

Aktivitas Kitinase dan Peroksidase pada Daun, Akar, serta Kalus dan Tunas *In*

***Vitro Trichosanthes tricuspidata* Lour.**

(*Chitinase and Peroxydase Activities of Leaves, Roots, Calli and In Vitro Grown*

***Shoots of Trichosanthes tricuspidata* Lour.)**

ABSTRACT

A number of species of Trichosanthes have been reported as the sources of bioactive protein associated with defense mechanisms such as chitinase. The objectives of this research were to (i) induce callus formation and observed the growth of Trichosanthes tricuspidata calli on four culture media, (ii) analyse chitinase and peroxydase activities of protein extracts from in vitro grown T. tricuspidata calli and shoots, and (iii) analyse those enzymes activities of that of leaf and root tissues of field grown plants. Shoots of T. tricuspidata were in vitro propagated on MS medium containing 1 mg/l of BA. The calli were induced from in vitro grown shoots of T. tricuspidata on MS medium containing combinations of 1 μ M (K14), 2 μ M (K15), 3 μ M (K16), or 4 μ M (K17) of NAA and BA, respectively. Leaf and root samples were harvested from 6 months old of field grown T. tricuspidata plants. Results of the experiment suggested that (i) K17 medium can be used to induced calli from shoots of T. tricuspidata with minimal root growth, (ii) calli from K14 medium have the highest of total protein content, and (3) calli tissues and in vitro grown shoots of T. tricuspidata were able to express chitinase and peroxydase; therefore they can be used as a model to study effects of a number of factors affecting chitinase and peroxydase activities and identify factors inducing increased activities of both enzymes in T. tricuspidata.

Keywords: *leaves, roots, calli growth, in vitro shoots, total protein content, chitinase and peroxidase activities*

PENDAHULUAN

Trichosanthes sp. termasuk famili *Cucurbitaceae*, tumbuh merambat atau menjalar dengan bentuk buah bulat hingga lonjong atau bulat panjang. Rugayah dan De Wilde (1997) melaporkan bahwa di pulau Jawa terdapat 10 spesies *Trichosanthes* yaitu *T. coriacea*, *T. cucumerina*, *T. anguina*, *T. globosa*, *T. ovigera*, *T. villosa*, *T. wawrae*, *T. sumatrana*, *T. tricuspidata*, *T. pubera*, dan *T. quinquangulata*. Salah satu spesies yaitu *T. tricuspidata* ditemukan tumbuh liar di hutan penelitian Dramaga, Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan. *T. tricuspidata* bersifat perenial dengan batang agak berkayu sehingga dapat diperbanyak dengan stek batang (Sukma *et al.* 2006).

Hasil penelitian yang dilakukan terhadap *T. kirilowii*, spesies *Trichosanthes* yang banyak ditemukan di Cina, menunjukkan bahwa pada jaringan akar rambutnya ditemukan mempunyai aktivitas enzim kitinase dan mengekspresikan protein penghambat ribosom (*ribosome inactivating protein* [RIP]) (Savary dan Flores, 1994). Kitinase merupakan enzim yang dapat mendegradasi senyawa kitin yang merupakan komponen utama dari dinding sel berbagai patogen cendawan melalui proses hidrolisis ikatan glikosida 1,4- β . Pada tanaman, protein kitinase diekspresikan oleh berbagai gen *chi* secara konstitutif pada semua jaringan atau secara spesifik pada jaringan tanaman tertentu (Kasprzewska 2003). Gen *chi* juga telah dilaporkan terinduksi ekspresinya dan meningkat aktivitasnya sebagai respons terhadap infeksi cendawan (Collinge *et al.* 1993; Bishop *et al.* 2000; Pudjihartati *et al.* 2006).

Selain kitinase, peroksidase merupakan enzim yang telah dilaporkan berkorelasi dengan respons tanaman terhadap serangan patogen dan terhadap berbagai stres abiotik. Salah satu peran peroksidase adalah dalam proses oksidasi dan polimerisasi prekursor pada proses biosintesis lignin (Oku, 1994). Terkait dengan respons terhadap infeksi

patogen, peningkatan biosintesis lignin dilakukan tanaman untuk secara fisik menghambat perkembangan patogen di dalam jaringan tanaman yang diserang. Pada kacang tanah, peningkatan aktivitas peroksidase dilaporkan terkait dengan peningkatan respons ketahanan terhadap infeksi *S. rolfii*, tetapi tidak mencegah infeksi patogen cendawan terhadap tanamannya (Pujihartati *et al.* 2006).

Dibandingkan dengan *Cucurbitaceae* yang lain, *T. tricuspidata* di lapangan jarang terinfeksi penyakit yang umumnya menyerang akar dan daun tanaman timun-timun sehingga diduga mempunyai mekanisme ketahanan terhadap berbagai penyakit tanaman. Ada tidaknya hubungan antara resistensi tanaman *T. tricuspidata* di lapangan dengan aktivitas kitinase dan peroksidase merupakan topik penelitian yang menarik untuk dilakukan.

