

PROTEIN ANTIMIKROB DARI TANAMAN *TRICHOSANTHES*

Sukma D¹⁾, IM Artika^{2)*}, ET Tondok³⁾

ABSTRACT

ANTIMICROBA FROM *TRICHOSANTHES*

The research was aimed to study morphology, growth, development, pest and disease of 3 *Trichosanthes* species, initiate shoots, callus and hairy root culture *in vitro*, analyze chitinase and peroxidase activities and the effect of salicylic acid (SA) and etefon (ETF) on the chitinase and peroxidase activities of crude protein extract from *Trichosanthes*, and evaluate *in vitro* antifungal activity of crude protein extract of *Trichosanthes*. The results of the research showed the differences of morphological characters, growth habit of *T. cucumerina* var. *anguina*, *T. tricuspidata* and the differences of pest and diseases problem of *T. quinquangulata*. *T. cucumerina* var. *anguina* and *T. quinquangulata*. *T. tricuspidata* had the highest chitinase activity in crude protein extract of *in vitro* shoots, calli and plant roots and peroxidase activity in plant roots grown in field. *T. cucumerina* var. *anguina* showed the highest chitinase and peroxidase activities in crude protein extract of plant roots grown in field and calli. Chitinase and peroxidase activities of calli crude protein extract of *T. tricuspidata* could be increased by SA and ETF. Adversely, ETF decreased the peroxidase activity of calli crude protein extract of *T. tricuspidata*. In *T. cucumerina* var. *anguina*, SA could not increase the chitinase activity but increase the peroxidase activity. The crude protein from *in vitro* shoots of *T. tricuspidata* could inhibited the spore germination of *Fusarium* sp. from *T. cucumerina* var. *anguina*, *Fusarium oxysporum* from shallot, *Puccinia arachidis* from peanut and *Pseudoperonospora cubensis* from cucumber. The protein could not inhibit spore germination of *Curvularia eragrostidis* from *Dendrobium orchids*.

Keywords: antifungal, chitinase, etephon, peroxidase, salicylic acid, *Trichosanthes* spp.

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari morfologi, pertumbuhan, perkembangan, hama dan penyakit dari 3 spesies *Trichosanthes*, menginduksi kultur tunas, kalus dan akar rambut transgenik (hairy root) *in vitro*, menganalisis aktivitas enzim kitinase dan peroksidase dan pengaruh pengaruh perlakuan senyawa induser *salicylic acid* (SA) dan etephon (ETF) terhadap aktivitas enzim kitinase dan peroksidase dalam ekstrak kasar protein dalam jaringan tanaman dan mengevaluasi aktivitas anticendawan secara *in vitro* dari ekstrak kasar protein dari jaringan tanaman *Trichosanthes*. Hasil penelitian menunjukkan perbedaan morfologi, pertumbuhan dan tingkat serangan hama dan penyakit dari 3 spesies yang diteliti (*T. tricuspidata*, *T. cucumerina* var. *anguina* dan *T. quinquangulata*). Pada *T. tricuspidata*, aktivitas kitinase yang tinggi ditemukan pada tunas *in vitro*, kalus dan akar tanaman dari lapang dan paling rendah pada daun. Pada *T. cucumerina* var. *anguina*, aktivitas kitinase dan peroksidase yang tinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapang dan kalus *in vitro* dan paling rendah pada daun. SA dan ETF dapat meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus *in vitro* *T.*

tricuspidata namun ETF menekan aktivitas peroksidase. SA tidak meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus *in vitro* *T. cucumerina* var. *anguina* namun meningkatkan aktivitas peroksidase. Ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro* *T. tricuspidata* menunjukkan aktivitas anticendawan *in vitro* berdasarkan uji perkecambahan spora pada *Fusarium* sp. asal *T. cucumerina* var. *anguina*, *Fusarium oxysporum* asal bawang merah, *Puccinia arachidis* asal tanaman kacang tanah, dan *Pseudoperonospora cubensis* asal tanaman ketimun dan tidak dapat menghambat perkecambahan spora *Curvularia eragrostidis* asal anggrek *Dendrobium*.

Kata kunci: anticendawan, etephon, kitinas, peroksidase, *salicylic acid*, *Trichosanthes* spp.

PENDAHULUAN

Salah satu plasmanutfah tanaman yang belum banyak diteliti secara ilmiah adalah genus *Trichosanthes* dari famili *Cucurbitaceae*. Backer, Van Den Brink (1963) melaporkan 8 spesies *Trichosanthes* yang terdapat di Pulau Jawa yaitu *T. coriacea*, *T. cucumerina*, *T. anguina*, *T. globosa*, *T. ovigera*, *T. villosa*, *T. trifoliata* dan *T. bracteata*. Rugayah (1999) menambahkan identifikasi morfologi, anatomi dan isozim dari 39 spesies (termasuk 2 varietas) yang terdapat di Malesia (Malaysia dan Indonesia). Sebagian besar spesies *Trichosanthes* di-manfaatkan sebagai bahan obat kecuali *T. cucumerina* var *anguina* atau dikenal dengan

¹⁾ Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB

²⁾ Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam IPB

³⁾ Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian IPB Kampus IPB Dramaga, Bogor 16680

* Penulis korespondensi: (+62251) 8323166

nama lokal paria belut, buah mudanya dapat dimakan sebagai sayuran.

Berbagai spesies dari famili *Cucurbitaceae* dilaporkan menghasilkan protein bioaktif yang disebut *ribosome inactivating protein* (RIPs). RIPs merupakan protein yang dapat merusak ribosom dengan aktivitas *N-glicosidase* melalui depurinasi rRNA sehingga menghambat proses sintesis protein (Barbieri *et al.* 1993). RIP dari tanaman dapat menghambat sintesis protein pada mamalia, bakteri, cendawan dan tanaman dalam kondisi *in vitro* dan *in vivo* (Iglesias *et al.* 1993). RIPs berfungsi sebagai salah satu mekanisme defensif bagi tanaman disebabkan RIP memiliki aktivitas anticendawan, antibakteri bahkan antivirus (Seletrennikof 2001). Overekspresi RIPs yang berasal dari biji barley pada tanaman tembakau meningkatkan ketahanan tanaman terhadap cendawan (Logeman *et al.* 1992).

Protein lain yang berhubungan dengan respons ketahanan tanaman terhadap patogen adalah kitinase dan peroksidase. Kitinase dapat mendegradasi senyawa kitin yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel cendawan. Sebagian besar cendawan filamentus mengandung senyawa kitin pada dinding sel hifanya. Kitinase berfungsi menghidrolisis ikatan β -1,4-glycoside pada biopolymer *N-acetylglucosamine* dalam senyawa kitin (Kasprzewska 2003). Kitinase juga termasuk dalam famili protein yang berhubungan dengan proses patogenesis pada tanaman (*pathogenesis related (PR) protein*) yaitu termasuk ke dalam PR-3, 4, 8 dan 11 (Lagrimini *et al.* 1997). Kitinase mempunyai potensi yang strategis untuk pengembangan metode pengendalian patogen cendawan pada tanaman. Sekuen asam amino dari enzim kitinase klas III dari *Trichosanthes kirilowii* telah dipublikasikan oleh Savary dan Flores (1997).

Peroksidase merupakan enzim yang terlibat dalam respons tanaman terhadap patogen dan termasuk ke dalam PR-9 (Lagrimini *et al.* 1997), sedangkan Oku (1994) menyatakan bahwa peroksidase berperan dalam proses oksidasi dan polimerisasi prekursor untuk biosintesis lignin sementara lignin sendiri berfungsi sebagai barrier fisik yang dapat menghambat infeksi patogen pada tanaman. Peroksidase juga menunjukkan penghambatan terhadap pertumbuhan cendawan dalam pengujian *in vitro* (Saikia *et al.* 2006). Aktivitas peroksidase yang tinggi pada tanaman terkait dengan ketahanan tanaman yang lebih tinggi terhadap patogen seperti yang pernah dilaporkan pada kacang tanah (Pujihartati *et al.* 2006^b).

Peroksidase banyak digunakan dalam industri dan aplikasi analitik, antara lain sebagai *reagen* dalam diagnosis klinik dan enzim immunoassay (Agostini *et al.* 2002). Peroksidase juga dapat digunakan untuk perlakuan limbah air yang mengandung fenol dan amina aromatik (Klibanov *et al.*; Wu *et al.* dalam Agostini *et al.* 2002), dalam proses *biobleaching*, dalam proses degradasi lignin, produksi bahan kimia dan bahan bakar dari *pulp* kayu, produksi alkaloid dimerik, dan dalam oksidasi dan biotransformasi senyawa organik (Ryan *et al.* dalam Agostini *et al.* 2002).

Peroksidase sudah diproduksi secara komersial dari tanaman *horseradish* (*Armoracia* sp.) (Krell *et al.* dalam Agostini *et al.* 2002) dan belum pernah diproduksi dari tanaman *Trichosanthes*. Melihat luasnya potensi pemanfaatan peroksidase, maka perlu diteliti potensi tanaman lain termasuk *Trichosanthes* dalam menghasilkan peroksidase.

Protein atau enzim-enzim yang ada dalam tanaman dihasilkan dari proses biosintesis sebagai hasil langsung dari ekspresi gen penyandi protein atau enzim yang bersangkutan. Sebagian besar protein atau enzim yang berkaitan dengan respons ketahanan tanaman terhadap patogen, biosintesisnya terinduksi atau meningkat ketika tanaman terinfeksi patogen. Sejumlah senyawa tertentu seperti asam salisilat (SA), metil jasmonat (MJ), dan etephon (ETF) atau etilen (ETL) juga diketahui dapat meningkatkan ekspresi gen atau biosintesis dari protein atau enzim yang terkait dengan respon tanaman terhadap patogen. Penyemprotan senyawa-senyawa tersebut secara eksogen dapat meningkatkan ekspresi gen-gen ketahanan pada tanaman.

