

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 ($\Delta A_{420}/\text{menit}/\text{mg protein}$).

Analisis Kandungan Lignin Jaringan. Jaringan leher akar dan batang kacang tanah diinokulasi *S. rolfisii* dengan metode yang telah diuraikan sebelumnya, yaitu setelah empat dan 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.

HASIL

Respons Jaringan Kacang Tanah terhadap Infeksi *S. rolf sii*. Setelah diinokulasi, jaringan leher akar, batang, dan daun kacang tanah terinfeksi *S. rolf sii* antara 87 dan 100%, dengan rata-rata skor gejala antara 1.8 dan 2.8, dan intensitas serangan penyakit antara 36 dan 55% (Tabel 1). Hasil percobaan menunjukkan respons terhadap infeksi *S. rolf sii* pada jaringan leher akar dan batang lebih baik digunakan untuk menduga respons tanaman terhadap infeksi *S. rolf sii* dibandingkan dengan jaringan daun.

Tabel 1. Respons leher akar, batang, dan daun tiga kultivar kacang tanah terhadap infeksi *S. rolf sii*

Peubah yang diamati dan kultivar tanaman kacang tanah	Jaringan kacang tanah		
	Leher akar	Batang	Daun
Kejadian penyakit (%)			
Tupai	100aA*	98aA	93bA
Singa	93aA	93aA	87bB
Kelinci	100aA	96aA	98aA
Rataan skor gejala			
Tupai	1.8bB	2.3aB	2.4aB
Singa	1.9bB	2.5aB	1.9bB
Kelinci	2.3bA	2.8aA	2.6aA
IP (%)**			
Tupai	36(r)	47(r)	48(r)
Singa	37(r)	49(r)	38(r)
Kelinci	45(r)	55(Sr)	51(Sr)

*Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil atau dalam kolom (untuk masing-masing peubah) dengan huruf kapital yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$. **IP (intensitas serangan penyakit). r: rentan dan Sr: sangat rentan

Hasil evaluasi 24 genotipe terhadap infeksi *S. rolf sii* pada batang dan leher akar kembali menunjukkan tidak ada genotipe kacang tanah yang resisten terhadap infeksi cendawan ini. Inokulasi pada jaringan leher akar atau batang juga memberikan respons yang sama untuk sebagian besar genotipe kacang tanah yang diuji (Tabel 2), yaitu tergolong sebagai rentan (16 genotipe) atau sangat rentan (4 genotipe). Kacang tanah cv. Simpai berdasarkan respons jaringan batang tergolong agak rentan, sedangkan berdasarkan respons jaringan leher akar tergolong rentan. Sebaliknya, kacang tanah cv. Panter, Kelinci, dan lokal Ciampea berdasarkan respons jaringan batang tergolong sangat rentan, sedangkan berdasarkan respons jaringan batang tergolong rentan (Tabel 2).

Aktivitas Peroksidase pada Jaringan Kacang Tanah Terinfeksi *S. rolf sii*. Infeksi *S. rolf sii* pada jaringan leher akar, batang, dan daun kacang tanah meningkatkan aktivitas enzim peroksidase dibandingkan dengan jaringan sehat (Tabel 3). Puncak peningkatan aktivitas peroksidase pada jaringan daun kacang tanah cv. Singa dan Kelinci lebih cepat dibandingkan jaringan leher akar dan batang, yaitu masing-masing pada 2 dan 24 jam sesudah inokulasi *S. rolf sii* (Tabel 3). Selain itu, jaringan daun kacang tanah cv. Singa dan Kelinci yang diinokulasi dengan *S. rolf sii* juga menunjukkan munculnya gejala nekrosis pada helaian daun akibat infeksi *S. rolf sii* lebih cepat dibandingkan dengan leher akar atau batang kacang tanah.

Kandungan Lignin pada Jaringan Kacang Tanah Terinfeksi *S. rolf sii*. Pada jaringan leher akar dan batang kacang tanah cv. Tupai dan Kelinci sehat, kandungan lignin tidak berbeda nyata. Sebaliknya, pada kacang tanah cv. Singa,

Tabel 2. Respons leher akar (LA) dan batang (BT) dari 11 kultivar dan 13 genotipe kacang tanah lokal terhadap infeksi *S. rolf sii* pada leher akar dan batang

