

HUBUNGAN ANTARA AKTIVITAS POLIGALAKTURONASE DENGAN VIRULENSI RAS 4 *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*

THE ROLE OF POLYGALACTURONASE TOWARDS THE VIRULENCE OF RACE 4 OF *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*

Arif Wibowo*, Siti Subandiyah, dan Christanti Sumardiyono

Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian,
Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Lilieek Sulistyowati

Fakultas Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang

Peter Taylor

School of Molecular and Microbial Sciences, The University of Queensland, St. Lucia

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: arif@faperta.ugm.ac.id

ABSTRACT

One of the major constraints of banana plantation in Indonesia is the occurrence of fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. The pathogen produced series of cell wall degradation extracellular enzymes which have important roles in pathogenicity. Many studies have been conducted to know the role of degrading enzyme banana pectin is the major component of cell wall. Many pectinolytic enzymes such as polygalacturonase and others have been isolated from many fungal plant pathogens.

The study was aimed to know the role of polygalacturonase towards the virulence of race 4 of *F. oxysporum f.sp. cubense*. The result showed that from 10 isolates of race 4 of *F. oxysporum f.sp. cubense*, the most virulent isolate was *Lmp1* followed by *Srg1*, *Bgl6*, *Mln1*, *Bgl3*, *A13*, *Bnt2*, *Gnk3*, *Kjg1* dan *Wsb5*. This was indicated by high and low percentage of wilting leaves of banana cultivar Cavendish when they were inoculated with these isolates. Incubation period varied from 3 to 6 weeks after inoculation. SDS-PAGE showed that polygalacturonase, mostly *PG1* and *PG2*, was secreted by these isolates, whereas *PG3* was only found in growing cultures of *Gnk3* and *Wsb5* isolates. Detection of polygalacturonase activity with diffusion agar and reducing sugar methods showed that the activity of polygalacturonase secreted by *F. oxysporum f.sp. cubense* in the growing culture had no correlation with the virulence of the fungal pathogen.

Key words: *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, polygalacturonase, virulence

INTISARI

Salah satu kendala utama dalam budidaya pisang di Indonesia adalah gangguan penyakit layu fusarium yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. Jamur patogen ini menghasilkan serangkaian enzim ekstraselular pendegradasi dinding sel yang berperan dalam patogenesis. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui peran enzim yang mendegradasi pektin, yang merupakan komponen penting dinding sel tanaman. Beberapa enzim pektinolitik seperti poligalakturonase dan yang lainnya telah berhasil diisolasi dari berbagai spesies jamur penyebab penyakit tanaman.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peranan poligalakturonase terhadap virulensi ras 4 *F. oxysporum f.sp. cubense*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa dari 10 isolat *F. oxysporum f.sp. cubense*, yang mempunyai virulensi tertinggi hingga yang terendah berturut-turut adalah *Lmp1*, *Srg1*, *Bgl6*, *Mln1*, *Bgl3*, *A13*, *Bnt2*, *Gnk3*, *Kjg1* dan *Wsb5*. Hal ini ditunjukkan dengan tinggi-rendahnya nilai persentase daun layu yang ditimbulkan oleh isolat-isolat tersebut pada bibit pisang kultivar Cavendish. Masa inkubasi bervariasi dari 3 hingga 6 minggu setelah inokulasi. Uji SDS-PAGE menunjukkan bahwa pada filtrat pertumbuhan isolat jamur-jamur patogen ini disekresikan poligalakturonase (PG) terutama *PG1* dan *PG2*, sedangkan *PG3* hanya dijumpai pada filtrat pertumbuhan isolat *Gnk3* dan *Wsb5*. Adapun hasil deteksi aktivitas poligalakturonase dengan metode difusi agar serta gula reduksi menunjukkan bahwa aktivitas poligalakturonase yang disekresikan oleh *F. oxysporum f.sp. cubense* di dalam filtrat pertumbuhannya tidak berhubungan dengan virulensi jamur patogen tersebut.

Kata kunci: *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*, poligalakturonase, virulensi

PENGANTAR

Salah satu kendala yang dihadapi oleh petani pisang di Indonesia adalah penyakit layu fusarium atau layu Panama yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*. Menurut Djatnika & Nuryani (1995), di Indonesia penyakit layu fusarium telah menyebabkan kerusakan parah pada pertanaman pisang di Lampung, Jawa

Barat, Jawa Timur, dan beberapa daerah lain. Sampai saat ini telah diketahui 4 ras *Fusarium oxysporum f.sp. cubense* berdasarkan patogenisitas terhadap kultivar pisang yang berbeda dan 3 di antaranya merupakan patogen utama pada pisang. Ras 1 merupakan ras yang virulen terhadap pisang kultivar Gros Michel (AAA) dan Lady Finger (AAB), ras 2 virulen pada kultivar Bluggoe

(ABB), ras 3 virulen pada *Heliconia* spp., sedangkan ras 4 virulen pada kultivar Cavendish (AAA) dan kultivar yang rentan terhadap ras 1 dan 2 (Brown & Ogle, 1997).

Meskipun kultivar Cavendish hanya rentan terhadap serangan ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, akan tetapi pada kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan terhadap perkembangan tanaman pisang, ras 1 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* juga dapat menginfeksi kultivar Cavendish (Su *et al.*, 1986). Wibowo *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* telah tersebar di berbagai daerah sentra produksi pisang di Indonesia seperti Jawa, Lampung dan Kalimantan.