Teknik *in vitro* telah digunakan untuk mengkulturkan jaringan berbagai tanaman untuk memperbanyak secara vegetatif atau untuk berbagai tujuan lainnya. Jaringan tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* juga berpotensi sebagai bahan untuk studi respons tanaman terhadap berbagai faktor biotik dan abiotik. Untuk itu perlu tersedia metode kultur *in vitro* yang tepat dan informasi tentang kemampuan jaringan tanaman yang ditanam secara *in vitro* untuk menghasilkan respon yang diharapkan. Kemampuan jaringan tanaman *T. tricuspidata* yang dikulturkan secara *in vitro* untuk mengekspresikan enzim kitinase dan peroksidase perlu dipelajari sebelum digunakan untuk mempelajari respons terhadap infeksi patogen menggunakan jaringan tanaman secara *in vitro*.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk (i) menginduksi pembentukan jaringan kalus dan mengamati pertumbuhan eksplan tunas *T. tricuspidata* dalam media *in vitro*, (ii) menganalisis aktivitas enzim kitinase dan peroksidase pada jaringan kalus

dan tunas yang ditumbuhkan secara *in vitro*, dan (iii) menganalisis aktivitas enzim kitinase dan peroksidase pada jaringan daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* yang tumbuh di lapangan. Hasil analisis diharapkan dapat menjawab pertanyaan dapat tidaknya jaringan tanaman yang dikulturkan secara *in vitro* untuk digunakan sebagai bahan studi aktivitas kitinase dan peroksidase pada tanaman *T. Tricuspidata* Lour.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman yang Digunakan

Pada awalnya, tunas *T. tricuspidata* dikulturkan dalam media MS (Murashige & Skoog 1962) dengan penambahan benziladenin (BA) 1 mg/l. Tunas *in vitro* diperbanyak dengan melakukan sub-kultur terhadap tunas baru yang terbentuk ke dalam media yang sama yang masih segar setiap 4-6 minggu. Setelah banyak, tunas yang tumbuh digunakan sebagai sumber eksplan untuk menghasilkan kalus. Kalus diinduksi dari eksplan tunas dalam berbagai media *in vitro* yang diuji pada percobaan berikutnya.

Selain jaringan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro*, tanaman *T. tricuspidata* juga diperbanyak di lapangan dengan stek batang. Tanaman *T. tricuspidata* umur 9 bulan yang ditumbuhkan dalam kantong plastik ukuran 40 cm x 40 cm digunakan sebagai sumber stek batang. Daun dan akar tanaman yang diperbanyak menggunakan stek di lapangan dipanen pada saat umur 6 bulan. Daun yang sudah berkembang sempurna dan seluruh jaringan akar (akar sekunder dan akar serabut) dipanen, disimpan dalam *cool box* dan dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.

Induksi Pembentukan Kalus

Untuk menginduksi pembentukan kalus, potongan tunas dengan dua buku ditanam ke dalam botol kultur dengan volume 200 ml yang berisi media induksi kalus sebanyak 25 ml. Media induksi kalus terdiri atas media MS dengan penambahan

berbagai konsentrasi dari kombinasi asam naftalena asetat (NAA) dan Benzil Adenin (BA). Perlakuan kombinasi NAA dan BA yang ditambahkan adalah (1) NAA 1 μ M + BA 1 μ M (K14), (2) NAA 2 μ M + BA 2 μ M (K15), (3) NAA 3 μ M + BA 3 μ M (K16), dan (4) NAA 4 μ M + BA 4 μ M (K17). Unit percobaan terdiri atas satu botol yang ditanami dengan empat eksplan tunas dan setiap perlakuan diulang 10 kali. Percobaan disusun dengan rancangan lingkungan acak lengkap.

Eksplan tunas yang ditanam dalam media induksi kalus dipelihara dalam ruang kultur tanpa pencahayaan dan bersuhu antara 22 – 24°C. Eksplan ditanam dalam media induksi kalus selama empat minggu dan diamati pertumbuhan dan perkembangannya. Pengamatan dilakukan terhadap: (1) waktu yang diperlukan untuk mulai membentuk kalus, persentase eksplan berkalus dan atau berakar, diameter kalus, dan bobot kalus yang dipanen.

Kadar Protein Total dari Jaringan Tanaman

Total protein diekstrak dari daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* yang ditanam dilapangan, serta dari tunas dan kalus *T. tricuspidata* yang dikulturkan secara *in vitro*. Jaringan tanaman (0.5 g basah digerus dalam larutan penyangga fosfat (50 mM, pH 7) dingin dengan perbandingan 1:4 (b/v). Ekstraksi protein dari semua jaringan *T. tricuspidata* dilakukan dalam kondisi lingkungan yang bersuhu sekitar 4°C.

Gerusan tanaman yang didapat dipisahkan dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan yang terpisah dari pecahan sel dan jaringan tanaman diambil dan kadar total protein terlarutnya (TPT) ditentukan. Penetapan TPT dilakukan menggunakan metode Lowry *et al.* (1976) dengan menggunakan serum albumin bovin (BSA) untuk membuat kurva konsentrasi standar. Kadar protein jaringan ditentukan dengan membagi nilai TPT dengan bobot contoh

yang digunakan sedangkan persentasenya ditentukan dengan menghitung bobot total protein (mg) per 100 mg bahan tanaman.

Aktivitas Kitinase pada Jaringan *T. tricuspidata*

Aktivitas kitinase dalam ekstrak protein kasar jaringan daun dan akar *T. tricuspidata* yang dipanen dari lapangan serta dari kalus dan tunas yang dipanen dari kultur *in vitro* ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk mendegradasi substrat dimmer p-nitrophenil N-asetil β -D glucosaminide (pNP-NacGluc) mengikuti metode yang digunakan oleh Pujihartati *et al.* (2006a). Sebanyak 100 μ l sediaan protein kasar dicampur dengan substrat pNP-NacGluc, diinkubasi selama 3 jam, dan reaksi dihentikan dengan penambahan TCA 20% sebanyak 125 μ l. Nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 405 nm dengan menggunakan blanko larutan protein tanpa penambahan substrat. Aktivitas kitinase dihitung sebagai banyaknya pNP NacGluc (mM) yang dibebaskan per mg protein per jam pada kondisi analisis.