Eksplorasi enzim kitinase dan peroksidase dari berbagai spesies tanaman *Trichosanthes* ada di Indonesia belum banyak dilakukan. Identifikasi jenis spesies dan bagian tanaman yang menghasilkan enzim tersebut dalam jumlah yang besar dapat menjadi dasar untuk eksplorasi gen penyandi kitinase dan peroksidase maupun untuk produksi peroksidase secara komersial. Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas kitinase dan peroksidase pada jaringan tanaman *Trichosanthes* masih perlu dipelajari sehingga dapat meningkatkan biosintesis ataupun aktivitas kedua enzim tersebut.

Penelitian ini bertujuan untuk mengoleksi plasmantufah, mengamati morfologi, pertumbuhan dan perkembangan serta hama dan penyakit tanaman *Trichosanthes* di lapangan, mendapatkan kultur *in vitro* tanaman *Trichosanthes* berupa kultur tunas, kultur akar normal dan kultur akar transgenik (*hairy root*), mengevaluasi kadar protein dan aktivitas protein antimikroba/anticendawan (berupa aktivitas kitinase dan peroksidase dari berbagai bagian tanaman, menentukan perlakuan yang dapat meningkatkan aktivitas kitinase dan peroksidase dari bagian tanaman di lapang dan kultur *in vitro*, dan mengukur kemampuan protein dalam menghambat pertumbuhan mikroba (cendawan) secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

Studi Morfologi, Pertumbuhan, Perkembangan, Hama dan Penyakit 3 Spesies *Trichosanthes* di Lapangan

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Feb–Des 2006. Lokasi penelitian adalah lahan masyarakat di Desa Sinar Sari, Kecamatan Dramaga Kabupaten Bogor. Penelitian ini dilakukan dengan mengumpulkan data primer berdasarkan pengamatan pada tanaman yang ditemui atau ditanam di lapangan dan data sekunder berdasarkan hasil studi pustaka.

Bahan tanaman yang digunakan terdiri atas benih *T. cucumerina* var. *anguina*, *T. quinquangulata* dan *T. tricuspidata*. Benih *T. cucumerina* diperoleh dari Magelang, Jawa Tengah. Benih *T. quinquangulata* dan *T. tricuspidata* diperoleh dari hutan penelitian Balai Penelitian Tanaman Kehutanan Dramaga.

Benih diambil dari buah yang sudah masak dari ketiga spesies. Benih disemai dalam bak semai dengan media sekam yang dicampur dengan kompos dengan nisbah 1:1 (v/v). Bibit berumur 2–3 minggu setelah perkecambahan dipindah ke polibag dengan media tanah yang dicampur dengan pupuk kandang dengan rasio 1:1 (v/v). Polibag tanaman ditempatkan di lapangan dengan bangunan para-para untuk perambatan tanaman.

Morfologi tanaman diamati pada bentuk buah, warna buah muda, warna buah masak, ukuran buah (panjang dan diameter), warna selaput benih pada buah yang sudah masak, bentuk benih, bentuk daun muda, bentuk daun dewasa, morfologi bunga (jantan dan betina). Pengamatan pertumbuhan dan perkembangan tanaman meliputi waktu perkecambahan, pertumbuhan vegetatif, dan waktu berbunga. Pengamatan terhadap gejala serangan hama dan penyakit dan identifikasi jenis hama dan penyakit didasarkan pada pustaka yang tersedia maupun konsultasi dengan ahli hama dan penyakit tanaman.

Inisiasi Kultur *In Vitro* Tanaman *Trichosanthes* (Kultur Tunas, Kalus, Akar Normal dan Akar Transgenik (*Hairy Root*))

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Desember 2006. Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB.

Kultur Tunas *In Vitro*

Bahan dan Alat.

Bahan dan alat yang digunakan meliputi benih spesies *T. tricuspidata* dan *T. cucumerina* var. *anguina*, media dasar Murashige & Skoog (1962), auksin IAA (*Indole Acetic Acid*), sitokinin BAP (*Benzyl Amino Purine*), gula, agar, bahan-bahan untuk sterilisasi, dan bahan serta alat pendukung lainnya.

Metode Percobaan.

Pada *T. tricuspidata*, inisiasi dan multiplikasi tunas *in vitro* dilakukan dalam 2 macam media, yaitu media D3 (MS+BA 0.5mg.L⁻¹) dan D4 (MS+BA 1mg.L⁻¹). Pada *T. cucumerina* var. *anguina* inisiasi dan multiplikasi tunas dilakukan dalam media D4 (MS + BA 0,5mg.L⁻¹), D9 (MS+BA 0,5+NAA 0,1mg.L⁻¹), dan D10 (MS + BA 0,2mg.L⁻¹). Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap. Setiap perlakuan terdiri dari sekurang-kurangnya 10 botol dengan jumlah eksplan 1–2 eksplan per botol.

Pengamatan dilakukan terhadap jumlah tunas baru yang muncul selama fase kultur (sampai 4 MST).

Kultur Kalus *In Vitro*

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah tunas *in vitro* *Trichosanthes*, media MS, IAA, BAP, gula, agar, bahan-bahan untuk sterilisasi, dan bahan serta alat pendukung lainnya.

Metode Percobaan.

Induksi kalus dilakukan dalam satu percobaan dengan faktor tunggal komposisi media. Untuk menginduksi pembentukan kalus, potongan tunas *in vitro* dua buku ditanam ke dalam botol kultur dengan volume 200ml yang berisi media induksi kalus sebanyak 25ml. Media induksi kalus terdiri atas media MS dengan penambahan NAA dan BA sehingga terdapat empat perlakuan media sebagai berikut: N1B1 (1μM NAA+1 μM BA), N2B2 (2μM NAA+2μM BA), N3B3 (3 μM NAA+3μM BA) dan N4B4 (4μM NAA+4μM BA). Percobaan disusun dengan rancangan lingkungan acak lengkap. Satu unit percobaan terdiri atas satu botol kultur yang ditanami dengan empat eksplan tunas. Kalus dipelihara dalam ruang kultur gelap dengan suhu 22–24°C. Pengamatan dilakukan terhadap waktu mulai terbentuk kalus, diameter kalus dan bobot segar kalus.

Induksi dan Inisiasi Kultur Akar Rambut (Transgenik) dari *Trichosanthes*

Bahan dan Alat.

Bahan dan alat yang digunakan meliputi benih *Trichosanthes* sp., media MS 0, *Agrobacterium rhizogenes* 9457, antibiotik kanamisin dan sefotaksim.

Metode Percobaan.

Induksi akar transgenik dilakukan dengan menginokulasikan *Agrobacterium rhizogenes* ke tanaman. Metode transformasi dibedakan atas Metode 1 dan Metode 2. Pada metode transformasi 1, koloni bakteri berumur 3 hari setelah pengkulturan digunakan untuk menginokulasi bagian hipokotil bibit *in vitro*. Pada metode transformasi 2, tanaman diinokulasi dengan *Agrobacterium rhizogenes* 9457 dengan cara kokultivasi. Pengamatan hasil transformasi meliputi waktu mulai terbentuknya kalus atau akar pada daerah inokulasi atau eksplan yang diinokulasi *A. rhizogenes*, persentase eksplan berkalus, persentase eksplan berakar, jumlah akar yang terbentuk pada daerah infeksi, bentuk akar secara kualitatif, dan respons pertumbuhan akar di media MS 0 (tumbuh/tidak tumbuh).

Analisis total protein dan aktivitas protein anti-mikroba/anticendawan (kitinase dan peroksidase) dari berbagai jaringan tanaman *Trichosanthes*

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Apr–Des 2007. Lokasi penelitian adalah di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB dan untuk menyiapkan bahan tanaman dari lapang tanaman di tanam di lahan masyarakat di Desa Sinar Sari, Kecamatan Dramaga, Bogor.

T. tricuspidata

Bahan dan Alat.

Bahan tanaman yang digunakan meliputi kalus, tunas *in vitro* (TIV), daun (DLP) dan akar tanaman dari lapang (ALP). Kalus *in vitro* diinduksi dalam media MS yang terdiri dari N1B1 (1 μ M NAA+1 μ M BA), N2B2 (2 μ M NAA+2 μ M BA), N3B3 (3 μ M NAA+3 μ M BA) dan N4B4 (4 μ M NAA+4 μ M BA). Tunas *in vitro* diperbanyak dalam media D4 (MS+BA 1mg.l⁻¹). Daun dan akar *T. tricuspidata* diambil dari tanaman asal stek berumur 6 bulan sesudah tanam dengan diameter batang utama $\pm 0,5$ cm.

Analisis Total Protein Terlarut (TPT)

Total protein diekstrak dari kalus dan tunas *in vitro* serta dari daun dan akar tanaman dari lapang. Setiap jenis jaringan terdiri dari 3 contoh (3 ulangan). Jaringan tanaman sebanyak 0,5g basah, digerus dalam larutan penyangga fosfat (50mM, pH 7) dingin dengan nisbah 1:4 (b/v). Ekstraksi protein dari semua jaringan *T. tricuspidata* dilakukan dalam kondisi lingkungan yang bersuhu sekitar 4°C. Gerusan tanaman disentrifus pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditentukan total protein terlarutnya (TPT) menggunakan metode Lowry *et al.* (1951).

Analisis Aktivitas Enzim Kitinase

Aktivitas kitinase dalam ekstrak kasar protein dari jaringan tanaman yang dianalisis ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk mendegradasi substrat dimer p-nitrophenil N-asetil β -D glucosaminide (pNP-NacGluc) mengikuti metode yang digunakan oleh Pujihartati *et al.* (2006a).