Pada umumnya patogen tanaman mampu menghasilkan enzim pada saat terjadi kontak dengan permukaan inang sehingga dapat merusak dan mematikan jaringan tanaman tersebut (Agrios, 1988; Brown & Ogle, 1997). Permukaan tumbuhan umumnya terdiri atas selulosa dan kutikula yang menyusun dinding sel epidermal. Kutikula terutama tersusun atas kitin dan seringkali permukaannya ditutupi oleh lapisan lilin. Dinding sel epidermal mungkin mengandung protein dan lignin. Beberapa jamur patogen mampu melakukan penetrasi secara langsung pada lapisan kutikula dengan dibantu enzim pengurai dinding sel (Mendgen *et al.*, 1996) sehingga mengakibatkan terjadinya kerusakan dinding sel (selulosa, pektin, dan hemiselulosa) dan lamela tengah (pektin). Enzim yang dihasilkan oleh patogen berperan untuk menguraikan pektin, selulosa, lipid dan komponen protein tanaman inang (Asahi *et al.*, 1979; Williams, 1979). Salah satu enzim pengurai dinding sel yang berperan dalam proses infeksi tanaman oleh jamur patogen adalah pektinase (Bateman & Millar, 1966).

F. oxysporum f.sp. *cubense* menghasilkan serangkaian enzim ekstraselular pendegradasi dinding sel yang berperan dalam patogenesis. Banyak penelitian dilakukan untuk mengetahui peran enzim yang mendepolimer pektin, suatu komponen penting dinding sel tanaman dan lamela tengah. Poligalakturonase (PG; *poly- α -1,4-galacturonide glycanohydrolase*) dan enzim pektinolitik lain telah diisolasi dari berbagai macam bakteri dan jamur patogen tanaman (Collmer & Keen, 1986).

Menurut Walton (1994), poligalakturonase merupakan enzim ekstraseluler yang telah lama dikemukakan berperan penting dalam patogenitas jamur terhadap tanaman dengan menguraikan homogalakturonan yang merupakan suatu komponen besar dalam dinding sel. Poligalakturonase atau pektat hidrolase adalah enzim yang memecah pektin pada ikatan glikosidik dengan cara hidrolisis. Enzim ini sukar memecah pektin metoksil tinggi, namun dapat memecah pektin metoksil rendah dan substrat yang paling baik untuk dipecah adalah asam pektat. Poligalakturonase sendiri dapat dihasilkan baik oleh tanaman, jamur dan bakteri. Penelitian ini bertujuan

untuk mengetahui hubungan antara aktivitas poligalakturonase yang disekresikan oleh *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pada medium pertumbuhannya terhadap virulensi jamur patogen tersebut.

BAHAN DAN METODE

Isolat ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense*

Isolat ras 4 *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* yaitu Bnt2, Mln1, Srg1, Bgl6, Bgl3, Lmp1, A13, GnK3, Wsb5 berasal dari koleksi Laboratorium Ilmu Penyakit Tumbuhan Klinik, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Isolat-isolat tersebut dibiakkan pada medium PDA (*potato dextrose agar*) miring.

Uji Patogenitas

Rancangan percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas 5 ulangan. Analisis varian (Anova) dilakukan untuk melihat beda nyata antar-perlakuan dilanjutkan dengan uji jarak Duncan pada aras 5%.

Bibit tanaman pisang kultivar Cavendish berumur 2 bulan yang diperoleh dari hasil kultur jaringan ditanam pada tanah steril dalam polibag berukuran 5 kg. Inokulum *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, berupa medium beras steril yang telah diinokulasi dengan jamur patogen tersebut dan diinkubasikan selama 2 minggu. Inokulasi *F. oxysporum* f.sp. *cubense* pada medium tanam dilakukan 1 minggu setelah tanam dengan dosis inokulum sebanyak 30 g per polibag. Persentase daun layu diamati 1 minggu sekali selama 8 minggu (Wibowo *et al.*, 2001).

Deteksi Poligalakturonase

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

Isolat ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ditumbuhkan dalam 100 ml medium sintetik (SM), yang terdiri atas 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,4 g KH_2PO_4 ; 0,2 g KCl; 1 g NH_4NO_3 ; 1 g $FeSO_4$; 0,01 g $ZnSO_4$; 0,01 g $MnSO_4$ dan 10 g sitrus pektin dalam 1 liter air steril, kemudian digoyang dengan *shaker* pada 150 rpm selama 1 minggu pada suhu 28°C. Kultur disaring dengan kain kasa steril untuk memisahkan miselium dan filtrat disentrifugasi pada 6039,5 x g selama 15 menit. Supernatan dicampur dengan amonium sulfat 90% dalam gelas piala dan dihomogenisasi dengan *stirer*. Suspensi diinkubasi selama satu malam pada suhu 4°C dan kemudian disentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit. Pelet dilarutkan dengan PBS (*phosphate buffer saline*) 0,02 M pH 7,2; didialisis menggunakan membran dialisis dalam 1 liter PBS 0,02 M pH 7,2 sebanyak 3 kali selama 24-26 jam. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian dideteksi dengan metode SDS-PAGE, setiap 5 μ l sampel ekstrak enzim ditambah 1 μ l SDS *loading buffer* dan dipanaskan pada suhu 95°C

selama 3-5 menit. Sampel ekstrak enzim dimasukkan ke dalam sumuran agar dan dielektroforesis pada voltase 100 V, 15 mA selama 1 jam. Selanjutnya agar direndam dengan larutan *fixing solution*, diberi larutan pewarna (*coomassie brilliant blue*) selama 1-3 jam dan dilakukan *destaining* hingga pita protein terlihat jelas (Ausubel *et al.*, 2002).