Aktivitas Peroksidase pada Jaringan *T. tricuspidata*

Aktivitas enzim peroksidase dalam ekstrak protein kasar jaringan daun dan akar *T. tricuspidata* yang dipanen dari lapangan serta dari kalus dan tunas yang dipanen dari kultur *in vitro* ditentukan dengan metode yang digunakan sebelumnya (Kar & Mishra 1976; Pujihartati *et al.* 2006b). Sebanyak 100 μ l ekstrak protein kasar ditambahkan ke dalam larutan 2.5 ml pirogallol 0.2 M. Ke dalam campuran ditambahkan H₂O₂ (1%) sebanyak 250 μ l. Nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 420 nm setiap 30 detik dalam periode 0 – 150 detik, dengan menggunakan blanko campuran larutan yang sama tetapi tanpa ekstrak protein. Sebagai ganti ekstrak protein, ke dalam larutan blanko ditambahkan

larutan penyangga fosfat. Aktivitas peroksidase dihitung sebagai peningkatan nilai absorbansi per satuan waktu per bobot protein (ΔA_{420} /menit/mg protein) pada kondisi analisis.

HASIL

Induksi dan Pertumbuhan Kalus *T. tricuspidata*

Berdasarkan data kualitatif yang dikumpulkan, jaringan kalus *T. tricuspidata* dapat terbentuk dari eksplan yang ditanam pada semua komposisi media yang diuji. Pada media K17, kalus mulai terbentuk dari jaringan eksplan yang ditanam dua minggu setelah tanam (MST) sedangkan untuk media yang lain hanya memerlukan waktu seminggu (Tabel 1). Pada Tabel 1 disajikan perkembangan persentase eksplan berkalus dalam periode 1-3 MST pada berbagai media yang diuji. Pada 3 MST, semua media yang digunakan dapat menginduksi kalus (100%) dari semua eksplan yang ditanam.

Diameter kalus baru diukur setelah 3 MST karena pada 1 dan 2 MST masih belum terukur. Pada umur 3 dan 4 MST, tidak terdapat perbedaan yang nyata terhadap diameter kalus yang didapat dari eksplan akibat perlakuan media. Selain berkalus, eksplan yang ditanam dalam media K14 juga menginduksi pembentukan akar. Pada media K14, akar mulai terbentuk dari eksplan setelah umur 3 MST, dengan rata-rata 9.9 akar per eksplan. Pada 4 MST jumlah akar yang terbentuk dari eksplan terlalu banyak dan berukuran kecil sehingga sulit untuk dihitung.

Komposisi media yang digunakan untuk menginduksi pembentukan kalus dari eksplan tunas *T. tricuspidata* tidak menyebabkan adanya perbedaan pertumbuhan kalus dari eksplan yang ditanam. Semua eksplan yang ditanam menghasilkan bobot kalus per eksplan, bobot kalus dan bobot biomasa total per botol yang tidak berbeda nyata (Tabel 2).

Kadar Protein Total dari Jaringan Tanaman

Nilai total protein terlarut, kadar protein dan persentase protein yang didapat dari berbagai jaringan yang diuji berbeda-beda nilainya. Protein terlarut, kadar protein dan persentase protein yang tertinggi dihasilkan dari jaringan kalus yang ditumbuhkan pada media K14 sedangkan yang terendah dari jaringan tunas *in vitro* dan jaringan akar dari lapangan (Tabel 3).

Aktivitas Kitinase pada Jaringan *T. tricuspidata*

Ekstrak protein dari jenis jaringan tanaman *T. tricuspidata* nyata mempunyai nilai aktivitas kitinase yang berbeda, seperti terlihat pada Gambar 2. Aktivitas enzim kitinase tertinggi ditemukan pada ekstrak protein dari tunas *in vitro*, yang nilainya berbeda nyata dengan aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari jaringan kalus, daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. Aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari akar tidak berbeda nyata dengan aktivitas kitinase dari kalus yang ditumbuhkan dalam media K15, K16 dan K17, tetapi nyata lebih tinggi dibandingkan dengan dari jaringan yang ditumbuhkan dalam media K14 (Gambar 2). Aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari jaringan kalus yang ditumbuhkan dalam empat media yang diuji tidak berbeda nyata. Meskipun demikian, terdapat kecenderungan peningkatan nilai aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari kalus dengan meningkatnya konsentrasi auksin dan sitokinin yang ditambahkan dalam media (Gambar 2).

Aktivitas Peroksidase pada Jaringan *T. tricuspidata*

Aktivitas peroksidase tertinggi ditemukan pada ekstrak protein dari jaringan akar tanaman dari lapangan, tetapi nilainya hanya berbeda nyata dengan aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari jaringan kalus yang ditumbuhkan pada media K17, tunas *in vitro* dan daun tanaman dari lapang (Gambar 3). Nilai aktivitas peroksidase pada ekstrak

protein dari kalus pada keempat komposisi media tidak berbeda nyata dengan tunas *in vitro* dan daun tanaman dari lapang (Gambar 3).

Hubungan antara Kandungan Protein Jaringan dan Aktivitas Enzim.

Sebagaimana yang diharapkan, hasil uji korelasi menunjukkan bahwa total protein terlarut berkorelasi positif dengan kadar protein jaringan dan persentase protein jaringan serta antara aktivitas kitinase dan peroksidase. Tetapi, kandungan protein jaringan ternyata berkorelasi negatif dengan nilai aktivitas kitinase dan peroksidase (Tabel 4).

