

Aktivitas Pembentukan secara Cepat Spesies Oksigen Aktif, Peroksidase, dan Kandungan Lignin Kacang Tanah Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*

Oxidative Burst, Peroxidase Activity, and Lignin Content of Sclerotium rolfsii Infected Peanut Tissue

ENDANG PUDJIHARTATI[‡], SATRIYAS ILYAS, SUDARSONO*

Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

Diterima 21 Januari 2006/Disetujui 26 September 2006

The objectives of this experiment were to analyse physiological responses, such as oxidative burst reaction, peroxidase activity, and lignin content of healthy and *S. rolfsii*-infected peanut tissues. Differences in physiological responses among 24 peanut genotypes were determined, the disease severity was calculated and used to group resistance of tested genotypes. The regressions among observed peroxidase activity, lignin content and disease severity were used to determine the possible mechanisms of *S. rolfsii* resistance in peanut. Peanut seeds were grown in polybag and the growing plants were inoculated at the crown, stem, and leaf tissues. Results of the experiment indicated that infection of *S. rolfsii* in peanut did not induce oxidative burst. However, infection of the pathogen resulted in increased peroxidase activity and lignin content in the infected tissues. Regression analysis between peroxidase activity and disease severity showed negative slopes, indicating the more resistance the genotype, the more peroxidase activity in the tissue. Regression analysis between lignin content and disease severity was not significant.

Key words: hypersensitive response (HR), resistance mechanisms, *Sclerotium stem rot*, disease response, *Arachis hypogaea*

PENDAHULUAN

Sclerotium (Athelia) rolfsii Sacc. merupakan cendawan patogen tular tanah yang bersifat nekrotropi, dan merupakan penyebab penyakit busuk pangkal batang pada pertanaman kacang tanah (Hardaningsih 1993; Backman & Brennen 1997). Dalam kondisi lingkungan yang lembap, *S. rolfsii* juga menginfeksi cabang dan daun kacang tanah yang berada di dekat permukaan tanah, dan dapat menjadi jembatan penyebaran pertumbuhan miselium ke bagian tanaman yang lain (Smith *et al.* 1986; Yusnita & Sudarsono 2004).

Infeksi *S. rolfsii* pada kacang tanah rentan di lapangan dapat menurunkan hasil polong hingga 74% (Rani 2001). Dalam lingkungan terkontrol, 32 genotipe kacang tanah yang dievaluasi ketahanannya terhadap infeksi *S. rolfsii* hanya tergolong pada kelompok sangat rentan, rentan, atau agak rentan, meski ada di antaranya yang toleran dan mampu menghasilkan polong (Yusnita & Sudarsono 2004).

Pemahaman tentang mekanisme ketahanan tanaman inang terhadap patogen dapat digunakan sebagai dasar pengembangan galur tahan. Studi respons fisiologis tanaman inang terhadap serangan patogen, sebagai bagian dari interaksi inang-patogen, biasa dilakukan untuk mempelajari mekanisme ketahanan tanaman terhadap patogen.

Respons hipersensitif (*hypersensitive response* = HR) merupakan salah satu mekanisme ketahanan tanaman terhadap patogen (Gozzo 2003). Nekrosis pada reaksi HR umumnya efektif untuk mencegah serangan patogen biotropi (parasit obligat), tetapi kurang efektif untuk patogen nekrotropi seperti *Botrytis cinerea* dan *Sclerotinia sclerotiorum* (<http://www.gwdg.de/~intphyt/vtiedemann/avt/aosreport.html>). Reaksi HR secara fisiologis diawali dengan pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif (*active oxygen species* = AOS) seperti radikal superoksida (O_2^{*-}) atau senyawa H_2O_2 secara cepat (Wolfe *et al.* 2000; Do *et al.* 2003). Pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif memicu berbagai respons fisiologis yang diawali dengan oksidasi membran lipid (komponen membran sel) dan diakhiri dengan reaksi HR. Senyawa AOS juga terkait dengan proses lignifikasi dinding sel (Deighton *et al.* 1999), sehingga meningkatkan kandungan lignin dan penebalan dinding sel tanaman.