B. Aktivitas poligalakturonase

Rancangan percobaan adalah Rancangan Acak Lengkap dengan 3 ulangan. Analisis statistik dengan analisis varian (Anova) dan beda nyata diuji berdasarkan uji jarak ganda Duncan pada aras 5%.

Aktivitas poligalakturonase diuji dengan 2 metode yang berbeda yaitu uji secara semi kuantitatif dengan metode difusi agar dan uji kuantitatif dengan metode gula reduksi. Difusi agar dilakukan dengan menggunakan 1% (w:v) asam poligalakturonat; 1% ekstrak khamir; 2,2 mM EDTA; 110 mM sodium asetat (pH 5,5); 0,8% agarosa dan 0,1% sodium azid. Medium disterilkan pada 121°C selama 1 menit dan dituang ke dalam petridis sebanyak 10 ml, ditunggu hingga mengental dan dilubangi dengan bor gabus. Lubang diisi dengan 20 µl medium difusi agar dan selanjutnya diisi dengan 30 µl sampel ekstrak enzim dan diinkubasikan selama 16-18 jam pada suhu 28°C. Permukaan agar kemudian dituangi dengan 1 ml 4 M HCl dan diamati diameter halo yang terbentuk (Raymond & Secor, 1988).

Untuk metode gula reduksi, isolat ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* ditumbuhkan dalam medium PDB (*potato dextrose broth*). Setelah berumur 4 hari, mikrokonidium jamur dipanen dengan melewati kultur cair melalui kain kasa steril. Kerapatan mikrokonidium diatur hingga 10⁶ sel/ml. Satu mililiter suspensi mikrokonidium kemudian ditumbuhkan pada 20 ml medium sintetik (SM) dan digoyang dengan menggunakan shaker pada 150 rpm selama 48 jam pada suhu 28°C. Kultur cair disaring dengan kertas saring Whatman No.40 dan ekstrak enzim kasar yang diperoleh disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan untuk uji selanjutnya.

Standar campuran reaksi (490 µl 0,05 M sodium asetat buffer pH 4,75; 10 µl asam poligalakturonat 1% dan 500 µl ekstrak enzim) diinkubasi pada 37°C selama 30 menit kemudian diukur aktivitas poligalakturonase dengan spektrofotometri sesuai dengan metode Nelson-Somogyi. Sampel standar campuran reaksi sebanyak 1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambahkan reagensia Nelson kemudian dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Tabung diambil dan segera dinginkan di dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin, ditambahkan 1 ml reagensia arsenomolibdat dan digojog hingga semua endapan Cu₂O yang ada larut kembali, kemudian ditambahkan 7 ml akuades dan digojog hingga

homogen. Masing-masing larutan tersebut ditera absorbansinya pada pajang gelombang 540 nm dengan menggunakan spektrofotometer (UV-VISIBLE 1650PC Shimadzu).

Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan kurva standar yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dan konsentrasi larutan asam D-galakturonat (Di Pietro & Roncero, 1996a). Aktivitas poligalakturonase (PG) dihitung berdasarkan rumus dari Paday (1990 *cit.* Oramahi, 2008). Satu unit aktivitas poligalakturonase didefinisikan sebagai kemampuan enzim untuk membebaskan 1 µg asam D-galakturonat pada kondisi pengujian.

HASIL DAN PEMBAHASAN

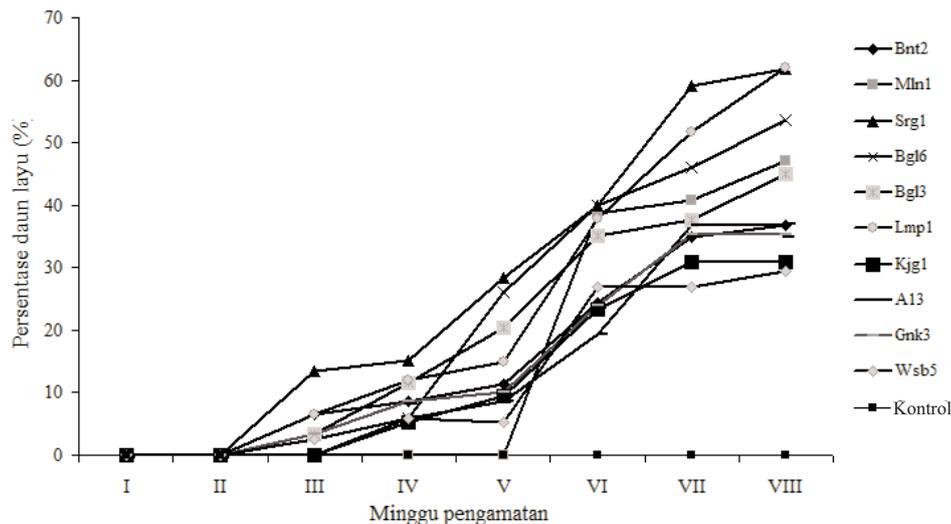
Uji Patogenisitas

Hasil pengamatan persentase daun layu menunjukkan bahwa gejala penyakit layu fusarium mulai muncul pada minggu ke-3 setelah inokulasi yaitu pada perlakuan isolat Bnt2, Srg1, Bgl3, Lmp1, Gnk3 dan Wsb 5. Adapun dengan perlakuan isolat Bgl6, Kjg1, A13, gejala layu fusarium mulai muncul pada minggu ke-4 dan baru pada minggu ke-6 untuk isolat Mln1 (Gambar 1).