PEMBAHASAN

Kultur kalus dan kultur sel *in vitro* telah digunakan untuk menghasilkan metabolit sekunder seperti shikonin, naphthoquinon yang berguna untuk agen antimikroba (Fujita dan Tabata, 1985). Potensi kultur sel tanaman untuk menghasilkan enzim tanaman seperti peroksidase, kitinase dan *ribosome-inactivating protein* telah mulai dikembangkan sejak awal tahun 1990-an (Parkinson *et al.* 1990; Kurosaki *et al.* 1990; Stoner *et al.* 1997). Sementara Vivanco dan Flores (2000) melaporkan bahwa kultur kalus dan suspensi sel dari *Mirabilis expansa* dapat menghasilkan RIP.

Dalam penelitian ini, perlakuan media induksi kalus tidak berbeda pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan biomasa jaringan eksplan, namun nyata mempengaruhi kandungan protein jaringan yang diekstrak. Biomassa kalus yang dihasilkan dalam 4 minggu periode pengkulturan umumnya sekitar 1 g per botol. Zheng *et al.* (2001) melaporkan bahwa kalus *T. kirilowii* dapat diinduksi dalam media MS yang ditambahkan BA 4 mg/l (10.3 μ M) dan IAA 0.2 mg/l (1.141 μ M).

Pada jaringan kalus *T. tricuspidata*, penambahan auksin dan sitokinin dengan konsentrasi antara 1 – 4 μ M ke dalam media MS menurunkan kandungan protein total yang diekstrak dari jaringan. Sebaliknya peningkatan konsentrasi auksin dan sitokinin

tersebut dapat meningkatkan aktivitas kitinase dan Peroxydase pada jaringan kalus. Hal tersebut diduga dapat terjadi melalui (1) meningkatnya jumlah enzim kitinase dan peroksidase yang terekspresi dalam jaringan atau (2) meningkatnya jumlah relatif enzim kitinase dan peroksidase dibandingkan dengan total protein. Dalam hal yang kedua, persentase enzim kitinase dan peroksidase meningkat bukan karena terjadi peningkatan ekspresi kitinase dan peroksidase, tetapi ekspresinya sama sedangkan kandungan protein totalnya menurun sehingga aktivitas enzim kitinase dan peroksidase per gram total proteinnya meningkat. Pada media K14 (NAA 1 μ M + BA 1 μ M), dan K15 (NAA 1 μ M + BA 1 μ M) kandungan protein total jaringan tinggi namun diduga sebagian besar protein yang disintesis merupakan metabolit primer yang terkait dengan pertumbuhan dan perkembangan sel. Kasprezewska (2003) menyatakan bahwa pada kultur tembakau, akumulasi kitinase kelas I tertekan oleh adanya auksin dan sitokinin dalam media dan meningkat setelah eksplan dipindahkan ke media tanpa hormon. Sementara pada kalus dan suspensi sel *Cucurbita* sp., gen kitinase dapat terekspresi pada media dengan atau tanpa penambahan zat pengatur tumbuh tanaman. Dengan demikian pola akumulasi kitinase dalam jaringan tanaman yang ditumbuhkan secara *in vitro* dengan penambahan zat pengatur tumbuh tanaman diduga juga tergantung pada spesies tanamannya.

Aktivitas kitinase pada kalus cenderung lebih rendah dibanding aktivitas kitinase pada jaringan tunas *in vitro* dan akar tanaman dari lapangan. Menurut Collinge *et al* (1993) dan Regalado *et al.* (2000), enzim kitinase ada yang terakumulasi secara vakuolar atau apoplastik dan disintesis secara konstitutif (*constitutive expression*). Sebaliknya Kasprezewska (2003) menyatakan ada enzim kitinase yang ekspresinya bersifat spesifik jaringan/organ sehingga tergantung pada perkembangan tanaman (*developmental regulation*). Hal tersebut didukung oleh diamatinya aktivitas kitinase

yang hanya terjadi pada jaringan hidatoda, antera, tangkai putik, buah, mikropil biji, dan embrio (Regalado *et al.* 2000, Derckell *et al.* 1996, Hodge *et al.* 1996). Selain itu, aktivitas kitinase juga dapat terinduksi akibat adanya infeksi patogen (Collinge *et al.* 1993; Bishop *et al.* 2000), sebagai respons terhadap etilen yang dikeluarkan oleh jaringan yang terluka (Hamel *et al.* 1995; Derckel, *et al.* 1996) atau oleh cekaman akibat faktor abiotik (Hamel *et al.* 1995).

Peroksidase merupakan enzim yang umum terdapat pada sel-sel tumbuhan yang berperan dalam katalisis oksidasi berbagai senyawa organik oleh peroksida dan dalam katalisis reaksi pembentukan lignin melalui oksidasi dan polimerisasi prekursornya (Oku, 1997). Dalam penelitian ini, aktivitas peroksidase jaringan *T. tricuspidata* tidak berbeda antara kalus yang tumbuh dalam 4 macam media yang diuji, tunas *in vitro*, dan daun dari tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. Aktivitas peroksidase justru diamati paling tinggi pada jaringan akar tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan.