Infeksi cendawan juga menginduksi sintesis *patogenesis related protein* (PR-protein) seperti peroksidase. Enzim ini mengkatalisis reaksi oksidasi senyawa fenolik menjadi senyawa kuinon dengan menghasilkan H_2O_2 yang toksik bagi patogen (Do *et al.* 2003). Senyawa kuinon yang dihasilkan merupakan inhibitor terhadap enzim pektolitik patogen melalui reaksi oksidasi gugus SH yang esensial untuk aktivitas enzim tersebut (Lyl 1965). Enzim peroksidase (khususnya *anionic chitin-specific isoperoxidase*) pada tanaman kacang tanah yang ekspresinya terinduksi oleh senyawa kitin mampu menyerap kitin dan menghambat pertumbuhan cendawan (Maksimov *et al.* 2003).

[‡]Alamat kini: Program Studi Agronomi, Faperta, Universitas Kristen Satya Wacana, Jalan Diponegoro 52-60, Salatiga 50711

*Penulis untuk korespondensi, Tel./Fax. +62-251-629347,
E-mail: agrspsipb@indo.net.id

Induksi lignifikasi dinding sel pada jaringan yang terinfeksi cendawan merupakan salah satu sistem pertahanan struktural tanaman (He *et al.* 2002). Peningkatan kandungan lignin ini dapat menghambat penetrasi dan invasi patogen secara fisik, memblokir penyebaran toksin dan enzim yang dikeluarkan oleh patogen, serta menghambat pasokan nutrisi yang dibutuhkan patogen (Vance *et al.* 1980).

Berdasarkan permasalahan dan informasi sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi cendawan maka dilakukan percobaan yang bertujuan untuk menganalisis (i) reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, aktivitas enzim peroksidase dan kandungan lignin pada kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii*; (ii) perbedaan respons fisiologis dari 24 genotipe kacang tanah akibat infeksi *S. rolfisii*; (iii) keterkaitan antara pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, aktivitas peroksidase, dan kandungan lignin dengan intensitas penyakit pada 24 genotipe kacang tanah akibat infeksi *S. rolfisii*.

BAHAN DAN METODE

Genotipe, Inokulasi, dan Pengamatan Respons.

Pembakuan metode analisis aktivitas enzim peroksidase dilakukan pada kacang tanah kultivar Kelinci, Singa, dan Tupai, sedangkan evaluasi respons fisiologis genotipe kacang tanah dilakukan pada 11 kultivar dan 13 genotipe kacang tanah lokal dari berbagai daerah di Indonesia. Benih kacang tanah ditanam dalam pot plastik dengan diameter 22.5 cm dan tinggi 18 cm yang diisi 2 kg media tanam campuran tanah, kompos, dan arang sekam (2:1:1 v/v). Tanaman kacang tanah diinokulasi dengan isolat *S. rolfisii* dari Darmaga, Bogor (Yusnita & Sudarsono 2004) yang telah dibiakkan dalam media *potato dextrose agar* (PDA) selama 5-6 hari. Potongan agar berukuran 0.5-1.0 cm² yang ditumbuhi hifa *S. rolfisii* digunakan sebagai inokulum. Potongan agar dengan hifa ditempelkan pada bagian tanaman kacang tanah yang diuji (daun atau batang dari cabang primer yang terletak dekat permukaan tanah), dan jaringan disungkup dengan kantong plastik untuk menjaga kelembaban. Pada leher akar, inokulasi dilakukan dengan menempelkan dan mengikat potongan agar dan hifa dengan selotip supaya tetap menempel pada leher akar yang diuji.

Respons jaringan kacang tanah terhadap infeksi *S. rolfisii* diamati sepuluh hari sesudah inokulasi (hsi) untuk leher akar atau empat hsi untuk batang dan daun. Gejala penyakit yang muncul pada jaringan kacang tanah diamati dengan skoring sebagai berikut: (i) skoring daun: 0 -tidak ada nekrosis, 1 - nekrosis < 10%, 2 -nekrosis 10-25%, 3 -nekrosis 25-50%, 4 - nekrosis > 50%; (ii) skoring batang: 0 -tidak ada nekrosis, 1 - nekrosis < 10% lingkaran batang, 2 -nekrosis 10-25% lingkaran batang, 3 -nekrosis 25-50% lingkaran batang, 4 -nekrosis > 50% lingkaran batang; (iii) skoring leher akar: 0 -tidak ada nekrosis; 1 -nekrosis < 25% lingkaran leher akar, 2 -nekrosis 25-50% lingkaran leher akar, 3 -nekrosis 50-100% lingkaran leher akar, 4 -nekrosis terjadi hingga cabang primer.