Gambar 1 juga menunjukkan bahwa persentase daun layu pada pisang kultivar Cavendish pada minggu ke-8 setelah inokulasi mencapai 29,4% hingga 61,9%. Secara umum perkembangan intensitas penyakit mulai meningkat dengan cepat pada minggu ke-4 setelah inokulasi. Pada perlakuan Srg 1, persentase daun layu pada minggu ke-4 baru mencapai 15,2%, akan tetapi pada minggu ke-8, persentase daun layu pada perlakuan ini telah mencapai 61,9%. Sedangkan pada perlakuan Wsb5, walaupun gejala layu sudah muncul pada minggu ke-3 dengan persentase daun layu sebesar 2,5% tetapi hanya mencapai 29,4% pada minggu ke-8.

Hasil pengamatan pada minggu ke-8 menunjukkan bahwa persentase daun layu tertinggi ada pada perlakuan dengan isolat Lmp1 yaitu sebesar 62%, diikuti oleh Srg1, Bgl6, Mln1, Bgl3, A13, Bnt2, Gnk3, Kjg1 dan Wsb5 masing-masing sebesar 61,9%; 53,5%; 47%; 45%; 37%; 36,8%; 35,4%; 30,8%; dan 29,4%. Dengan demikian berdasarkan persentase daun layu maka isolat dengan virulensi tertinggi adalah isolat Lmp1 dan yang terendah adalah isolat Wsb5 (Tabel 1).

F. oxysporum f.sp. *cubense* merupakan jamur patogen dengan variabilitas yang tinggi (Ploetz, 1990). Beberapa metode telah dipergunakan untuk mempelajari variabilitas tersebut, di antaranya adalah uji patogenisitas, *vegetative compatibility grouping* (VCG), produksi senyawa volatil, analisis enzim pektinase, serta DNA *fingerprinting* (Pegg *et al.*, 1996). Adapun Wibowo *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa ras 4 *F. oxysporum* f.sp. *cubense* yang dipergunakan dalam penelitian ini dapat dibedakan



Gambar 1. Perkembangan penyakit layu fusarium pisang kultivar Cavendish di rumah kaca setelah diperlakukan dengan 10 isolat ras 4 *F. oxysporum* f.sp.cubense hingga 8 minggu setelah inokulasi

Tabel 1. Persentase daun layu bibit pisang kultivar Cavendish 8 minggu setelah inokulasi *F. oxysporum* f.sp. cubense, serta aktivitas poligalakturonase dalam filtrat pertumbuhan berdasarkan diameter halo dan kadar gula reduksi

Isolat	VCG	Persentase Daun Layu (%)*	Aktivitas PG	
			Berdasarkan Diameter Halo (cm)*	Berdasarkan Gula Reduksi ($\times 10^{-2}$ U/mL)*
Bnt2	01213/16	36,8 bcd	0,76 cdef	1,6 bcd
Mln1	01213/16	47 cd	0,97 f	1,7 bcd
Srg1	01213/16	61,9 d	0,32 b	0,96 bc
Bgl6	01213/16	53,5 cd	0,68 cd	0,65 ab
Bgl3	01213/16	45 cd	0,87 ef	0,79 b
Lmp1	01213/16	62 d	0,81 def	0,93 bc
Kjg1	01213/16	30,8 ab	0,62 c	1,3 bcd
A13	01213/16	37 bcd	0,76 cde	1,4 cd
Gnk3	120	35,4 bc	0,43 b	1,2 bc
Wsb5	120	29,4 ab	0,83 ef	2,5 d
Kontrol	-	0 a	0 a	0 a

Keterangan:

*) Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata menurut Uji Jarak Duncan pada aras 5%

menjadi 2 kelompok VCG yang berbeda, yaitu VCG 01213/16 (Bnt2, Mln1, Srg1, Bgl6, Lmp1, Kjg1 dan A13) dan VCG 0120 (Gnk3 dan Wsb5). Setiap kelompok tersebut mempunyai DNA *fingerprinting* yang berbeda bila dianalisis dengan teknik PCR-RAPD.

Pada penelitian ini, hampir semua isolat jamur yang termasuk dalam VCG 01213/16 (Lmp1, Srg1, Bgl6, Mln1, Bgl3, A13, Bnt2) menyebabkan terjadinya persentase daun layu yang tinggi jika dibandingkan dengan yang termasuk dalam VCG0120 (Gnk3, Wsb5). Hal ini disebabkan VCG 01213/16 merupakan ras 4 yang hanya terdapat di daerah tropik sehingga sering disebut sebagai *tropical race 4*. Kelompok ini diketahui mempunyai virulensi yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok ras 4 yang dijumpai di daerah subtropik (Ploetz, 2005).