Analisis Aktivitas Enzim Peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dari ekstrak kasar protein dari bagian tanaman yang dianalisis ditentukan dengan metode yang digunakan sebelumnya (Kar & Mishra 1976; Pujihartati *et al.* 2006b).

T. cucumerina var. *anguina*

Bahan tanaman yang digunakan meliputi kalus *in vitro* yang dihasilkan dalam media MS dengan perlakuan 4 taraf

NAA dan BAP yaitu 1 μ M NAA+1 μ M BA (N1B1), N2B2 (2 μ M NAA+2 μ M BA), 3 μ M NAA+3 μ M BA (N3B3), atau 4 μ M NAA+4 μ M BA (N4B4). Daun (DLP) dan akar tanaman dari lapang (ALP) diambil dari tanaman yang sudah berbuah berumur 2 bulan setelah tanam. Ekstrak kasar protein diisolasi dari kalus *in vitro*, daun dan akar tanaman dari lapang. Metode ekstraksi protein, penentuan aktivitas kitinase dan peroksidase dilakukan seperti yang dilakukan pada *T. tricuspidata*.

Induksi aktivitas protein antimikroba (kitinase dan peroksidase) pada berbagai jaringan tanaman di lapangan dan *in vitro* dengan SA/ETF

Penelitian dilaksanakan dari bulan Sep 2007–Apr 2008. Lokasi penelitian di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB.

Perlakuan SA diberikan pada kalus *T. tricuspidata* dan kalus *T. cucumerina* var. *anguina*. Perlakuan ETF diberikan pada kalus *T. tricuspidata*. Perlakuan SA atau ETF pada kalus *in vitro* diberikan dengan merendam kalus selama 15 menit dalam larutan SA atau ETF sesuai konsentrasi perlakuan, lalu ditiriskan dan ditanam kembali ke media tunas atau kalus untuk kemudian diamati pada waktu tertentu setelah perlakuan. Rincian perlakuan SA atau ETF dan waktu pengamatan total protein, aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein setelah perlakuan untuk masing-masing bahan tanaman adalah sebagai berikut:

- SA (0,0; 0,025; 0,05, dan 1,0mM) pada kalus *T. tricuspidata* *in vitro* dan analisis total protein aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak protein kasar diamati pada 1, 2, 3 HSP.
- SA (0,0; 0,025; 0,05, dan 1,0mM) pada kalus *T. cucumerina* var. *anguina* dan analisis total protein, aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein diamati pada 1, 2, 3 HSP.
- perlakuan ETF (0,0; 0,025; 0,05, dan 1,0mM) pada kalus *T. tricuspidata* dan analisis total protein, aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein diamati pada 1, 18, 26 JSP.

Analisis total protein terlarut, aktivitas kitinase dan peroksidase dilakukan pada bahan tanaman hasil perlakuan dengan metode seperti dijelaskan sebelumnya.

Uji aktivitas anticendawan *in vitro* dari ekstrak protein tanaman *Trichosanthes*

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari - Juli 2008. Lokasi penelitian untuk pembuatan kultur *in vitro* dan analisis protein adalah di Laboratorium Bioteknologi Tanaman, Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB. Pengujian aktivitas anticendawan dilakukan di Laboratorium Klinik Tanaman, Departemen Proteksi Tanaman, Faperta IPB.

Pengujian aktivitas anticendawan yang dilakukan dengan metode uji perkecambahan spora. Untuk uji perkecambahan spora digunakan ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro* *T. tricuspidata*. Tunas *in vitro* dibedakan menjadi tunas kontrol (E0, tanpa perlakuan etefon) dan tunas yang diberi perlakuan etefon (E1, perlakuan etefon 0.7 mM). Untuk uji perkecambahan spora digunakan cendawan *Fusarium* sp. asal tanaman *T. cucumerina* var. *anguina*, *Fusarium oxysporum* asal tanaman bawang merah diperoleh dari Dr. Suryo Wiyono, cendawan karat (*Puccinia arachidis*) dari tanaman kacang tanah di kebun percobaan Cikabayan, cendawan embun bulu (*Pseudoperonospora cubensis*) asal tanaman ketimun di desa Sinarsari Cibereum, dan *Curvularia eragrostidis* dari tanaman anggrek *Dendrobium* diperoleh dari Dr. Suryo Wiyono (Klinik Tanaman IPB). Pengujian aktivitas penghambatan perkecambahan spora dilakukan sebagai berikut: Sebanyak 50 μ l suspensi spora dari cendawan yang diuji diteteskan di atas gelas objek, kemudian diberi protein asal tunas *in vitro* *T. tricuspidata* (E0 dan E1) sebanyak 50 μ l, lalu diaduk pelan-pelan dengan pipet tip. Untuk kontrol positif spora diberi perlakuan benlate 1 mg/ml kontrol negatif menggunakan bufer fosfat 50mM. Gelas objek tanpa penutup ditempatkan dalam cawan petri yang diberi alas tisu lembap dan diberi pipa sedotan untuk penyangga gelas objek. Cawan petri ditutup dan ditempatkan dalam bak plastik lalu disimpan pada ruang inkubator bersuhu 28°C.

Khusus untuk cendawan *Fusarium* sp. dari *T. cucumerina* var. *anguina*, uji perkecambahan spora hanya menggunakan protein tunas *in vitro* tanpa perlakuan etefon (E0) dengan beberapa perlakuan konsentrasi protein sebagai berikut : K0=Kontrol bufer fosfat 50 mM, K1=Kontrol benlate 1mg.ml⁻¹, P1=Protein 0,77mg.ml⁻¹, P2=Protein 0,31mg.ml⁻¹, P3=Protein (0,015mg.ml⁻¹), P4=Protein 0,0077mg.ml⁻¹ (P4). Spora yang berkecambah diamati di bawah mikroskop pada waktu sekitar 24 jam setelah perlakuan dengan perbesaran maksimal 400 \times . Pengamatan meliputi jumlah spora yang berkecambah (untuk menghitung persentase perkecambahan) dan skor tingkat pertumbuhan spora sebagai berikut : + (panjang tabung kecambah \pm dari 2 kali diameter spora), ++ (panjang tabung kecambah antara 2 dan 4 kali ukuran diameter spora), +++ (untuk panjang tabung kecambah > 4 kali ukuran diameter spora).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Studi Morfologi, Pertumbuhan, Perkembangan, Hama dan Penyakit 3 Spesies *Trichosanthes* di Lapangan

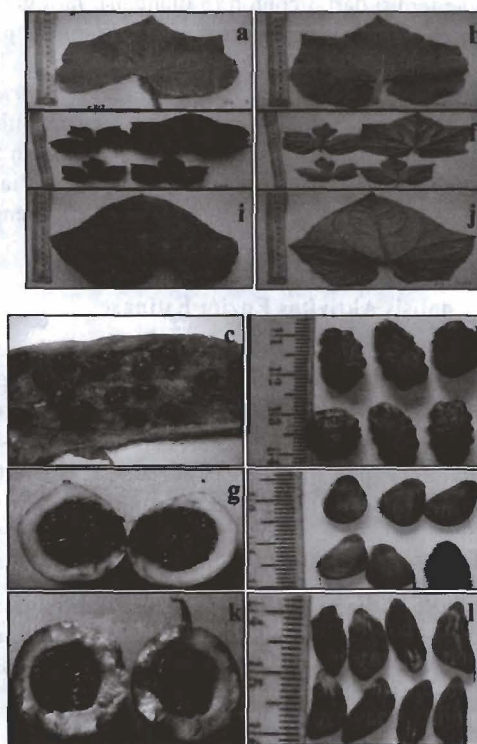
Morfologi Tanaman

Ringkasan hasil pengamatan morfologi tanaman seperti terlihat pada Tabel 1. Perbedaan yang mencolok dari ketiga spesies adalah dalam bentuk buah antara *T. cucumerina* var. *anguina* dengan dua spesies lainnya. *T.*