Genotipe kacang tanah	KP (%)		Skor gejala		IP (%)		Ketahanan	
	LA	BT	LA	BT	LA	BT	LA	BT
Kultivar kacang tanah								
Simpai	56e*	84bc	1.7d	1.2j	33d	25j	r	Ar
Kidang	67de	82c	1.7d	1.8g-j	34d	36g-i	r	r
Banteng	83bc	96ab	1.7d	1.8g-j	33d	36g-i	r	r
Badak	67de	96ab	1.8cd	1.9g-j	36cd	38g-i	r	r
Zebra	67de	85bc	2.0cd	1.9 g-j	40cd	39f-i	r	r
Tupai	83bc	100a	1.9cd	2.1d-h	39cd	43d-h	r	r
Landak	83bc	95ab	2.4ab	2.4c-e	48ab	49c-e	r	r
Panter	100a	100a	2.4ab	2.5b-c	48ab	51b-d	r	Sr
Kelinci	94ab	100a	2.4ab	2.6b-d	48ab	52b-d	r	Sr
Jerapah	100a	92a-c	2.6a	2.6b-d	52a	52b-d	Sr	Sr
Singa	100a	100a	2.7a	2.9b	53a	58b	Sr	Sr
Genotipe kacang tanah lokal (Lk.)								
Lampung	67de	85bc	1.8cd	1.5ij	36cd	30ij	r	r
Podoelo	67de	91a-c	1.9cd	1.7hi	39cd	34hi	r	r
Kacang lokal	78cd	82c	1.3e	1.8g-i	27e	36g-i	r	r
Kacang Rende	94ab	89ac	1.7d	1.8g-i	34d	37g-i	r	r
Madura	78cd	84bc	1.7d	1.8e-i	34d	37g-i	r	r
Sul-Sel I	83bc	88a-c	1.8cd	2.0e-h	37cd	39e-i	r	r
Citayam	89a-c	98a	1.8cd	2.0e-h	37cd	41e-h	r	r
Langbau	89a-c	91a-c	2.0cd	2.2c-g	40cd	45c-g	r	r
Suuk putih	100a	89a-c	2.1bc	2.3c-g	42bc	45c-g	r	r
Gombong B	89a-c	96ab	2.1bc	2.4cf	42bc	48c-f	r	r
Ciampea	94ab	83c	2.5a	2.7bc	50a	53bc	r	Sr
Leuweung Kolot	94ab	95ab	2.6a	3.0b	51a	59b	Sr	Sr
Wonogiri	100a	100a	2.6a	3.5a	51a	69a	Sr	Sr

*Angka rata-rata dalam kolom dengan huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$. KP: kejadian penyakit, IP: intensitas penyakit, Ar: agak rentan, r: rentan, Sr: sangat rentan

Tabel 3. Pengaruh waktu panen setelah inokulasi *S. rolf sii* pada jaringan leher akar, batang, dan daun terhadap aktivitas enzim peroksidase (ΔA_{420} /menit/mg protein) pada kacang tanah cv. Kelinci dan Singa

Bagian tanaman dan jam setelah inokulasi	Kelinci			Singa		
	Sehat	Terinfeksi	PP (%)*	Sehat	Terinfeksi	PP (%)*
Leher akar (jam)						
4	0.62bB**	3.47aA	457	2.00bA	2.44aA	22
48	0.73aB	0.75aC	3	0.81bB	1.20aC	50
96	1.66bA	2.82aB	69	0.77bB	1.83aB	136
Batang (jam)						
4	0.14aA	0.19aB	30	0.17aA	0.20aA	21
48	0.38aA	0.47aAB	22	0.37aA	0.81aA	121
96	0.14bA	1.99aA	1282	0.10bA	0.57aA	453
Daun (jam)						
2	0.58aA	0.63aA	9	0.28bA	0.63aA	123
24	0.61bA	0.91aA	48	0.40bA	0.72aA	79
38	0.39aA	0.44aA	13	0.44aA	0.50aA	14

*Persentase peningkatan (PP, %) dihitung dengan rumus $PP = [(Pt-Ps)/Ps]*100\%$, Pt: aktivitas peroksidase pada jaringan terinfeksi dan Ps: pada jaringan sehat. **Angka rata-rata dalam baris (untuk masing-masing kultivar) dengan huruf kecil atau dalam kolom (untuk masing-masing jaringan) dengan huruf kapital yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$

Tabel 4. Kandungan lignin pada leher akar dan batang tanaman kacang tanah cv. Tupai, Singa, dan Kelinci yang sehat dan terinfeksi *S. rolf sii*