Kalus *T. tricuspidata* selama 4 minggu dalam media belum ada yang berkembang menjadi embrio, meskipun pada perlakuan K14 sebagian besar jaringan yang berkembang berupa jaringan akar. Kochba *et al.* (1977) yang mengamati aktivitas peroksidase pada kultur kalus jeruk, menyimpulkan bahwa jaringan kalus embriogen mempunyai aktivitas peroksidase yang lebih tinggi dibanding yang non-embriogen, ekspresi peroksidase pada kalus meningkat dengan bertambahnya umur, dan mencapai puncaknya pada saat kalus berdiferensiasi menjadi embrio. Seperti halnya kitinase, peroksidase juga meningkat ekspresinya akibat pelukaan dan stres abiotik yang terjadi (Kawaoka *et al.* 1994).

Meskipun secara absolut nilai aktivitasnya berbeda, jaringan kalus dan tunas *in vitro* *T. tricuspidata* mampu mengekspresikan kitinase dan peroksidase sebagaimana

jaringan tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. Dengan demikian, kultur kalus atau kultur tunas *in vitro* *T. tricuspidata* dapat dijadikan sebagai model jaringan untuk mempelajari pola ekspresi kitinase dan peroksidase pada tanaman ini. Tanaman *T. tricuspidata* menarik untuk dipelajari karena diduga mempunyai mekanisme ketahanan terhadap berbagai penyakit tanaman yang menyerang *Cucurbitaceae*. Mempelajari aktivitas kitinase dan peroksidase pada tanaman ini diharapkan dapat menjawab sebagian dari mekanisme resistensi yang ada pada tanaman *T. tricuspidata*, mengingat pada berbagai tanaman yang lain aktivitas kedua enzim ini telah dikaitkan dengan mekanisme resistensi terhadap patogen (Pujihartati *et al.* 2006a; Pujihartati *et al.* 2006b).

KESIMPULAN

Dari berbagai hasil yang didapat dalam penelitian dapat ditarik beberapa simpulan sebagai berikut: (i) media K15, K16 dan K17 dapat digunakan untuk menginduksi dan menumbuhkan kalus dari jaringan eksplan *T. tricuspidata* dengan pertumbuhan akar yang minimal dari jaringan eksplan, (ii) peningkatan konsentrasi NAA dan BA pada kultur kalus menurunkan total protein terlarut, namun meningkatkan aktivitas kitinase dan peroksidase, dan (iii) jaringan kalus dan tunas *T. tricuspidata* mampu mengekspresikan kitinase dan peroksidase. di dalam jaringannya. dengan demikian, kultur kalus dan tunas *T. tricuspidata* dapat digunakan sebagai model untuk mempelajari pengaruh berbagai faktor terhadap aktivitas enzim kitinase dan peroksidase serta mengidentifikasi faktor yang dapat meningkatkan aktivitas kedua enzim tersebut.

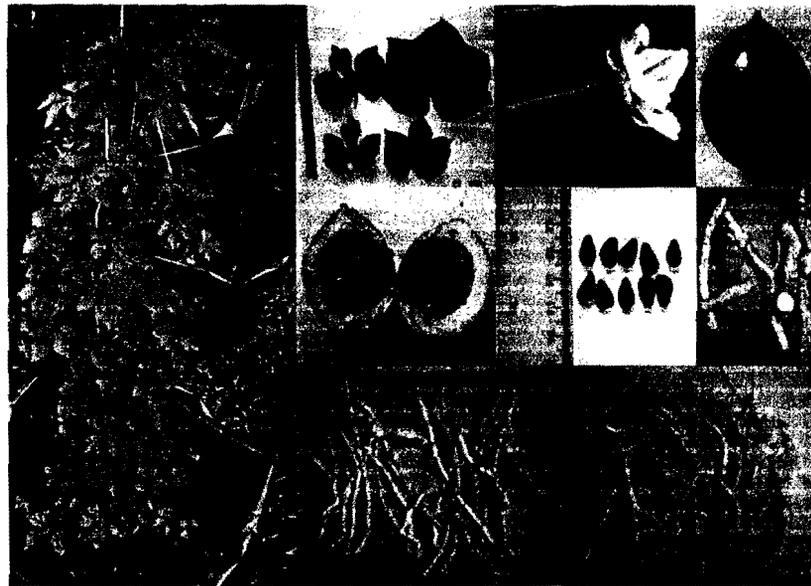
UCAPAN TERIMAKASIH

Sebagian penelitian ini didanai oleh dana penelitian Hibah Bersaing XIV, Tahun 2006 dengan judul: Eksplorasi Protein Antimikroba dari *Trichosanthes* sp. Melalui Sistem Kultur Akar Normal dan Akar Transgenik *In Vitro*, atas nama Dewi Sukma sebagai ketua peneliti. Dewi Sukma mendapatkan beasiswa BPPS untuk menempuh pendidikan program doktor di Sekolah Pasca-Sarjana IPB dan publikasi ini merupakan sebagian hasil penelitian yang dilakukan untuk penyusunan disertasi doktor.