Deteksi Poligalakturonase

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

Zimogram dari filtrat kultur *F. oxysporum* f.sp. cubense yang ditumbuhkan pada sintetik medium (SM) yang ditambahkan dengan sitrus pektin sebagai sumber karbon hingga 7 hari, menunjukkan adanya beberapa pita isozim pektinolitik yang berbeda ukurannya (Gambar 2).

Dari zimogram tersebut tampak bahwa ada 3 pita utama yang menunjukkan adanya aktivitas poligalakturonase, yaitu 2 pita pada ukuran sekitar 35 kDa (A,B) dan 1 pita pada ukuran sekitar 60 kDa (C). Di Pietro & Roncero (1996a) menyebutkan bahwa pita protein dengan ukuran 35 dan 37,5 kDa berkorespon dengan isoform glikosilasi dan non-glikosilasi endopoligalakturonase

(endoPG) yang dikenal sebagai PG1. Pita protein dengan ukuran 66 kDa berkorespon dengan eksopoligalakturonase (eksoPG) yang dikenal sebagai PG3 (Maceira *et al.*, 1997). Adapun pita protein yang mendekati ukuran 74 kDa (D), yang merupakan eksopoligalakturonase yang lain yang dikenal sebagai PG2 (Di Pietro & Roncero, 1996b), hanya tampak pada jalur 10 dan 1, yaitu pada kultur filtrat *F. oxysporum* f.sp. *ubense* isolat GnK3 dan Wsb5.

Meskipun isolasi isoform poligalakturonase atau enzim pektinolitik lainnya sangat sulit dilakukan, akan tetapi Di Pietro & Roncero (1996a; 1996b) serta Maceira *et al.* (1997) telah berhasil mengisolasi 3 isoform poligalakturonase dari filtrat kultur *F. oxysporum* f.sp. *ubense* yang kemudian dikenal dengan PG1, PG2 dan PG3. PG1 merupakan endopoligalakturonase sedangkan PG2 dan PG3 merupakan eksopoligalakturonase. Poligalakturonase dibedakan menjadi ekso dan endopoligalakturonase disebabkan adanya perbedaan mekanisme dalam mendegradasi pektin (Vries & Visser, 2001).

Endopoligalakturonase merupakan enzim pektinolitik utama yang disekresikan oleh *F. oxysporum* pada awal fase pertumbuhannya pada medium yang mengandung pektin (Di Pietro & Roncero, 1996a). Endopoligalakturonase ini mempunyai peran dalam pemotongan rantai pektin sehingga akan dihasilkan oligogalakturonat (Vries & Visser, 2001; Favaron *et al.*, 1988). Adapun eksopoligalakturonase berperan dalam degradasi oligogalakturonat menjadi monomer yang akan berperan sebagai supresor pada timbulnya ketahanan tanaman (Lu & Higgins, 1993).

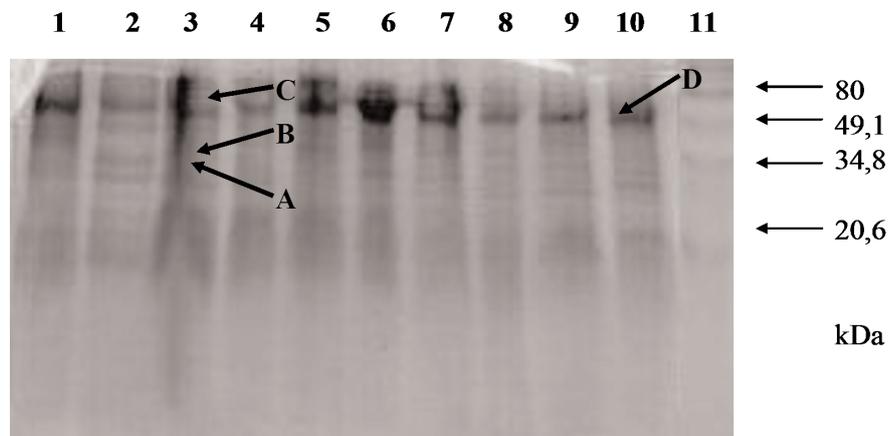
B. Aktivitas poligalakturonase

Hasil pengujian aktivitas poligalakturonase secara semikuantitatif dengan menggunakan metode difusi agar

menunjukkan bahwa diameter halo yang terbentuk berkisar antara 0,32 hingga 0,97 cm (Tabel 1). Semakin besar diameter halo yang terbentuk dalam metode difusi agar ini semakin besar pula aktivitas poligalakturonase (Raymond & Secor, 1988). Dengan demikian berdasarkan metode ini dapat diketahui bahwa aktivitas poligalakturonase yang terbesar adalah pada perlakuan Mln1, diikuti oleh Bgl3, Wsb5, Lmp1, Bnt2 dan A13, Bgl6, Kjg1, GnK3 serta yang terendah pada perlakuan Srg1.