Genotipe dan jaringan kacang tanah	Kondisi jaringan kacang tanah		
	Sehat	Terinfeksi	PP (%)*
Tupai			
Leher akar	8.68bA**	19.22aA	110
Batang	8.25Ba	21.15aA	156
Kelinci			
Leher akar	9.58ba	20.38aA	113
Batang	12.12bA	16.72aA	38
Singa			
Leher akar	15.95aA	15.62aA	-2
Batang	9.58bB	14.78aA	37

*Persentase peningkatan (PP, %) dihitung dengan rumus $PP = [(Pt-Ps)/Ps]*100\%$, Pt: kandungan lignin pada jaringan terinfeksi *S. rolf sii* dan Ps: pada jaringan sehat. **Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil dan dalam kolom (untuk masing-masing kultivar) dengan huruf kapital yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$

kandungan lignin jaringan leher akar nyata ($P \leq 0.05$) lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan batang (Tabel 4). Untuk kacang tanah cv. Tupai, Singa, dan Kelinci yang terinfeksi *S. rolf sii*, kandungan lignin jaringan leher akar dan batangnya tidak berbeda nyata ($P \leq 0.05$). Akibat infeksi *S. rolf sii*, jaringan leher akar dan jaringan batang kacang tanah cv. Tupai masing-masing meningkat 110 dan 156% dibandingkan dengan jaringan sehat, sedangkan pada kacang tanah cv. Kelinci masing-masing meningkat 113 dan 38%. Untuk kacang tanah cv. Singa yang terinfeksi *S. rolf sii*, kandungan lignin pada jaringan leher akar menurun 2%, sedangkan pada jaringan batang meningkat 37% dibandingkan dengan jaringan sehat (Tabel 4).

Respons Fisiologis 24 Genotipe Kacang Tanah terhadap Infeksi *S. rolf sii*. Semua genotipe kacang tanah yang diuji memberikan reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif yang negatif akibat infeksi *S. rolf sii* (Tabel 5). Endapan biru akibat reaksi oksidasi senyawa NBT oleh senyawa H_2O_2 tidak tampak pada sisi luar lesio akibat infeksi *S. rolf sii* (Gambar 1). Sebaliknya, endapan biru tampak terbentuk di sekeliling luka tusukan pada jaringan daun kacang tanah yang diuji. Gambar 1 memperlihatkan contoh hasil positif dan negatif uji reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif.

Akibat infeksi *S. rolf sii*, aktivitas peroksidase pada jaringan batang 24 genotipe kacang tanah yang terinfeksi

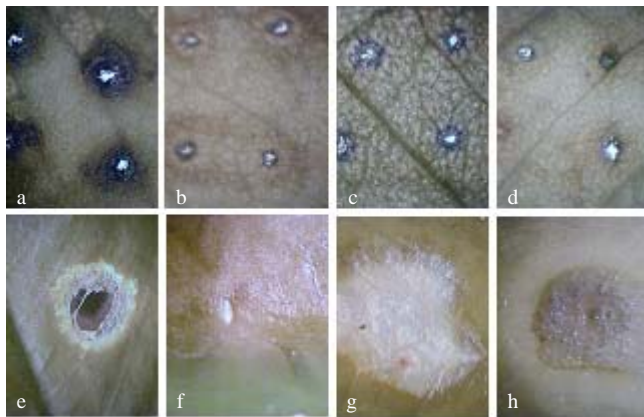
S. rolf sii lebih tinggi dibandingkan dengan jaringan sehat (Tabel 5). Kacang tanah cv. Simpai dan lokal Lanbau mempunyai peningkatan aktivitas peroksidase tertinggi (masing-masing 2287 dan 934%), sedangkan genotipe kacang tanah lokal Suuk Putih dan Wonogiri terendah (masing-masing 34 dan 8%) (Tabel 5). Analisis regresi antara aktivitas peroksidase dan nilai IP, mempunyai nilai kemiringan negatif ($R^2 = 0.64$ untuk leher akar dan $R^2 = 0.69$ untuk batang), yang mengindikasikan tanaman dengan nilai IP yang semakin tinggi (semakin rentan terhadap *S. rolf sii*) mempunyai aktivitas peroksidase yang semakin rendah (Gambar 2).