DAFTAR PUSTAKA

- Bishop, J.G., A.M. Dean, T. Mitchell-Olds. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97:5322-532.
- Collinge, D.B., K.M. Kragh, J.D. Mikkelsen, K.K. Nielsen, U. Rasmussen, K. Vad. 1993. Plant chitinases. *Plant J.* 3:31-40.
- Derckel, J.P., L. Legendre, J.C. Audran, B. Haye. 1996. Chitinase of grapevine (*Vitis vinifera* L.): five isoforms induced in leaves by salicylic acid are constitutively expressed in other tissues. *Plant Sci.* 119:31-37.
- Hamel, F., G. Bellemere. 1995. Characterization of a class I chitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1263:212-220.
- Hodge, A., I.J. Alexander, G.W. Gooday. Measurement in situ of chitinase and β -N-acetylglucosaminidase activities in germinating seeds of *Pinus sylvestris* and *Eucalyptus pilularis*. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 301-306.
- Kawaoka, A., T. Kawamoto, Otha, H. Sekine, M. Takano, A. Shymnio. 1994. Wound-induced expression of horseradish peroxidase. *Plant Cell Rep.* 13:149-154.
- Kar, M., D. Mishra. 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.
- Kochba J, Lavee S, Spiegel-Roy P. 1977. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* 18: 463-467.
- Kurosaki, F. N. Tashiro, A. Nishi. 1990. Chitinase induction in carrot cell cultures treated with various fungal components. *Biochem Int.* 20:99-106.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275, Download from www.jbs.org.by on April 23, 2007
- Murashige, T, F.Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Oku, H. 1994. *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Lewis Pub.-CRC Press. Tokyo.119p.

- Parkinson, M., T. Cotter, P.J. Dix. 1990. Peroxidase production by cell suspension cultures and hairy roots of horseradish (*Armoracia rusticana*). *Plant Sci.* 66:271-277.
- Pudjihartati, E., Siswanto, S. Ilyas dan Sudarsono. 2006^a. Aktivitas Kitinase pada Kacang Tanah yang Sehat dan yang Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13(2):73-78.
- Pujihartati, E, S. Ilyas dan Sudarsono. 2006^b. Aktivitas pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, peroksidase, dan kandungan lignin kacang tanah terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13 (4): 166-172
- Regalado AP, C Pinheiro, S. Vidal, I. Chaves, CPP Ricardo, C. Rodrigues-Posada. 2000. The *Lupinus albus* Class III chitinase gene IF3, is constitutively expressed in vegetative organ and developing seed. *Planta* 210:543-550.
- Rugayah, WJJO De Wilde. 1997. *Trichosanthes* L. (*Cucurbitaceae*) in Java. *Blumea* 42:471-482.
- Savary, B.J., H.E. Flores. 1994. Biosynthesis of defense-related protein in transformed root cultures of *Trichosanthes kirilowii* Maxim. Var. japonicum (Kitam). *Plant Physiol.* 106:1195-1204.
- Stoner, M.R., C.A. Humprey, D.J. Coutts, N.J. Remi Shih, K.A. McDonald, A.P. Jackman. 1997. Kinetics of growth and ribosome in activating protein production from *Trichosanthes kirilowii* plant cell cultures in 5-L bioreactor. *Biotechnol.Prog* 13:799-804
- Sukma, D., I.M. Artika, E.T. Tondok. 2006. Eksplorasi Protein Antimikroba dari *Trichosanthes* sp. Melalui Sistem Kultur Akar Normal dan Akar Transgenik In Vitro. Laporan Penelitian Hibah Bersaing XIV. Lembaga Penelitian dan Pemberdayaan Masyarakat, Institut Pertanian Bogor.
- Tabata, M, Y. Fujita. 1990. Production of shikonin by plant cell cultures. In: Zaitlin, M, Day P, Hollaender A (Eds). *Biotechnology in Plant Science*. Academic Press. San Diego. pp 207-218.
- Vivanco, J.M and H.E. Flores. 2000. Biosynthesis of ribosome inactivating protein from callus and cell suspension cultures of *Mirabilis expansa* (Ruiz & Pavon). *Plant Cell Reports* 19:1033-1039



Gambar 1. Morfologi *T. tricuspidata* : a. Tanaman dari biji di polybag umur 3 bulan setelah tanam, b. Daun muda dan daun dewasa, c. Bunga jantan, d. Buah masak, e. Bagian dalam buah masak, f. Biji, g. Akar primer, h. Akar sekunder, i. Akar tertier (serabut).

Tabel 1. Keberhasilan menginduksi pembentukan kalus dan perkembangan eksplan yang ditanam dalam berbagai media MS dengan penambahan berbagai kombinasi konsentrasi naftalena asam asetat (NAA) dan benziladenin (BA).

Perlakuan	Eksplan berkalus (%)			Diameter kalus (cm)		Akar (3 MST)	
	1 MST	2 MST	3MST	3 MST	4 MST	%	Jumlah
K14	25	67	100	0.73	0.75	100 a	10a
K15	10	65	100	0.89	1.03	0 b	0 b
K16	5	100	100	0.92	1.01	0 b	0 b
K17	0	100	100	0.84	0.95	0 b	0 b

Keterangan : K14: kombinasi NAA 1 μ M dan BA 1 μ M; K15: NAA 2 μ M dan BA 2 μ M; K16: NAA 3 μ M dan BA 3 μ M; dan K17: NAA 4 μ M dan BA 4 μ M. Angka yang diikuti oleh huruf yang sama untuk kolom yang sama pada masing-masing peubah, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha=0.05$.

Tabel 2. Rataan bobot kalus per eksplan, bobot total kalus per botol dan bobot biomasa total per botol yang dipanen setelah penanaman eksplan tunas ke dalam media induksi selama 4 minggu.