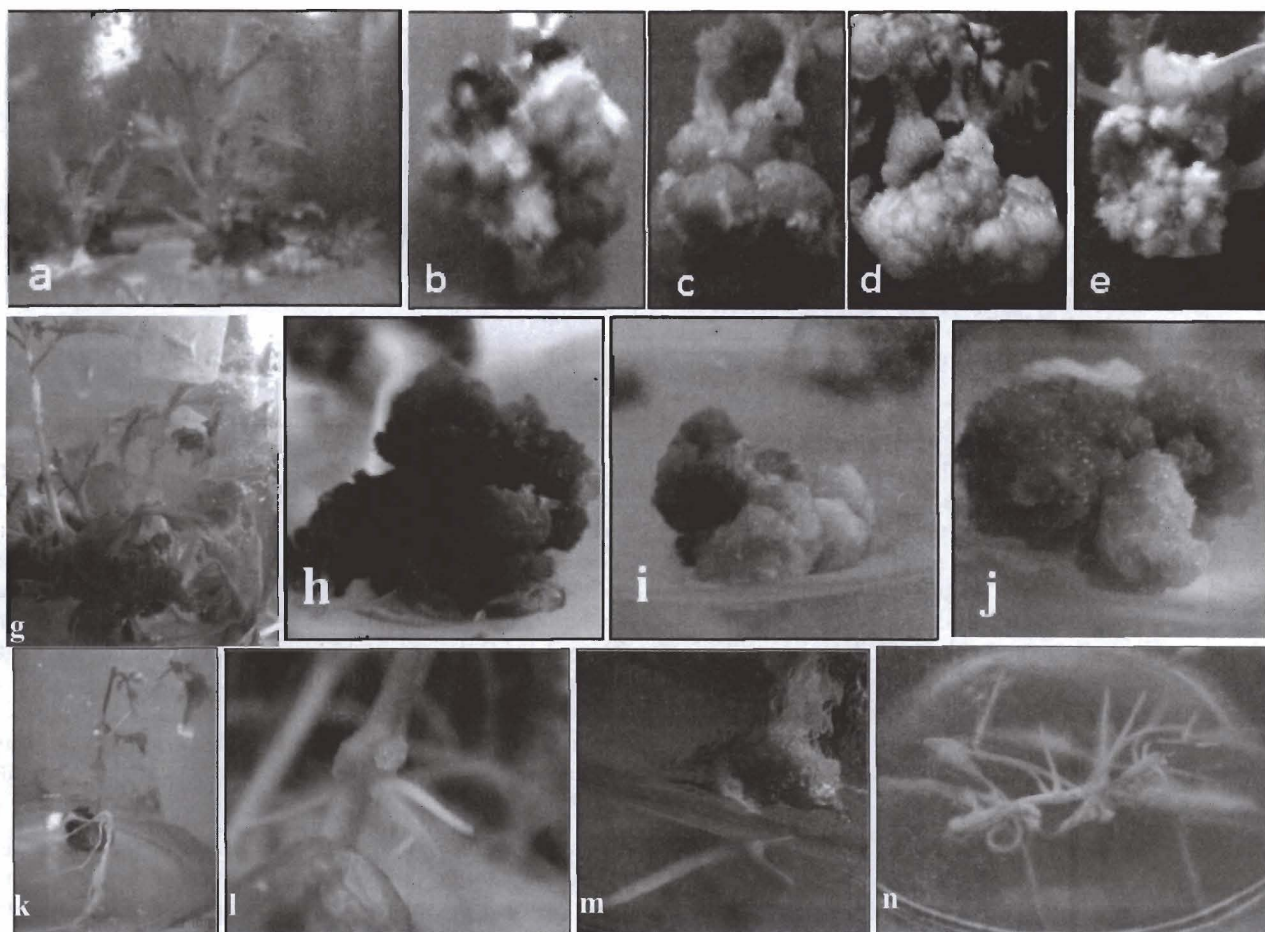
cucumerina var. *anguina* memiliki bentuk buah yang panjang (*cyllindrical*) seperti ular. Sebaliknya *T. tricuspidata* memiliki bentuk buah bulat lonjong (*ovoid* atau elipsoid) dan *T. quinquangulata* memiliki bentuk buah bulat (*globose*).

T. cucumerina var. *anguina* memiliki kulit buah yang berwarna hijau bergaris-garis putih tidak beraturan. Makin tua umur buah, warna putih makin dominan dan buah berubah menjadi kuning-oranye ketika sudah masak. *T. tricuspidata* dan *T. quinquangulata* berwarna hijau muda ketika buah masih muda, selanjutnya buah akan berwarna merah ketika sudah tua.

Daun *Trichosanthes* merupakan daun sederhana yang memiliki pola dasar segi lima hingga segi delapan atau memiliki kerangka *ovate* atau *orbicular* (Rugayah 1999). Daun memiliki lekukan yang kedalamannya bervariasi antarspesies. Warna daun *T. cucumerina* var. *anguina* hijau muda, daun *T. tricuspidata* berwarna hijau tua dan daun *T. quinquangulata* berwarna hijau keperakan. Tulang daun memiliki pola menjari muncul dari ujung petiol dengan 5 tulang daun utama. Daun *T. tricuspidata* pada awal pertumbuhan berbentuk menjari dengan lekukan yang dalam, namun setelah tanaman dewasa, bentuk daun tanaman berubah dimana lekukan pada daun menjadi tidak begitu dalam. Perbedaan morfologi daun muda dan daun dewasa pada *T. tricuspidata* disebut dengan dimorfisme daun (Rugayah 1999). Morfologi daun, buah dan biji ketiga spesies yang diamati seperti terlihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi Daun Buah dan Biji Tanaman : *T. cucumerina* var. *anguina* (a-d), *T. Tricuspidata* (e-h), *T. quinquangulata* (i-l).



Gambar 2. Morfologi Tunas, Kalus dan Kandidat hairy root dari *Trichosanthes* dalam Kultur *in vitro*

Tabel 1 Ringkasan Karakter Morfologi Buah *T. cucumerina* var. *anguina*, *T. tricuspidata* dan *T. quinquangulata*.

Karakter	<i>T. cucumerina</i>	<i>T. tricuspidata</i>	<i>T. quinquangulata</i>
Warna buah muda	hijau belang-belang putih	hijau	hijau
Warna buah masak	kuning-oranye-merah	merah	merah
Warna kulit benih	coklat kehitaman	coklat	coklat
Bentuk pinggir benih	bergerigi	licin	licin
Warna selaput benih	merah	hitam	hitam
Panjang daun membujur (cm)	10,2–20,3	7,5–15,3	9,1–15,2
Panjang daun melintang	8,4–18,5	5,2–15,5	8,2–20,3
Permukaan daun	Berbulu halus	Berbulu kasar	Berbulu kasar
Panjang buah (cm)	40–150	7,0–9,0	5,5–8,5
Lebar buah (cm)	3,5–5,5	5,5–7,5	6,5–6,5
Panjang benih (cm)	1,4–1,8	1,1–1,2	1,1–1,3
Lebar benih (cm)	0,6–0,9	0,5–0,7	0,4–0,5
Tebal benih (cm)	0,3–0,4	0,9–1,1	0,9–1,1

Pertumbuhan dan Perkembangan Tanaman

Kecambah *T. tricuspidata* muncul setelah 8–10 hari setelah semai (HSS), pada *T. quinquangulata* kecambah muncul pada 14 hingga 18 HSS. Waktu muncul kecambah untuk *T. tricuspidata* lebih cepat sekitar 4 hari

dibandingkan *T. quinquangulata*. Kecambah *T. cucumerina* var. *anguina* muncul setelah 10–14 HSS. Pertumbuhan vegetatif *T. tricuspidata* dan *T. quinquangulata* berlangsung cukup lama. Pembungaan pada *T. Tricuspidata* baru terjadi pada umur tanaman sekitar 5 bulan setelah tanam. Bunga yang pertama muncul adalah bunga jantan

Tabel 2. Jumlah Tunas *Trichosanthes* pada Sub Kultur 1 dalam Media Multiplikasi *In Vitro*.

Media Perbanyakkan	Jumlah Tunas Awal	Jumlah Tunas		
		2 MST	3 MST	4 MST
D3 (MS + BA 0,5 mg/l)	1	2,0	3,6	3,9
D4 (MS + BA 1 mg/l)	1	2,0	2,9	3,8

Tabel 3. Jumlah Tunas *T. cucumerina* pada Sub Kultur 1 dalam Media Multiplikasi *In Vitro*.

Media Perbanyakkan	Jumlah Tunas Awal	Jumlah Tunas pada 4 MST
D4 (MS + BA 0,1 mg.l ⁻¹)	1	6,3
D9 (MS + BA 0,5 + NAA 0,1 mg.l ⁻¹)	1	2,0
D10 (MS + BA 0,2 mg.l ⁻¹)	1	2,0

Tidak semua tanaman menghasilkan bunga pada saat yang sama. *T. quinquangulata* belum membentuk bunga meskipun usia tanaman sudah mencapai 7 bulan setelah tanam. Sebaliknya, *T. cucumerina* var. *anguina* telah berbunga pada 6–8 MST. Pada awal pembungaan jenis bunga yang muncul pada buku batang adalah bunga jantan. Namun pada buku-buku selanjutnya keluar bunga betina. Tanaman *T. cucumerina* var. *anguina* merupakan tanaman semusim (annual), sehingga dari mulai berkecambah sampai tanaman menyelesaikan siklus hidupnya lalu mati berkisar antara 6 dan 7 bulan. Sebaliknya *T. tricuspidata* dan *T. quinquangulata* bersifat tahunan (perennial), sehingga siklus hidup dapat berlangsung lebih dari satu musim atau satu tahun.

Hama dan Penyakit Tanaman

Pada fase bibit, ketiga spesies (*T. cucumerina* var. *anguina*, *T. tricuspidata*, *T. quinquangulata*) terserang oleh penggerek daun. *T. tricuspidata* hampir tidak mengalami gejala serangan hama maupun penyakit kecuali pada fase bibit. Berdasarkan penampilan tanaman di lapang menunjukkan bahwa gejala serangan hama dan penyakit paling banyak ditemukan pada *T. cucumerina* var. *anguina*. Hama *Epilachna* banyak menyerang daun dewasa dari *T. cucumerina* var. *anguina*, sementara buah banyak diserang oleh hama dari jenis Hemiptera (Coreidae). *T. cucumerina* var. *anguina* juga diserang oleh hama ulat daun. *T. quinquangulata* terlihat mengalami penyakit yang menyebabkan daun mengeriting yang diduga karena adanya

hama kepik yang menghisap cairan daun. Pada bagian bawah permukaan daun *T. quinquangulata*, terlihat dari adanya bekas tusukan stilet serangga kepik. Beberapa gejala penyakit yang menyerang *T. cucumerina* var. *anguina* adalah busuk batang, gejala bercak daun, busuk daun, embun bulu dan busuk ujung buah. Bercak daun dapat menyebar di hampir seluruh permukaan daun sehingga daun menjadi berlubang-lubang dan sobek.