Infeksi *S. rolf sii* pada leher akar dan batang kacang tanah memicu penimbunan lignin pada semua genotipe kacang tanah yang diuji (Tabel 5). Besarnya peningkatan kandungan lignin berkisar antara 13 dan 1223%. Persentase peningkatan terbesar (Tabel 5) terdapat pada genotipe kacang tanah lokal Lanbau (1223%) dan Suuk putih (995%), dan terendah pada genotipe kacang tanah lokal Podoelo (13%). Ketiga kultivar tersebut tergolong rentan terhadap infeksi *S. rolf sii*. Analisis regresi antara kandungan lignin jaringan batang yang terinfeksi *S. rolf sii* dan nilai IP yang dihitung berdasarkan respons jaringan leher akar dan batang dari 24 genotipe terhadap infeksi *S. rolf sii* tidak berbeda nyata ($R^2 = 0.001$ dan $R^2 = 0.002$) (Gambar 3).

Tabel 5. Respons fisiologis (skor pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif pada daun, kandungan lignin, dan aktivitas peroksidase pada batang) dari 11 kultivar kacang tanah unggul nasional dan 13 genotipe kacang tanah lokal yang sehat dan terinfeksi oleh cendawan *S. rolfsii*

Genotipe kacang tanah lokal	Respons	Pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif*		Aktivitas peroksidase			Kandungan lignin		
		Tusuk	Infeksi	Sehat	Infeksi	PP (%)	Sehat	Infeksi	PP (%)
Kultivar kacang tanah unggul nasional									
Simpai	Ar	+++	-	0.09b	2.06a	2287	3.0a**	4.0la	33***
Kidang	r	++	-	0.26b	1.81a	608	3.9b	7.3a	99
Banteng	r	+	-	0.47b	1.44a	208	5.3b	8.4a	56
Badak	r	++	-	0.47b	1.88a	298	6.0b	8.9a	50
Zebra	r	++++	-	0.37b	1.75a	377	6.0b	20.1a	237
Tupai	r	++++	-	0.60b	2.02a	236	5.0b	13.5a	177
Landak	r	++	-	0.56b	1.35a	141	5.2b	8.4a	70
Panter	r	++	-	0.33b	1.43a	339	8.1b	31.1a	286
Kelinci	Sr	++	-	0.21b	1.53a	646	11.4b	18.7a	71
Jerapah	Sr	++++	-	0.25b	0.86a	249	9.4b	19.3a	113
Singa	Sr	+++	-	0.06b	0.56a	781	6.2b	13.1a	110
Genotipe kacang tanah lokal									
Lampung	r	++	-	0.72b	2.08aa	188	11.1b	20.5a	85
Podoelo	r	+	-	0.30b	1.51a	399	20.2b	22.9a	13
Lokal	r	++	-	0.68b	1.93a	184	13.3b	20.4a	53
Kacang Rende	r	++	-	0.47b	1.45a	208	10.0b	32.5a	239
Madura	r	+	-	0.37b	1.58a	324	12.5b	279a	124
Sul-Sel I	r	++	-	0.94b	2.20a	134	136b	23.4a	73
Citayam	r	+	-	0.60b	1.52a	155	10.6b	21.5a	102
Lanbau	r	++++	-	0.17b	1.72a	934	3.4b	38.6a	1223
Suuk putih	r	++	-	1.18b	1.58a	34	2.4b	25.8a	995
Gombong B	r	++	-	0.49b	1.41a	188	10.4b	29.6a	189
Ciampea	Sr	+	-	0.19b	0.64a	232	10.0b	18.8a	89
Leuweung Kolot	Sr	+	-	0.13b	0.43a	234	3.7b	10.6a	191
Wonogiri	Sr	+++	-	0.40a	0.43a	8	3.5b	16.8a	482

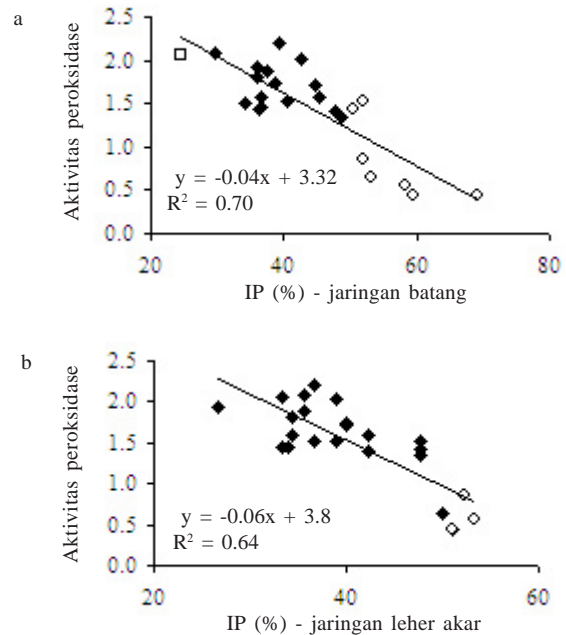
*(-) dan (+): tidak menunjukkan (-) dan menunjukkan (+) adanya aktivitas pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif. **Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada $\alpha = 0.05$. ***Persentase peningkatan (PP, %) dihitung dengan rumus $PP = [(Pt-Ps)/Ps]*100\%$, Pt: kandungan lignin atau aktivitas peroksidase pada jaringan terinfeksi *S. rolfsii* dan Ps: pada jaringan sehat