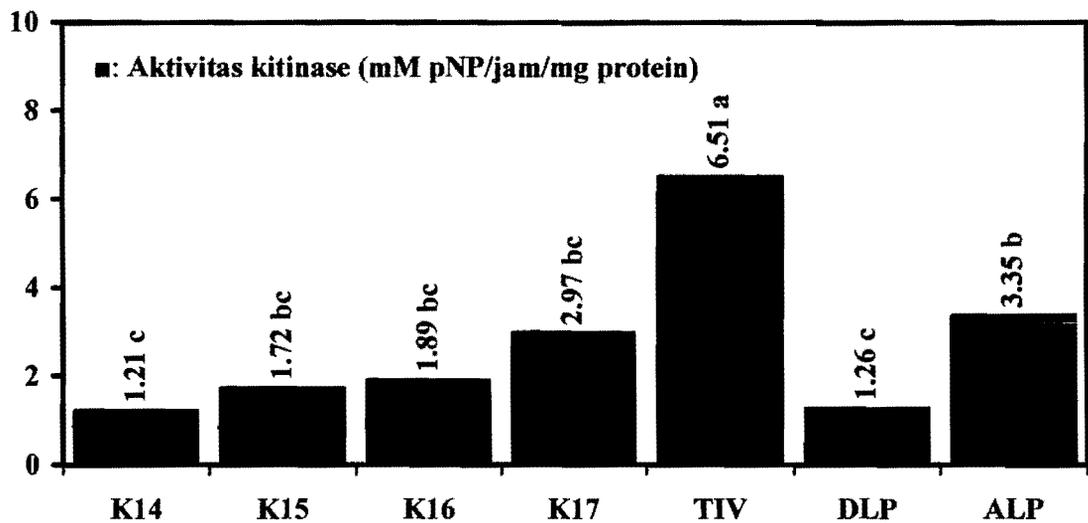
Perlakuan	Rataan bobot basah		
	Kalus per eksplan (g)	Kalus per botol (g)	Biomasa per botol (g)
K14	0.19	0.76	1.16
K15	0.31	1.24	1.38
K16	0.30	1.09	1.19
K17	0.31	1.13	1.22

Keterangan : K14: kombinasi NAA 1 μ M dan BA 1 μ M; K15: NAA 2 μ M dan BA 2 μ M; K16: NAA 3 μ M dan BA 3 μ M; dan K17: NAA 4 μ M dan BA 4 μ M.

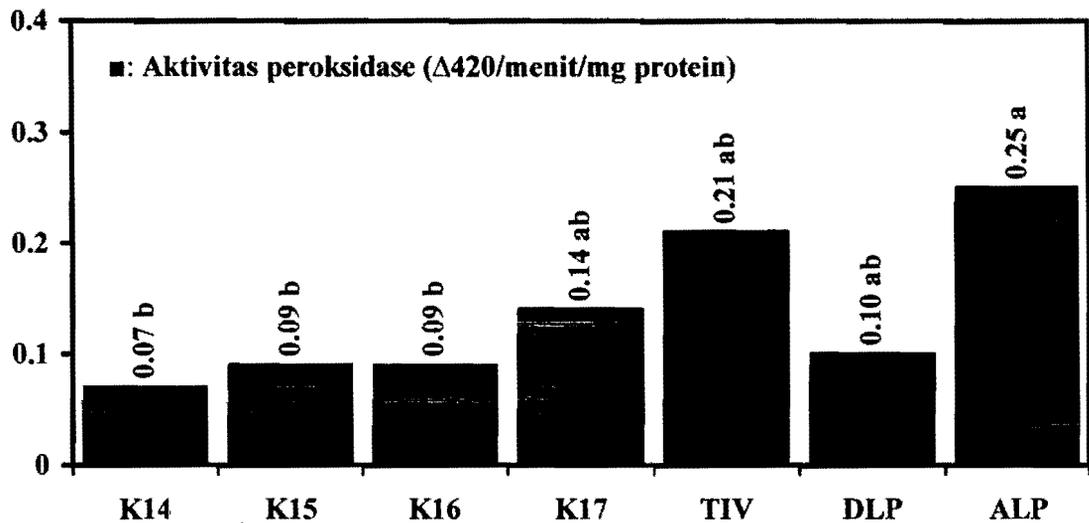
Tabel 3. Hasil ekstraksi protein kasar dari berbagai jaringan *T. tricuspidata* yang ditumbuhkan secara *in vitro* dan di lapangan.

Jaringan tanaman	Total protein terlarut (mg/ml)	Kadar protein (mg/g bahan segar)	Persentase protein
Kalus - <i>in vitro</i> :			
- K14	3.24 a	12.95 a	1.29 a
- K15	2.68 ab	10.73 ab	1.07 ab
- K16	2.21 bc	8.83 bc	0.88 bc
- K17	1.62 cd	6.50 cd	0.65 cd
Tunas - <i>in vitro</i>	0.74 d	2.95 d	0.29 d
Daun - lapangan	1.54 cd	6.17 cd	0.61 cd
Akar - lapangan	0.86 d	3.46 d	0.34 d

Keterangan : K14: kalus yang ditumbuhkan pada media MS dengan penambahan kombinasi NAA 1 μ M dan BA 1 μ M; K15: NAA 2 μ M dan BA 2 μ M; K16: NAA 3 μ M dan BA 3 μ M; dan K17: NAA 4 μ M dan BA 4 μ M.; Angka yang diikuti huruf yang sama pada kolom yang sama tidak berbeda nyata pada Uji Jarak Berganda Duncan dengan $\alpha=5\%$.



Gambar 2. Aktivitas kitinase pada ekstrak protein kasar dari jaringan kalus dan tunas *in vitro* serta daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. K14, K15, K16, dan K17: ekstrak protein kasar dari kalus yang diproliferasi dalam masing-masing media induksi; TIV: ekstrak protein kasar dari tunas yang ditumbuhkan secara *in vitro*, DLP dan ALP: masing-masing daun dan akar dari tanaman di lapangan.