Difusi agar merupakan salah satu metode yang umum dipergunakan untuk mendeteksi aktivitas berbagai macam enzim seperti amilase, arabanase, selulase, lipase, pektinesterase, poligalakturonase, protease dan xilanase (Dingle *et al.*, 1953 *cit.* Raymond & Secor, 1988). Meskipun metode ini mulai dipergunakan sejak tahun 1953, akan tetapi sampai saat ini masih sering dipergunakan untuk mendeteksi aktivitas enzim pektinolitik yang disekresikan oleh jamur maupun bakteri di dalam filtrat pertumbuhannya (Chilosi & Magro, 1998). Kelemahan dalam metode difusi agar ini adalah akurasi yang kurang jika dibandingkan dengan metode kuantitatif yang lainnya (Gothard, 1976 *cit.* Raymond & Secor, 1988). Untuk itu dalam penelitian ini dilakukan juga pengujian untuk mempelajari aktivitas poligalakturonase pada filtrat pertumbuhan *F. oxysporum* f.sp. *ubense* dengan menggunakan metode gula reduksi.

Hasil pengujian aktivitas poligalakturonase dengan menggunakan metode gula reduksi menunjukkan bahwa aktivitas poligalakturonase yang tertinggi adalah pada filtrat pertumbuhan *F. oxysporum* f.sp. *ubense* isolat Wsb5 diikuti oleh isolat Mln1, Bnt2, A13, Kjg1, GnK3, Srg1, Lmp1, Bgl3 dan yang terendah adalah Bgl6 (Tabel 1). Uji aktivitas poligalakturonase dengan menggunakan uji gula reduksi ini merupakan metode kuantitatif berda-



Gambar 2. Pola isozim pektinolitik dari filtrat kultur *F. oxysporum* f.sp. *ubense* yang ditumbuhkan pada medium sintetik (SM) dengan penambahan 1% citrus pektin. Lajur 1 Bnt2; lajur 2 Mln1; lajur 3 Srg1; lajur 4 Bgl6; lajur 5 Bgl3; lajur 6 Lmp1; lajur 7 Kjg1; lajur 8 A13; lajur 9 GnK3; lajur 10 Wsb5; lajur 11 Marker protein standar (Bio Rad). A, B, C dan D adalah pita protein dengan ukuran masing-masing ± 35 , 37.5 kDa; 60 kDa dan 74 kDa.

sarkan terbentuknya gula reduksi (asam D-galakturonat) karena proses hidrolisis pektin oleh poligalakturonase yang dapat diukur secara spektrofotometri dengan menggunakan senyawa yang bereaksi dengan gula reduksi tersebut (Riou *et al.*, 1992).

Pektin bersama-sama dengan selulosa dan hemiselulosa merupakan senyawa utama penyusun dinding sel tumbuhan. Pektin merupakan senyawa heteropolisakarida kompleks yang tersusun atas beberapa polisakarida seperti asam poligalakturonat, rhamnosa, arabinosa, galaktosa serta asam ferulat (Vries & Visser, 2001). Enzim utama pendegradasi pektin terdiri dari pektin liase, pektat liase dan poligalakturonase. Pada *Aspergillus aculeatus* dan *A. tubingensis*, poligalakturonase dapat melepaskan asam galakturonat dari asam poligalakturonat, pektin sugarbeet dan xilogalakturonan (Beldman *et al.*, 1996). Pada uji aktivitas poligalakturonase dengan metode gula reduksi ini, gugus aldehid pada asam D-galakturonat, yang dihasilkan dari hidrolisis asam poligalakturonat oleh poligalakturonase, akan bereaksi dengan Cu^{2+} sehingga akan dihasilkan gugus karboksilat dan Cu^+ yang berbentuk endapan berwarna merah bata. Semakin banyak gula reduksi yang beraksi maka akan semakin banyak endapan Cu^+ yang terbentuk.

Uji aktivitas poligalakturonase dengan menggunakan metode gula reduksi merupakan metode yang mempunyai akurasi lebih baik jika dibandingkan dengan metode difusi agar. Pada metode gula reduksi ini aktivitas poligalakturonase dapat diukur dengan tepat berdasarkan pada konsentrasi asam D-galakturonat yang terbentuk dari proses hidrolisis asam poligalakturonat yang merupakan senyawa penyusun pektin. Adapun pada metode difusi agar aktivitas poligalakturonase hanya diukur berdasarkan diameter halo yang terbentuk yang merupakan hasil hidrolisis asam poligalakturonat oleh poligalakturonase yang terdifusi pada medium difusi agar. Beberapa faktor berpengaruh terhadap keberhasilan difusi poligalakturonase pada medium difusi agar adalah jenis, konsentrasi, pH serta kondisi agar, suhu serta lama masa inkubasi. Raymond & Secor (1988) menunjukkan bahwa penggantian sitrus pektin dengan asam poligalakturonat, pengurangan konsentrasi agar serta pewarnaan halo dengan *ruthenium red* akan memperbesar sensitivitas metode uji gula reduksi ini.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa aktivitas poligalakturonase yang disekresikan oleh *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tidak berpengaruh pada virulensi jamur patogen tersebut. Hal ini dapat diketahui dari persentase daun layu yang ditimbulkan oleh *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, tinggi atau rendahnya persentase daun layu tersebut tidak diikuti dengan tinggi atau rendahnya aktivitas poligalakturonase yang disekresikan oleh jamur patogen tersebut (Tabel 1). Hal ini didukung pula oleh hasil anali-