Inisiasi Kultur *In Vitro* Tanaman *Trichosanthes* (Kultur Tunas, Kalus, Akar Normal dan Akar Transgenik (Hairy Root))

Inisiasi dan multiplikasi tunas *in vitro* telah dilakukan pada dua spesies yaitu *T. tricuspidata* dan *T. cucumerina* var. *anguina*. Eksplan awal berupa potongan batang satu buku atau pucuk 1–2 buku dari bibit *in vitro* ditanam dalam media inisiasi dan multiplikasi tunas. Eksplan dipelihara dalam media selama 4–6 minggu kemudian disub kultur ke media baru dengan komposisi yang sama. Media yang digunakan untuk *T. tricuspidata* terdiri dari media D3 (MS+BA 0,5mg.l⁻¹) dan D4 (MS+1mg.l⁻¹), untuk *T. cucumerina* pada media D4, D9 (MS+BA 0,5mg.l⁻¹+NAA 0,1mg.l⁻¹) dan D10 (MS+BA 0,2mg.l⁻¹). Rata-rata jumlah tunas *T. tricuspidata* dan *T. cucumerina* yang dihasilkan pada media tersebut seperti terlihat pada Tabel 2 dan 3. Morfologi tunas seperti terlihat pada Gambar 2a dan 2f. Selanjutnya untuk pemeliharaan di laboratorium tunas tanaman tersebut dipelihara dalam media D4 (MS+1mg.l⁻¹) dan disub kultur setiap 4–6 minggu sekali.

Tabel 4. Rataan Bobot Kalus *T. tricuspidata* pada 4 MST dari Berbagai Komposisi Media MS dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA dan BA.

Perlakuan	Rataan bobot basah kalus (g)		
	Kalus per eksplan	Kalus per botol	Biomasa per botol kultur
N1B1	0,19	0,76	1,16
N2B2	0,31	1,24	1,38
N3B3	0,30	1,20	1,29
N4B4	0,31	1,24	1,27

Keterangan: Kalus diinduksi dalam media N1B1 (1 μ M NAA + 1 μ M BA), N2B2 (2 μ M NAA + 2 μ M BA), N3B3 (3 μ M NAA + 3 μ M BA) dan N4B4 (4 μ M NAA + 4 μ M BA).

Kalus *T. tricuspidata* dapat terbentuk dari eksplan tunas yang ditanam pada empat komposisi media yang diuji (Tabel 4). Kalus mulai terbentuk pada 1 MST terutama pada media N1B1 dan N2B2 serta pada 2 MST pada media N3B3 dan N4B4. Rataan bobot kalus per eksplan yang diperoleh masih kurang dari 0,5g seperti terlihat pada Tabel 4. Karena dalam setiap botol terdapat 4 eksplan maka total bobot kalus per botol yang dihasilkan sekitar 1,2g. Morfologi kalus *T. tricuspidata* seperti terlihat pada Gambar 2b–2e.

Kalus *T. cucumerina* dapat dihasilkan pada empat komposisi media yang diuji N1B1 (1 μ M NAA+1 μ M BA), N2B2 (2 μ M NAA+2 μ M BA), N3B3 (3 μ M NAA+3 μ M BA) dan N4B4 (4 μ M NAA+4 μ M BA). Namun sebagian besar kalus pada media N2B2 terkontaminasi pada minggu ke-2 sehingga pengamatan tidak dapat dilanjutkan. Selanjutnya kalus yang dianalisis adalah dari media N1B1, N3B3 dan N4B4. Ketiga komposisi media tersebut memiliki nisbah auksin dan sitokinin yang sama namun dengan konsentrasi yang berbeda. Bobot kalus yang

dihasilkan pada ketiga komposisi media tidak berbeda nyata (Tabel 5). Morfologi kalus pada 3 komposisi media yang diuji terlihat agak berbeda antara kalus pada media N1B1 dengan kalus pada media N3B3 dan N4B4 seperti terlihat pada Gambar 2h–2j. Kalus pada media N1B1 berwarna kecokelatan sementara pada media N3B3 dan N4B4 berwarna putih dan kecokelatan pada beberapa bagiannya.

Untuk induksi kultur akar rambut (transgenik), dalam penelitian ini telah dilakukan 2 metode transformasi pada 2 spesies *Trichosanthes* yaitu *T. cucumerina* var. *anguina* dan *T. tricuspidata*. Pada metode transformasi 1, bagian hipokotil bibit tanaman hasil perkecambahan *in vitro*, potongan batang, daun ataupun kotiledon ditusuk atau dilukai dengan jarum preparat yang sudah dicelupkan ke koloni *Agrobacterium rhizogenes* 9457. Pada metode transformasi 2, eksplan seperti potongan tunas satu buku dan kalus dipotong-potong dalam suspensi *Agrobacterium* dan dikokultivasi selama 2 hari. Rekapitulasi jumlah eksplan yang sudah diinfeksi/diinokulasi disajikan pada Tabel 6. Persentase keberhasilan pembentukan akar pada

Tabel 5. Rataan Bobot Kalus *T. cucumerina* var. *anguina* pada 4 MST dari Berbagai Komposisi Media MS dengan Penambahan Berbagai Konsentrasi NAA dan BA

Perlakuan	% eksplan berkalus	Jumlah akar pada kalus	Bobot kalus/ eksplan (g)	Bobot kalus per botol (g)
N1B1	100%	0	0,75	2,25
N2B2	100%	0	-*	-
N3B3	100%	0	0,64	2,06
N4B4	100%	0	1,14	2,37

Keterangan: *Kalus terkontaminasi bakteri sehingga tidak didapatkan data bobot akhir

Tabel 6. Rekapitulasi Infeksi *Trichosanthes* sp. dengan *Agrobacterium rhizogenes* 9457

Jenis Tanaman	Eksplan yang diinfeksi	Jumlah (ekspla)	Pembentukan Kalus di lokasi infeksi (%) pada 3 MSI	Pembentukan Akar di Lokasi Infeksi (%) pada 3 MSI
Metode Transformasi 1				
<i>T. tricuspidata</i>	Batang tunas <i>in vitro</i>	39	0 (0%)	4 (10%)
	Hipokotil	14	0 (0%)	2 (14,2%)
	Total	53	0 (0%)	6 (11,3%)
<i>T. cucumerina</i> var. <i>anguina</i>	Batang tunas <i>in vitro</i>	40	5 (12,5%)	8 (20%)
	Hipokotil	22	6 (27,2%)	4 (18,8%)
	Kotiledon	17	0 (0%)	0 (0,0%)
	Total	79	11(13,9%)	12 (15,2%)
<i>T. quinqueangulata</i>	Hipokotil	14	0 (%)	1 (7%)
Metode Transformasi 2				
<i>T. tricuspidata</i>	Potongan tunas <i>in vitro</i>	75		1 (1,3%)
<i>T. cucumerina</i> var. <i>anguina</i>	Kalus	91	*	12 (13,2%)
	Daun	8	0 (0%)	1 (12,5%)
	Tunas	9	0 (0%)	0 (0%)
	Total	108		13 (12,0%)

*Kalus tidak diamati karena sulit dibedakan antara kalus asal dengan kalus yang baru terbentuk.

Tabel 7. Rekapitulasi Hasil Transformasi dan Pertumbuhan Kandidat Akar Transgenik pada Sub Kultur 1–3.

Spesies	Tahapan Kultur	Jumlah	Tumbuh	Tidak Tumbuh	Kontaminasi
<i>T. tricuspidata</i>	Transformasi	6	6	-	-
	Sub Kultur 1	6	3	3	3
	Sub Kultur 2	0	0	-	-
<i>T. cucumerina</i> var. <i>anguina</i>	Transformasi	25	25	1	0
	Sub Kultur 1	24	24		7
	Sub Kultur 2	29	20	9	6
	Sub Kultur 3	35	27	8	27

lokasi infeksi dari spesies-spesies yang ditransformasi dengan *A. rhizogenes* masih cukup rendah. Kandidat akar transgenik yang dihasilkan dari hasil transformasi dievaluasi pertumbuhannya dalam media MS yang ditambahkan antibiotik cefotaxim untuk membunuh sisa-sisa *Agrobacterium*. Sebagian kandidat akar mati karena pertumbuhan bakteri *Agrobacterium* yang berlebihan atau kontaminasi cendawan dan sebagian lainnya tidak menunjukkan pertumbuhan. Hasil evaluasi pertumbuhan kandidat akar transgenik seperti terlihat pada Tabel 7. Morfologi salah satu kandidat akar transgenik seperti terlihat pada Gambar 2k–2n.

Analisis total protein dan aktivitas protein antimikroba/anticydawan (kitinase dan peroksidase) dari berbagai jaringan tanaman *Trichosanthes*.

T. tricuspidata

Tabel 8 menunjukkan hasil analisis total protein, kitinase dan peroksidase pada berbagai jaringan tanaman *T. tricuspidata*. Aktivitas enzim kitinase per mg protein tertinggi ditemukan pada ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro* berbeda nyata dengan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein dari jaringan kalus *in vitro*, daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. Aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein dari akar tidak berbeda nyata

Tabel 8 Nilai Total Protein Terlarut, Kadar Protein, Aktivitas Kitinase Dan Peroksidase Pada Ekstrak Kasar Protein Dari Berbagai Jaringan Tanaman *T. tricuspidata*.

Jaringan Tanaman	Total Protein Terlarut (mg.ml ⁻¹)	Kadar Protein (mg.g ⁻¹ bahan segar)	Aktivitas Kitinase (mM pNP per jam per miligram protein)	Aktivitas Kitinase (mM pNP per jam per gram bobot segar jaringan tanaman)
Kalus N1B1	3,24 ^a	12,95 ^a	1,22 ^c	15,57 ^{ab}
Kalus N2B2	2,68 ^{ab}	10,73 ^{ab}	1,72 ^{bc}	16,23 ^{ab}
Kalus N3B3	2,21 ^{bc}	8,83 ^{bc}	1,89 ^{bc}	16,13 ^{ab}
Kalus N4B4	1,62 ^{cd}	6,50 ^{cd}	2,98 ^{bc}	18,70 ^a
Tunas <i>In Vitro</i> (TIV)	0,74 ^d	2,95 ^d	6,51 ^a	17,63 ^a
Daun Lapang (DLP)	1,54 ^{cd}	6,17 ^{cd}	1,26 ^c	7,95 ^c
Akar Lapang (ALP)	0,86 ^d	3,46 ^d	3,35 ^b	10,35 ^{bc}

Keterangan: Kalus diinduksi dalam media N1B1 (1 μ M NAA + 1 μ M BA), N2B2 (2 μ M NAA + 2 μ M BA), N3B3 (3 μ M NAA + 3 μ M BA) dan N4B4 (4 μ M NAA + 4 μ M BA). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=0,05$.