Gambar 3. Aktivitas peroksidase pada ekstrak protein kasar dari jaringan kalus dan tunas *in vitro* serta daun dan akar tanaman *T. tricuspidata* dari lapangan. K14, K15, K16, dan K17: ekstrak protein kasar dari kalus yang diproliferasi dalam masing-masing media induksi; TIV: ekstrak protein kasar dari tunas yang ditumbuhkan secara *in vitro*, DLP dan ALP: masing-masing daun dan akar dari tanaman di lapangan.

Tabel 4. Korelasi antara peubah total protein terlarut, kandungan protein, persentase protein, aktivitas kitinase dan aktivitas peroksidase

Peubah	TPT	KP	PP	KIT	PRX
TPT		0.99	0.99	-0.76	-0.80
KP			0.99	-0.76	-0.80
PP				-0.76	-0.80
KIT					0.72

Keterangan: TPT-total protein terlarut; KP-kadar protein, PP-persentase protein; KIT-aktivitas kitinase, dan PRX-aktivitas peroksidase



DEPARTEMEN PENDIDIKAN NASIONAL
INSTITUT PERTANIAN BOGOR
FAKULTAS PERTANIAN

Jln. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680; Telp. (0251) – 629354; 629350; Fax. 629352

E-mail: pertalpb@bogor.indo.net.id

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan di bawah ini, Dekan Fakultas Pertanian IPB menerangkan bahwa nama berikut :

Dewi Sukma
Departemen Agronomi dan Hortikultura IPB
I Made Artika
Departemen Biokimia IPB
Efi T. Tondok
Departemen Proteksi Tanaman IPB

telah mempresentasikan makalah secara oral yang berjudul :

POTENSI PROTEIN ANTICENDAWAN DARI TANAMAN *Trichosanthes Cucumerina* Var. *Angulina* DAN *Trichosanthes Tricuspidata*

pada Seminar Nasional Hasil Penelitian yang Dibiayai oleh Hibah Kompetitif yang diselenggarakan oleh Fakultas Pertanian IPB bekerja sama dengan Ditjen Pendidikan Tinggi Depdiknas dan Kantor Pusat Perlindungan Varietas Tanaman (PPVT) Deptan tanggal 1 & 2 Agustus 2007 di Fakultas Pertanian Kampus IPB Darmaga, Bogor.

Demikian Surat Keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bogor, 2 Agustus 2007

Dekan Fakultas Pertanian IPB



Prof. Dr. Ir. Didy Sopandie, M.Agr
31 124 019



C. SINOPSIS PENELITIAN LANJUTAN

Dari hasil penelitian tahun pertama telah ditemukan bahwa bagian-bagian tanaman *T. Cucumerina* dan *T. Tricuspidata* menunjukkan aktivitas kitinase dan peroksidase yang berbeda-beda. Demikian juga dengan kultur tunas *in vitro*, kultur kalus dan akar. Akar dan batang tanaman *T.cucumerina* menunjukkan aktivitas kitinase yang tinggi, sedangkan pada *T. tricuspidata* aktivitas kitinase yang tinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapang dan tunas *in vitro*.

Dari hasil pengembangan kultur *hairy root* ditemui kendala lambatnya pertumbuhan dan perkembangan biomassa kandidat *hairy root*. Namun kandidat tetap berpotensi untuk dikembangkan karena kalau *hairy root* yang tumbuh cepat bisa diperoleh, maka kemudahan sistem produksi dan studi protein bioaktif *in vitro* juga akan diperoleh.

Penelitian pada tahun ke-2 juga menemukan bahwa perlakuan asam salisilat dapat mempengaruhi atau meningkatkan aktivitas kitinase dan peroksidase dari beberapa jenis jaringan tanaman dan hal tersebut sangat dipengaruhi oleh waktu setelah perlakuan asam salisilat.

Pengujian aktivitas anticendawan *in vitro* dari ekstrak protein kasar menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan cendawan *Helminthosporium tursicum*. Aktivitas penghambatan yang tinggi dihasilkan oleh ekstrak protein dari akar *T. tricuspidata*, serta akar dan batang *T. cucumerina*. Hal ini sekilas terlihat berhubungan dengan aktivitas kitinase yang tinggi yang dihasilkan dari pengujian dengan substrat dan pengamatan secara spektrofotometrik.

Dengan hasil-hasil yang sudah diperoleh sebelumnya diperlukan lanjutan penelitian untuk mengidentifikasi lebih mendalam karakter protein bioaktif yang terdapat pada *T. cucumerina* dan *T. tricuspidata*. Karena itu pada penelitian di tahun ke-3 direncanakan kegiatan penelitian isolasi, fraksinasi, pengujian aktivitas kitinase dan peroksidase, pengujian aktivitas antimikroba *in vitro*, dan elektroforesis fraksi protein dari akar tanaman *T. Tricuspidata*, serta akar dan batang tanaman *T. cucumerina* dan kultur *in vitro* (tunas/akar/*hairy root*).

Dari kegiatan penelitian pada tahun ke-3 diharapkan dapat diperoleh informasi sebagai berikut :

1. Dapat diperoleh fraksi protein yang menunjukkan aktivitas kitinase dan peroksidase tinggi.
2. Dapat diketahui fraksi protein yang menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat dalam uji *in vitro* .
3. Dari elektroforesis fraksi yang memiliki bioaktivitas tinggi dapat diduga berat molekul proteinnya.
4. Dapat diketahui korelasi aktivitas kitinase/peroksidase dengan aktivitas penghambatan cendawan *in vitro*.