sis statistik dengan regresi linier yang menunjukkan bahwa koefisien korelasi (r) antara aktivitas poligalakturonase dan persentase daun layu sangat rendah yaitu hanya sebesar 0,02.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa poligalakturonase berperan dalam patogenisitas jamur patogen. Biehn & Dimond (1971) menunjukkan bahwa pemberian galaktosa pada pertanaman tomat dapat menurunkan intensitas penyakit layu fusarium yang disebabkan oleh *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Hal ini disebabkan karena pemberian galaktosa dapat menekan sintesis poligalakturonase oleh jamur patogen tersebut. Demikian pula, Di Pietro & Roncero (1996a) telah mengamati terbentuknya poligalakturonase pada ekstrak batang tomat yang terinfeksi oleh *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, sehingga diduga bahwa poligalakturonase ini berperan dalam patogenisitas jamur patogen tersebut. Penelitian lebih lanjut yang dilakukan oleh Baayen *et al.* (1997) menunjukkan bahwa pada tanaman anyelir yang terserang oleh *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, bila intensitas penyakit layu fusariumnya semakin tinggi, maka semakin tinggi pula aktivitas poligalakturonase yang disekresi oleh jamur patogen tersebut pada ekstrak batangnya. Walaupun telah diketahui bahwa poligalakturonase mempunyai peran yang penting dalam patogenisitas jamur terhadap tanaman (Di Pietro *et al.*, 1998), akan tetapi penelitian ini menunjukkan bahwa poligalakturonase yang disekresikan oleh *F. oxysporum* f.sp. *cubense* bukan merupakan faktor yang berpengaruh pada virulensi jamur patogen tersebut. Di Pietro *et al.* (1998) menunjukkan bahwa baik dari isolat-isolat *F. oxysporum* f.sp. *melonis* yang menghasilkan poligalakturonase dengan aktivitas yang tinggi dan rendah, isolat-isolat tersebut tetap mempunyai virulensi yang sama pada tanaman melon. Percobaan lebih jauh dengan menggunakan mutan *F. oxysporum* f.sp. *melonis* yang telah disisipi dengan gen *pg1* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan virulensi antara mutan tersebut dengan *wild type*-nya yang hanya mampu menghasilkan poligalakturonase dengan aktivitas yang rendah (Di Pietro & Roncero, 1998). Dengan demikian dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa virulensi *F. oxysporum* f.sp. *cubense* tidak berhubungan dengan aktivitas poligalakturonase yang disekresikan oleh jamur patogen tersebut dalam filtrat pertumbuhannya.

Poligalakturonase bukan merupakan satu-satunya enzim yang dihasilkan oleh jamur patogen dalam proses patogenisitasnya. Selain poligalakturonase, beberapa enzim yang terlibat dalam degradasi dinding sel tumbuhan di antaranya adalah pektin metilesterase (PME), pektin liase (PNL) serta pektat liase (PL) (Chilosi & Magro, 1998). Enzim pektolitik ini sering dibentuk bersama-sama dalam filtrat pertumbuhan dan berperan secara berurutan dalam proses patogenisitas jamur patogen tumbuhan, sehingga

