).
- Ramadiana, S., A.P. Sari, Yusnita dan D. Hapsoro. 2008. Hibridisasi, Pengaruh Dua Jenis Media Dasar dan Pepton Terhadap Perkecambahan Biji dan Pertumbuhan Protokorm Anggrek *Dendrobium* Hibrida secara In Vitro. *Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II Universitas Lampung*. 17-18 Agustus.
- Rao, M.V., P.S. Dubey. 1990. *Biochemical aspects (antioxidans) for development of tolerance in plants growing at different low levels of of ambient air pollutants*. Environmental Pollution 64:55-56 (Abstract)
- Saravanan T, Bhaskaran R, and Muthusamy M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (cv. Rasthali) against Fusarium Wilt Disease. *Plant Pathology Journal* 3: 72-80. Yanti Y. 2011. *Aktivitas Peroksidase Mutan Pisang Kepok dengan Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Secara In Vitro*. *Jurnal Natur Indonesia* 14 (1): 32-36