Tabel 9 Nilai Total Protein Terlarut, Kadar Protein, Aktivitas Kitinase Dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein dari Berbagai Jaringan Tanaman *T.cucumerina* var. *anguina*

Bahan Tanaman	Total protein terlarut (mg/ml)	Kadar Protein Jaringan (mg/g BS)	Aktivitas kitinase (mM pNp/jam/mg protein)	Aktivitas kitinase (mM pNp/jam/g BS)
Kalus N1B1	0,010 ^b	5,18 ^{bc}	4,03 ^a	22,37 ^{ab}
Kalus N2B2	-	-	-	-
Kalus N3B3	1,76 ^b	7,07 ^b	2,66 ^{ab}	17,03 ^{bc}
Kalus N4B4	0,99 ^{bc}	3,96 ^{bc}	6,03 ^a	23,64 ^a
Daun Lapang (DLP)	5,17 ^a	20,69 ^a	0,21 ^b	4,67 ^d
Akar Lapang (ALP)	0,44 ^c	1,78 ^b	7,70 ^a	11,17 ^c

Keterangan: Kalus diinduksi dalam media N1B1 (1 μ M NAA + 1 μ M BA), N2B2 (2 μ M NAA + 2 μ M BA), N3B3 (3 μ M NAA + 3 μ M BA) dan N4B4 (4 μ M NAA + 4 μ M BA). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama dalam satu kolom tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=0.05$.

dengan aktivitas kitinase dari kalus yang ditumbuhkan dalam media N2B2, N3B3 dan N4B4, tetapi nyata lebih tinggi dibandingkan dari kalus yang ditumbuhkan dalam media N1B1. Aktivitas peroksidase tertinggi (0,25 [Δ 420 per menit per mg protein]) ditemukan pada ekstrak kasar protein dari akar tanaman dari lapangan, tetapi nilainya hanya berbeda nyata dengan aktivitas peroksidase pada ekstrak kasar protein dari kalus yang ditumbuhkan pada media N1B1, N2B2 dan N3B3.

Aktivitas peroksidase per mg protein nyata paling tinggi pada ekstrak kasar protein akar tanaman dari lapang dan paling rendah pada ekstrak kasar protein daun tanaman. Ekstrak kasar protein akar mencapai 19 kali lipat aktivitas peroksidase dari ekstrak kasar protein daun. Aktivitas peroksidase per mg protein dari ekstrak kasar protein kalus dari ketiga komposisi media yang diuji tidak berbeda nyata

satu sama lainnya. Sementara ekstrak kasar protein dari daun memiliki aktivitas peroksidase yang tidak berbeda nyata dengan aktivitas peroksidase dari ekstrak kasar protein kalus dari ketiga komposisi media.

Induksi aktivitas protein antimikroba (kitinase dan peroksidase) pada berbagai jaringan tanaman di lapangan dan *in vitro* dengan SA/ETF.

Induksi dengan SA pada Kalus *T. tricuspidata*

Tabel 10 menunjukkan pengaruh perlakuan SA aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein kalus. Aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein kalus meningkat dengan perlakuan SA atau dengan bertambahnya waktu setelah perlakuan. Pada SA 0,00mM, aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus tidak berbeda

Tabel 10. Rataan TPT, Aktivitas Kitinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein dari Kalus *in vitro* *T. tricuspidata* yang Diberi Perlakuan SA

SA (mM)	1 HSP	2 HSP	3 HSP	Rataan SA
Aktivitas kitinase (mM pNp per jam per miligram protein)				
0,00	1,47 ^{b*}	1,18 ^b	2,55 ^b	1,69 ^B
0,05	1,91 ^b	1,09 ^b	7,78 ^a	3,36 ^A
0,10	2,31 ^b	1,92 ^b	6,40 ^a	3,54 ^A
Rataan waktu	1,39 ^B	1,85 ^B	5,58 ^A	
Aktivitas peroksidase (Δ 420 per menit per miligram protein)				
0,00	0,03 ^b	0,04 ^b	0,09 ^b	0,05 ^B
0,05	0,03 ^b	0,05 ^b	0,35 ^a	0,13 ^A
0,10	0,04 ^b	0,05 ^b	0,31 ^a	0,13 ^A
Rataan waktu	0,03 ^B	0,05 ^B	0,25 ^A	

Keterangan: *Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris dan kolom dari peubah yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$. **Angka yang diikuti huruf besar yang sama pada baris atau kolom dari peubah sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$.

Tabel 11. Rataan TPT, Aktivitas Ki tinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein dari Kalus *in vitro* *T. cucumerina* yang Diberi Perlakuan SA

SA (mM)	1 HSP	2 HSP	3 HSP	Rataan SA
Aktivitas kitinase (mM pNp per jam per mg protein)				
0,00	3,65	7,95	2,38	4,66
0,03	3,63	4,89	3,36	4,57
0,05	5,48	5,35	3,16	3,96
0,10	4,76	5,17	3,06	4,33
Rataan waktu	4,38 ^b	5,88 ^a	2,99 ^b	
Aktivitas peroksidase (? 420 per menit per mg protein)				
0,00	0,04 ^{c*}	0,05 ^c	0,10 ^{bc}	0,06 ^{B**}
0,03	0,04 ^c	0,09 ^{bc}	0,14 ^b	0,09 ^{AB}
0,05	0,05 ^c	0,17 ^{ab}	0,13 ^b	0,11 ^A
0,10	0,05 ^c	0,10 ^{bc}	0,22 ^a	0,12 ^A
Rataan waktu	0,04 ^C	0,10 ^B	0,15 ^A	

Keterangan: *Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris dan kolom dari peubah yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$. Angka yang diikuti huruf besar yang sama pada baris atau kolom dari peubah yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$.

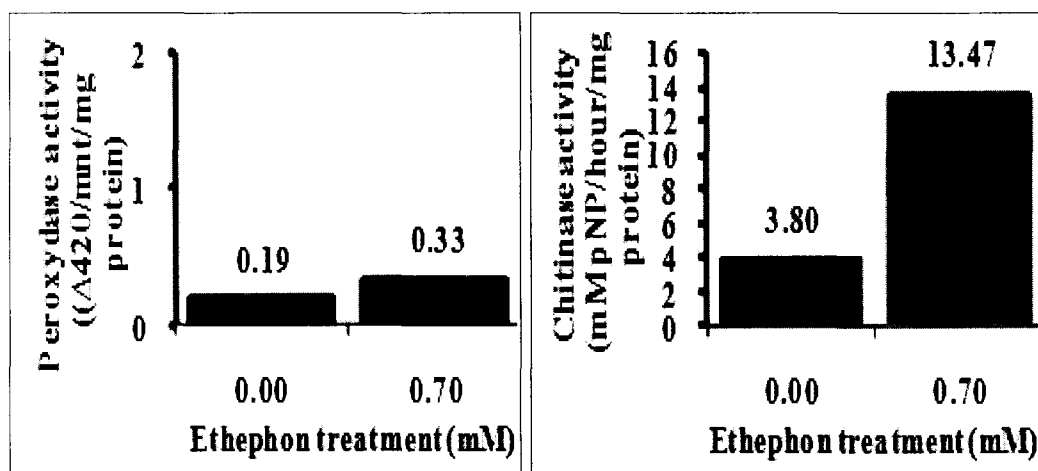
nyata pada 1, 2 dan 3 HSP. Sebaliknya pada perlakuan SA 0,05 dan 0,10mM, aktivitas kitinase nyata meningkat pada 3 HSP dan lebih tinggi dari pada aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein kalus pada 1 dan 2 HSP.

Pengaruh perlakuan SA dan waktu pengamatan terhadap aktivitas peroksidase dari ekstrak kasar protein kalus menyerupai pengaruh perlakuan SA dan waktu pengamatan terhadap aktivitas kitinase. Aktivitas peroksidase pada perlakuan SA 0,00mM (kontrol) tidak berbeda nyata pada 1, 2 dan 3 HSP. Sebaliknya pada perlakuan SA 0,05 dan 0,10mM, aktivitas peroksidase meningkat nyata pada 3 HSP. Peningkatan aktivitas peroksidase pada perlakuan SA 0,05 dan 0,10mM pada 3 HSP mencapai 6–7 kali lipat dibandingkan aktivitas

peroksidase pada 2 HSP.

Induksi dengan SA pada Kalus *T. cucumerina* var. *Anguina*

Aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein kalus tidak dipengaruhi secara nyata oleh perlakuan SA namun nyata dipengaruhi oleh waktu setelah perlakuan asam salisilat. Interaksi perlakuan SA dan waktu juga tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus. Rataan nilai aktivitas kitinase pada berbagai waktu pengamatan setelah perlakuan seperti terlihat pada Tabel 11. Aktivitas peroksidase pada ekstrak kasar protein kalus dipengaruhi secara nyata oleh



Gambar 3. Aktivitas kitinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein Tunas *In Vitro* *T. tricuspidata* Setelah Perlakuan Etefon.