Nilai intensitas penyakit (IP) pada kacang tanah yang diinokulasi *S. rolfisii* dihitung menggunakan metode Yusnita

dan Sudarsono (2004). Selanjutnya IP digunakan untuk mengelompokkan respons ketahanan genotipe kacang tanah yang diuji ke dalam kelompok imun hingga sangat rentan menggunakan kriteria yang telah digunakan oleh Yusnita dan Sudarsono 2004 sebelumnya: imun (I) - jika IP = 0%, tahan (T) - jika 0 < IP ≤ 5%, agak tahan (AT) - jika 5% < IP ≤ 10%, agak rentan (Ar) - jika 10% < IP ≤ 25%, rentan (r) - jika 25% < IP < 50%, dan sangat rentan (Sr) - jika IP > 50%.

Analisis Aktivitas Enzim Peroksidase. Pada tanaman sehat, ekstrak enzim kasar diperoleh dengan menggerus jaringan leher akar, batang, atau daun kacang tanah umur satu bulan. Ekstraksi enzim kasar dari jaringan daun yang terinfeksi *S. rolfisii* dilakukan 2, 24, dan 38 jam setelah inokulasi, sedangkan untuk jaringan leher akar dan batang yang terinfeksi ekstraksi dilakukan pada 4, 48, dan 96 jam setelah inokulasi. Untuk menganalisis aktivitas peroksidase pada 24 genotipe kacang tanah, enzim kasar diekstraksi dari jaringan batang yang dipanen 72 jam sesudah inokulasi. Ekstraksi dilakukan dalam larutan penyangga fosfat 50 mM dengan pH 6.0. Kandungan protein total dari ekstrak enzim kasar dihitung dengan menggunakan pereaksi Bradford dan kurva standar menggunakan *bovine serum albumin* (BSA, 0-0.7 g/l). Aktivitas enzim peroksidase ditentukan menggunakan metode yang dikembangkan oleh Kar dan Mishra (1976). Satuan aktivitas enzim sebanding dengan peningkatan absorbansi pada panjang gelombang 420 nm/satuan waktu/satuan bobot protein ($\Delta A_{420}/\text{menit/mg protein}$).

Analisis Kandungan Lignin Jaringan. Jaringan leher akar dan batang kacang tanah diinokulasi *S. rolfisii* dengan metode yang telah diuraikan sebelumnya, yaitu setelah empat dan lima hari (berturut-turut untuk batang dan leher akar) dan sepuluh hari di leher akar. Kandungan lignin jaringan kacang tanah terinfeksi ditentukan secara spektrofotometri menggunakan prosedur yang dikembangkan Tobing (1976), tanpa memperhitungkan daya serap bahan. Lignin yang terlarut oleh larutan asetil bromida 25% dalam asam asetat glasial dibaca pada panjang gelombang 280 nm. Kandungan lignin jaringan kacang tanah yang tidak diinokulasi *S. rolfisii* digunakan sebagai pembanding.

Reaksi Pembentukan secara Cepat Spesies Oksigen Aktif. Analisis reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif pada daun kacang tanah dilakukan mengikuti metode Cessna *et al.* (2000) dengan mengukur produksi oksigen radikal (O_2^*) atau H_2O_2 secara kualitatif. Pada permukaan daun yang dianalisis dilakukan pengecatan dengan *nitroblue tetrazolium* (NBT 1 mM, pH 5.5) dan ditusuk dengan jarum (sepuluh tusukan/daun) atau diinokulasi dengan cendawan *S. rolfisii*. Contoh daun dipanen dari tanaman kacang tanah 30 jam setelah perlakuan penusukan atau 64 jam setelah inokulasi *S. rolfisii*. Reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif yang menghasilkan O_2^* atau H_2O_2 menyebabkan terbentuknya endapan berwarna biru sebagai akibat reaksi oksidasi senyawa NBT. Untuk memperjelas keberadaan endapan warna biru, klorofil daun dilarutkan dengan perendaman dalam etanol 95% selama 48 jam.

Download English Version:

<https://daneshyari.com/en/article/2086166>

Download Persian Version:

<https://daneshyari.com/article/2086166>

[Daneshyari.com](https://daneshyari.com)