mengakibatkan degradasi secara menyeluruh terhadap pektik polisakarida dinding sel tumbuhan (Leone & Heuvel, 1987; Chilosi & Magro, 1997). Untuk itu perlu didekati macam-macam enzim pektolitik yang disekresikan oleh *F. oxysporum* f.sp. *cubense* dalam filtrat pertumbuhannya serta peran enzim-enzim ini terhadap patogenisitas serta virulensi jamur patogen tersebut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) serta Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi (Dikti) Republik Indonesia melalui beasiswa BPPS yang telah membiayai penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terimakasih kepada Parwito yang telah membantu jalannya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G.N. 1988. *Plant Pathology*. Academic Press. San Diego, California. 803 p.
- Asahi, T., M. Kajima., & T. Kosuge. 1979. The Energetics of Parasitism, Pathogenism, and Resistance in Plant Disease. *Plant Disease* 4 : 47-73.
- Ausubel, F.M., R. Brant, R.E. Kinston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. New York. 1600 p.
- Baayen, R.P., E.A.M. Schoffemeer, S. Toet, & D.M. Elgersma. 1997. Fungal Polygalacturonase Activity Reflects Susceptibility of Carnation Cultivars to Fusarium Wilt. *European Journal of Plant Pathology* 103: 15-23.
- Bateman, D.F., & R.I. Millar. 1966. Pectic Enzymes in Tissue Degradation. *Annual Review of Phytopathology* 4: 119-146.
- Beldman, G., L.A.M. van den Broek, H.A. Schols, M.J.F. Searle van Leuwen, K.M.J. van Laere, & A.G.J. Voragen. 1996. An Exogalacturonase from *Aspergillus aculeatus* Able to Degrade Xylogalacturonan. *Biotechnology Letters* 18: 707-712.
- Biehn, W.L. & A.E. Diamond. 1953. Effect of Galactose on Polygalacturonase Production and Pathogenesis by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 61: 242-243.
- Brown, J.F. & H.J. Ogle, 1997. *Plant Pathogens and Plant Disease*. Australian Plant Pathology Society. 556 p.
- Chilosi, G. & P. Magro. 1997. Pectin Lyase and Polygalacturonase Isoenzymes Production by *Botrytis cinerea* during the Early Stages of Infection on Different Host Plants. *Journal of Plant Pathology* 78: 61-69.
- Chilosi, G. & P. Magro. 1998. Pectolytic Enzymes Produced In Vitro and during Colonization of Melon Tissues by *Didymella bryoniae*. *Plant Pathology* 47: 700-705.
- Collmer, A. & N.T. Keen. 1986. The Role of Pectic Enzymes in Plant Pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 24: 383-409.
- Di Pietro, A. & M.I.G. Roncero. 1996a. Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*: Purification, Characterization, and Production During Infection of Tomato Plant. *Phytopathology* 86: 1324-1330.
- Di Pietro A., & M.I.G. Roncero. 1996b. Purification and Characterization of an Exo-polygalacturonase from the Tomato Vascular Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters* 145: 295-299.
- Di Pietro, A., F.I. Garcia-Maceira, M.D.Huertaz-Gonzalez, M.C. Ruiz Roldan, Z. Caracuel, A.S. Barbieri, & M. I.G. Roncero. 1998. Endopolygalacturonase PG1 in Different Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1967-1971.
- Di Pietro, A. & M.I.G. Roncero. 1998. Cloning, Expression and Role in Pathogenicity of PG1 Encoding the Major Extracellular Endopolygalacturonase of the Vascular Wilt Pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11: 91-98
- Djatnika, I. & Nuryani, N. 1995. Pengendalian Biologi Penyakit Layu Fusarium pada Pisang dengan Beberapa Isolat *Pseudomonas Fluorescens*. p. 422-425. In Parman, A. Rohyadi, I.G.E. Gunartha, Murdan, L. Irasakti, M. Sarjan, & W. Wangiyana (eds.), *Prosiding Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah PFI*, Mataram 27-29 September. Universitas Mataram, Mataram.
- Favaron, F., P. Alghisi, P. Marciano, & P. Magro. 1988. Polygalacturonase Isoenzymes and Oxalic Acid Produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in Soybean Hypocotyls as Elicitors of Glyceollin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33: 385-395.
- Leone, G & J.V.D. Heuvel. 1987. Regulation of Carbohydrates of the Sequential *in vitro* Production of Pectic Enzymes by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Botany* 65: 2133-2141.
- Lu, H., V.J. Higgins. 1993. Partial Characterization of a Non-proteinaceous Suppressor of Non-specific Elicitors from *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 427-439.

- Maceira, F.I.G., A.D. Pietro, & M.I.G. Roncero. 1997. Purification and Characterization of a Novel Exopolysaccharuronase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters* 154: 37-43.
- Mendgen, K., M. Hahn, & H. Deising. 1996. Morphogenesis and Mechanism of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 367-386.
- Oramahi, H.A. 2008. Penyakit Simpanan pada Gapek yang Disebabkan oleh *Aspergillus flavus*. Disertasi Pascasarjana Universitas Gadjah Mada Yogyakarta (tidak dipublikasikan).
- Pegg, K.G., N. Y. Moore, & S. Bentley. 1996. Fusarium Wilt of Banana in Australia: a Review. *Australian Journal of Agricultural Research* 47: 637-650.
- Ploetz, R.C. 1990. Population Biology of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, p. 63-67. In R.C. Ploetz (ed.), *Fusarium Wilt of Banana*. APS Press, St. Paul Minnesota.
- Ploetz, R.C. 2005. Panama Disease: An Old Nemesis Rears its Ugly Head Part 2. The Cavendish Era and Beyond. APSnet Feature Story. APS. St. Paul Minnesota.
- Raymond J.T. & G.A. Secor. 1988. An Improved Diffuse Assay for Quantifying the Polygalacturonase Content of *Erwinia* Culture Filtrates. Department of Plant Pathology. North Dakota State University. *Phytopathology* 78: 1101-1103.
- Riou, C., G. Freysinnet, & M. Fevre. 1992. Purification and Characterization of Extracellular Pectinolytic Enzymes Produced by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 578-583.
- Su, H.J., S.C. Hwang, & W.H. Ko. 1986. Fusarial Wilt of Cavendish Bananas in Taiwan. *Plant Disease* 70: 814-818.
- Vries, R.P. & J. Visser. 2001. *Aspergillus* Enzymes Involved in Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65: 497-522.
- Walton, D.J. 1994. Deconstructing the Cell Wall. *Plant Physiology* 104: 1113-1118.
- Wibowo, A., Suryanti, & C. Sumardiyono. 2001. Patogenitas 6 Isolat *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Penyebab Penyakit Layu Fusarium pada Pisang. *Kongres XVI dan Seminar Nasional PFI*, Bogor 22-24 Agustus 2001. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Wibowo, A., S. Subandiyah, C. Sumardiyono, L. Sulistyowati, P. Taylor, & M. Fegan. 2007. Diversity of Race 4 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* Strains from Indonesia, p. 89-90. In Y.B. Sumardiyono, S. Hartono, Mulyadi, T. Arwiyanto, A. Widiastuti, T. Joko, & R. Kasiamdari (eds.), *Proceedings the 3rd Asian Conference on Plant Pathology*, Yogyakarta, Indonesia 20-24 August 2007. Faculty of Agriculture Gadjah Mada University. Yogyakarta.
- Williams, P.H. 1979. How Fungi Induce Disease. *Plant Disease* 4: 163-179.