Tabel 12. Rataan TPT, Aktivitas Kitinase dan Peroksidase pada Ekstrak Kasar Protein dari Kalus *In Vitro T. tricuspidata* yang diberi perlakuan ETF

ETF (mM)	0 JSP	18 JSP	26 JSP	Rataan ETF
Aktivitas kitinase (mM pNp per jam per mg protein)				
0,00	0,13 ^{b*}	4,47 ^a	6,14 ^a	3,47 ^{B**}
0,03	0,13 ^b	7,21 ^a	5,12 ^a	4,59 ^{AB}
0,05	5,65 ^a	5,02 ^a	0,20 ^b	3,62 ^B
0,10	6,58 ^a	4,36 ^a	4,97 ^a	5,25 ^A
Rataan waktu	3,07 ^B	5,43 ^A	4,01 ^B	
Aktivitas peroksidase ($\Delta 420$ per menit per mg protein)				
0,00	5,20 ^a	6,65 ^a	1,98 ^{bc}	4,61 ^A
0,03	7,20 ^a	4,26 ^{ab}	3,92 ^{abc}	5,13 ^A
0,05	5,00 ^a	1,41 ^c	3,39 ^{abc}	3,26 ^{AB}
0,10	4,39 ^{ab}	1,94 ^{bc}	1,44 ^c	2,67 ^B
Rataan waktu	5,44 ^A	3,71 ^B	2,68 ^B	

Keterangan: JSP = Jam Setelah Perlakuan. *Angka yang diikuti huruf kecil yang sama pada baris atau kolom dari peubah yang sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$. Angka yang diikuti huruf besar yang sama pada baris atau kolom sama tidak berbeda nyata pada uji DMRT dengan $\alpha=5\%$.

konsentrasi SA, waktu pengamatan dan interaksi antara konsentrasi SA dan waktu setelah perlakuan SA. Peningkatan aktivitas peroksidase terlihat dengan bertambahnya waktu setelah perlakuan seperti terlihat pada perlakuan SA 0,025 dan 0,10mM. Namun pada SA 0,05mM peningkatan secara cepat terjadi pada 2 HSP dan menurun kembali pada 3 HSP SA.

Induksi dengan ETF pada kalus *T. tricuspidata*

Pengaruh perlakuan ETF terhadap aktivitas kitinase dan peroksidase kalus *T. tricuspidata* seperti terlihat pada Tabel 12. Perlakuan ETF 0,025–0,10mM dapat meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein. Aktivitas kitinase pada 18 JSP nyata lebih tinggi dari 1 maupun 26 JSP. Peningkatan aktivitas kitinase terjadi dengan cepat (1 JSP) setelah perlakuan ETF terutama pada 0,05 dan 0,10mM. Pada ETF 0,025mM peningkatan aktivitas terlihat lebih lambat, dengan aktivitas tertinggi pada 18 JSP. Sementara pada perlakuan ETF 0,00mM (kontrol) juga terjadi peningkatan aktivitas kitinase seiring dengan bertambahnya waktu setelah perlakuan, namun dengan laju peningkatan yang lebih lambat dan masih terus meningkat sampai 26 JSP. Aktivitas peroksidase dari ekstrak kasar protein asal kalus menurun pada jangka waktu 1 jam dan 26 jam setelah perlakuan kecuali pada ETF 0,00 mM (kontrol) seperti terlihat pada Tabel 13. Peningkatan konsentrasi ETF cenderung menekan aktivitas peroksidase dalam jangka waktu pengamatan 1,18 dan 26 JSP.

Uji aktivitas anticendawan *in vitro* dari ekstrak protein tanaman *Trichosanthes*

Perlakuan ETF 0,7 mM dapat meningkatkan aktivitas kitinase dan peroksidase dari ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro* seperti terlihat pada Gambar 3. Ekstrak kasar dari protein asal tunas *in vitro T. tricuspidata* yang tidak diperlakukan ETF (E0) dapat menghambat perkecambahan spora seperti terlihat pada Tabel 13. Pada konsentrasi protein 0,77 mg.ml⁻¹, perkecambahan spora hanya 24%, dan makin meningkat menjadi 45% ketika protein diencerkan menjadi 1/25 dari konsentrasi awal 0,77mg.ml⁻¹ menjadi 0,031mg.ml⁻¹. Persentase perkecambahan spora meningkat menjadi 54% pada konsentrasi protein 0,015mg.ml⁻¹ yang merupakan hasil pengenceran 1/50 konsentrasi awal. Efek penghambatan perkecambahan spora bahkan masih terjadi ketika protein diencerkan menjadi 1/100 konsentrasi awal dengan persentase perkecambahan spora sekitar 65%.

Hasil pengujian penghambatan perkecambahan spora pada 4 cendawan patogen tanaman disajikan pada Tabel 15. Ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro T. tricuspidata* yang tidak diberi perlakuan ETF (E0) ataupun yang diberik perlakuan ETF 0,7mM (E1) dapat menghambat perkecambahan spora *Fusarium oxysporum* (isolat dari bawang merah), *Puccinia arachidis* (isolat kacang tanah), dan *Pseudoperonospora cubensis* (isolat ketimun). Pengaruh penghambatan juga terlihat dari terhambatnya pertumbuhan tabung kecambah. Namun ekstrak kasar protein tersebut

Tabel 14 Presentase Perkecambahan Spora dan Skor Panjang Tabung Kecambah pada Uji Perkecambahan Spora Cendawan dengan Protein Asal Tunas *in vitro* *T. tricuspidata*.

Germination Medium	Spora Berkecambah (%)	Skor panjang tabung kecambah*
<i>Fusarium oxysporum</i>		
K0 (buffer posfat 50mM, pH 6.0)	70 a	+++
K1 (Benomyl 0,5mg.ml ⁻¹)	3 c	++
Protein E0 (protein tunas kontrol)	19 b	++
Protein E1 (protein tunas dengan perlakuan ETF 0,7mM)	25 b	++
<i>Puccinia arachidis</i>		
K0 (phosphate buffer 50mM, pH 6.0)	14 a	+++
K1 (Benomyl 0,5mg.ml ⁻¹)	0 c	-
Protein E0 (protein tunas kontrol)	3 b	++
Protein E1 (protein tunas dengan perlakuan ETF 0,7mM)	2 b	++
<i>Pseudoperonospora cubensis</i>		
K0 (phosphate buffer 50mM, pH 6.0)	9 a	+
K1 (Benomyl 0,5mg.ml ⁻¹)	0 c	-
Protein E0 (protein tunas kontrol)	4 b	+
Protein E1 (protein tunas dengan perlakuan ETF 0,7mM)	2 b	+
<i>Curvularia eragrostidis</i>		
K0 (phosphate buffer 50mM, pH 6.0)	100 a	+
K1 (Benomyl 0,5mg.ml ⁻¹)	0 b	-
Protein E0 (protein tunas kontrol)	100 a	+++
Protein E1 (protein tunas dengan perlakuan ETF 0,7mM)	100 a	+++

Keterangan: *pertumbuhan tabung kecambah: + (panjang tabung kecambah < 2 kali diameter spora), ++ (panjang tabung kecambah 2-4 kali diameter spora), +++ (panjang tabung kecambah > 4 kali diameter spora)

tidak dapat menghambat perkecambahan spora *Curvularia eragrostidis* (isolat dari anggrek).

Secara keseluruhan hasil utama dari penelitian menunjukkan potensi spesies *Trichosanthes* yang ada di Indonesia sebagai sumber enzim kitinase dan peroksidase

yang dapat dimanfaatkan lebih lanjut untuk berbagai keperluan. Kandungan enzim kitinase dan peroksidase pada tanaman *T. tricuspidata* dan *T. cucumerina* var. *anguina* yang direpresentasikan dalam bentuk aktivitas kedua enzim tersebut tidak sama pada berbagai jaringan tanaman yang

Tabel 13. Perkecambahan spora dan Pertumbuhan Tabung Kecambah pada Uji Perkecambahan Spora *Fusarium* asal *T. cucumerina* var. *anguina* dengan Protein Asal Tunas *in vitro* *T. tricuspidata*

Media perkecambahan	Spora Berkecambah (%)	Panjang tabung kecambah*
K0 (phosphate buffer 50 mM, pH 6.0)	100 ^a	+++
K1 (Benomyl 0,5 mg.ml ⁻¹)	2 ^e	-
P1 (protein 0,77 mg.ml ⁻¹)	24 ^d	+
P2 (protein 0,031 mg.ml ⁻¹)	45 ^c	+
P3 (protein 0,015 mg.ml ⁻¹)	54 ^{bc}	++
P4 (protein 0,0077 mg.ml ⁻¹)	65 ^b	++

Keterangan: *pertumbuhan tabung kecambah: + (panjang tabung kecambah < 2 kali diameter spora), ++ (panjang tabung kecambah 2-4 kali diameter spora), +++ (panjang tabung kecambah > 4 kali diameter spora)

diuji. Oleh karena itu hasil penelitian ini dapat mengarahkan penelitian selanjutnya untuk lebih fokus meneliti kandungan enzim maupun ekspresi molekuler yang lebih lanjut pada jaringan tertentu saja. Hasil penelitian juga menunjukkan bahwa biosintesis kedua enzim tersebut dapat diinduksi dengan perlakuan bahan kimia berupa SA atau ETF, terutama pada *T. tricuspidata*. Hasil lain yang sangat penting adalah adanya aktivitas aktivitas anticendawan dari ekstrak protein kasar dari jaringan tanaman *Trichosanthes* yang diteliti terhadap berbagai cendawan patogen tanaman dari beberapa kelas cendawan yang menunjukkan kemungkinan luasnya potensi pemanfaatan protein tersebut untuk pengendalian penyakit tanaman khususnya yang disebabkan oleh cendawan.

SA dalam selang konsentrasi yang diuji (0,025–0,10mM) dapat meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak protein dapat menginduksi aktivitas kitinase pada ekstrak protein kalus *T. tricuspidata*. Sementara pada kalus *T. cucumerina* var. *anguina*, aktivitas kitinase tidak dapat ditingkatkan dengan perlakuan SA. Hasil-hasil percobaan tersebut menunjukkan bahwa kemampuan SA untuk menginduksi aktivitas kitinase pada *T. tricuspidata* dipengaruhi oleh jenis tanaman.. Kalus dari tanaman yang berbeda kemungkinan mengekspresikan enzim kitinase yang berbeda dan perbedaan tipe kitinase dan tipe yang berbeda dapat berbeda responnya terhadap senyawa *inducer* yang diberikan. Burtekova *et al.* (2003) melaporkan perbedaan jenis kitinase yang dapat diinduksi ekspresinya oleh SA. SA 20mM efektif dalam menginduksi ekspresi kitinase basic klas 2 (Ch2) pada daun tanaman bit gula, kitinase basic klas IV (Ch4) pada daun diinduksi secara efektif oleh bentotidiazola (BTH). Sementara itu, kitinase acidic klas III (SE2) lebih intensif terinduksi oleh SA dan betain.

Aktivitas peroksidase pada kalus *in vitro* *T. tricuspidata* dan *T. cucumerina* var. *anguina* dapat ditingkatkan dengan perlakuan SA. Peningkatan aktivitas peroksidase karena perlakuan SA juga disebabkan oleh bertambahnya waktu setelah perlakuan, sehingga makin besar konsentrasi SA dan makin lama waktu setelah perlakuan SA (dalam rentang SA dan waktu perlakuan yang diuji), maka makin besar peningkatan aktivitas peroksidase pada ekstrak protein akar di lapangan dan ekstrak protein kalus *in vitro*.

Aktivitas kitinase pada kalus *T. tricuspidata* yang diberi perlakuan etefon (ETF) terlihat sangat terpengaruh dengan konsentrasi etefon yang diberikan dan juga lama waktu setelah perlakuan. Makin tinggi konsentrasi ETF, maka makin cepat terjadinya peningkatan aktivitas kitinase. Respon aktivitas kitinase tersebut berbeda dengan respon yang lebih peningkatan yang lebih lambat pada perlakuan SA. Perbedaan respon tersebut dapat disebabkan karena gen penyandi enzim kitinase tertentu memiliki respon yang berbeda terhadap SA atau ETF atau terdapat lebih dari satu gen penyandi enzim kitinase pada tanaman yang memiliki respon berbeda terhadap SA atau ETF. Akibatnya total aktivitas kitinase dari ekstrak kasar protein tanaman akan berbeda jika diperlakukan dengan SA atau ETF. Kellman *et*

al. (1996) menemukan bahwa ekspresi 2 gen kitinase klas II dari kultur suspensi sel kacang tanah menunjukkan respon yang berbeda terhadap perlakuan asam salisilat dan etilen. Gen *A.h. Chi2:2* meningkat ekspresinya dengan perlakuan etilen, salisilat dan konidia cendawan *Botrytis cinerea*. Sebaliknya, gen *A.h. Chi2:1* hanya meningkat ekspresinya setelah perlakuan spora cendawan dan tidak meningkat oleh perlakuan etilen dan salisilat. Tanaman kacang tanah transgenik dengan gen *A.h. Chi2:1* juga menunjukkan ekspresi gen yang sama dengan yang ditemukan di kultur suspensi sel.

Respon aktivitas peroksidase terhadap perlakuan ETF pada kalus *T. tricuspidata* terlihat berbeda dengan respons kitinase. Konsentrasi ETF yang tinggi (0,050 dan 0,10mM) tidak meningkatkan aktivitas peroksidase. Aktivitas peroksidase justru meningkat cepat pada kontrol dan sedikit meningkat pada konsentrasi 0,025mM. Dari hasil ini diduga sedikit saja jumlah etilena di sekitar jaringan akan dapat meningkatkan aktivitas peroksidase jaringan tanaman. Hal ini juga mungkin terjadi pada konsentrasi ETF yang terlalu tinggi, justru menekan aktivitas peroksidase.

Hasil pengujian penghambatan perkecambahan spora menunjukkan adanya potensi protein bioaktif dari ekstrak protein tanaman yang diuji. Aktivitas penghambatan perkecambahan spora tersebut dapat berasal dari kitinase, peroksidase maupun kemungkinan protein lainnya yang ada dalam ekstrak kasar tersebut yang perlu diteliti lebih lanjut.

KESIMPULAN

Tanaman *Trichosanthes* berbeda dalam beberapa hal seperti morfologi (bentuk daun, bentuk bunga, bentuk buah dan bentuk biji), sifat tumbuh (*T. cucumerina* var. *anguina* adalah annual, *T. tricu-pidata* dan *T. quinquangulata* bersifat perennial), tingkat serangan hama dan penyakit (*T. cucumerina* var. *anguina* lebih banyak diserang hama dan penyakit dibanding *T. tricuspidata* dan *T. quinquangulata*).

Pada *T. tricuspidata*, aktivitas kitinase yang tinggi ditemukan pada tunas *in vitro*, kalus dan akar tanaman dari lapang dan paling rendah pada daun. Pada *T. cucumerina* var. *anguina*, aktivitas kitinase dan peroksidase yang tinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapang dan kalus *in vitro* dan paling rendah pada daun..

SA 0,025–0,10mM dapat meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus *in vitro* *T. tricuspidata* namun tidak meningkatkan aktivitas kitinase pada ekstrak kasar protein kalus *in vitro* *T. cucumerina* var. *anguina*. SA dapat meningkatkan aktivitas aktivitas peroksidase. ETF (0.025–0.10mM) dapat meningkatkan aktivitas kitinase pada kalus *in vitro* *T. tricuspidata*, makin tinggi konsentrasi ETF makin cepat terjadinya peningkatan aktivitas kitinase. Sebaliknya ETF pada rentang konsentrasi tersebut menekan aktivitas peroksidase pada kalus.

Ekstrak kasar protein dari tunas *in vitro* *T. tricuspidata* menunjukkan aktivitas anticendawan *in vitro* berdasarkan uji perkecambahan spora pada *Fusarium* sp. asal *T.*

cucumerina var. *anguina*, *Fusarium oxysporum* asal bawang merah, *Puccinia arachidis* asal tanaman kacang tanah, dan *Pseudoperonospora cubensis* asal tanaman ketimun dan tidak dapat menghambat perkecambah spora *Curvularia eragrostidis* asal anggrek *Dendrobium*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penelitian ini terlaksana atas dana dari Departemen Pendidikan Nasional melalui Hibah Bersaing XIV tahun 2006-2008 dan dukungan dari LPPM IPB, Fakultas Pertanian, dan Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB.

DAFTAR PUSTAKA

- Agostini E, Hernandez-Ruiz, J, Arnao MB, Milrad SR, Tigier HA, Acosta M. 2002. A Peroxidase Isoenzyme Secreted by Turnip (*Brassica napus*) Hairy-Root Cultures : Inactivation by Hydrogen Peroxide and Application in diagnostic kits. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35:1-7.
- Backer CA, Van Den Brink BRC.Jr. 1963. Flora of Java. I. Noordhoof. Groningen.302-304.
- Barbieri L, Batelli MG, Stirpe F. 1993. Ribosome-Inactivating Proteins From Plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1154:237-282.
- Burtekova L, Stillerova K, Feltlova M, Sindelarova M. 2003. Immunohistological Analysis of Chemically Induced Proteins in Suggarbeet. *Biol. Plantarum* 47(2): 243-251.
- Iglesias R, Arias FJ, Rojo MA, Escarmis C, Ferreras JM, Girbes T. 1993. Molecular Action of the Type 1 Ribosome-Inactivating Protein Saporin 5 on *Vicia sativa* Ribosomes. *FEBS Lett.* 325:291-294.
- Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities During Rice Leaf Senescence. *Plant Physiol* 57:315-319.
- Kasprezewska A. 2003. Plant Chitinases-Regulation and Function. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 8(3):809-834.
- Kellmann JW, et al. 1996. Characterization of Two Chitinase Genes from Peanut and Expression Studies in Transgenic Tobacco Plants. *Plant Mol. Biol.* 30:351-358.
- Lagrimini LM, Burkhart W, Moyer M, Rothstein S. 1997. Molecular Cloning of Complementary DNA Encoding the Lignin-Forming Peroxidase from Tobacco: molecular analysis and tissue-specific expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7542-6.
- Lagrimini LM, Joly RJ, Dunlap JR, Liu T-TY. 1997. The Consequence of Peroxidase Overexpression in Transgenic Plants on Root Growth and Development. *Plant Mol. Biol.* 33:887-895.
- Logeman J, G Jach, H Tommerup, J Mundy, J Schell. 1992. Expression of Barley Ribosome-Inactivating Protein Leads to Increased Fungal Protection in Transgenic tobacco plants. *Bio-Technology* 10:305-308.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, Download from www.jbs.org.by on Apr 23,2007.
- Pujihartati E, Ilyas S, Sudarsono. 2006^b. Aktivitas Pembentukan Secara Cepat Spesies Oksigen aktif, Peroksidase, dan Kandungan Lignin Kacang Tanah Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13 (4): 166-172
- Rugayah. 1999. *Trichosanthes (Cucurbitaceae)* in Malesia. Disertasi. Program Pasca Sarjana IPB. 239 hal.
- Saikia R, Kumar R, Arora DK, Gogoi DK, Azad P. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* Inducing Rice Resistance Against *Rhizoctonia solani* Folia : Production of Salicylic acid and Peroxidase. *Microbiol* 51(5):375-380.
- Savary BJ, Flores HE. 1994. Biosynthesis of Defense-Related Protein in Transformed Root Cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Var. Japonicum (Kitam). *Plant Physiol.* 106:1195-1204.
- Selitrennikoff P. 2001. Antifungal Proteins. *Appl. Env. Microbiol.* July:2883-2894.