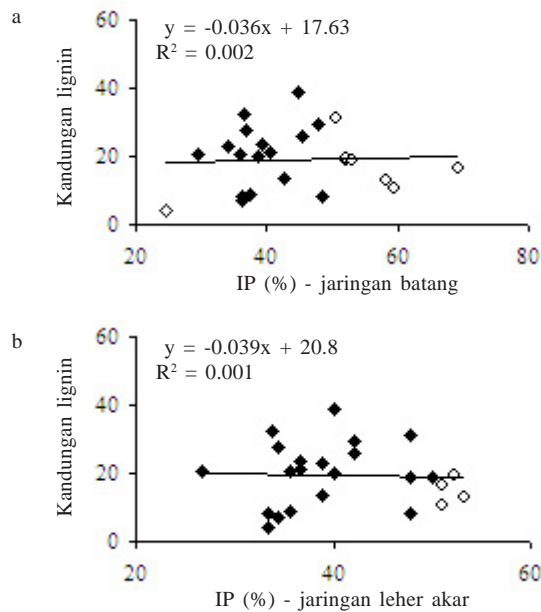
Gambar 1. Reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif pada jaringan daun kacang tanah yang dilukai dengan penusukan (a-d) dan diinokulasi *S. rolfsii* (e-h). a dan e: kacang tanah cv. Singa, b dan f: Simpai, c dan g: lokal Gombong, d dan h: lokal Leuweng Kolot.

PEMBAHASAN

Hasil evaluasi respons 24 genotipe kacang tanah terhadap infeksi *S. rolfsii* dalam penelitian ini mendukung hasil penelitian sebelumnya yang mengelompokkan genotipe kacang tanah tersebut sebagai agak rentan, rentan, dan sangat rentan (Yusnita & Sudarsono 2004). Tetapi, kacang tanah cv.



Gambar 2. Regresi antara intensitas penyakit (IP) yang dihitung berdasarkan respons jaringan batang (a) dan leher akar (b) dari 24 genotipe kacang tanah dengan aktivitas peroksidase jaringan batang yang diinfeksi *S. rolfsii*.



Gambar 3. Regresi antara intensitas penyakit (IP) yang dihitung berdasarkan respons jaringan batang (a) dan leher akar (b) dari 24 genotipe kacang tanah dengan kandungan lignin jaringan batang yang diinfeksi *S. rolfisii*.

Kidang yang sebelumnya dilaporkan agak rentan dan kacang tanah cv. Singa serta Jerapah yang tergolong rentan (Yusnita & Sudarsono 2004), dalam penelitian ini masing-masing diidentifikasi sebagai rentan dan sangat rentan.

Kesamaan respons jaringan leher akar dan batang kacang tanah terhadap infeksi *S. rolfisii*, baik gejala infeksi maupun respons fisiologisnya, memungkinkan evaluasi respons tanaman kacang tanah terhadap infeksi cendawan ini dilakukan dengan menggunakan jaringan batang. Penggunaan jaringan batang lebih menguntungkan karena tidak bersifat destruktif seperti halnya bila menggunakan jaringan leher akar. Inokulasi *S. rolfisii* pada jaringan leher akar tanaman kacang tanah rentan dapat menyebabkan kematian tanaman, sehingga tidak memungkinkan untuk mengevaluasi keturunan dari tanaman yang diinokulasi. Kemampuan untuk mendapatkan keturunan dari tanaman yang diuji respons ketahanannya terhadap infeksi patogen penting artinya dan seringkali diperlukan dalam bidang pemuliaan tanaman.

Gejala nekrosis akibat infeksi *S. rolfisii* pada jaringan daun kacang tanah cv. Singa dan Kelinci terjadi lebih cepat dibandingkan dengan jaringan leher akar atau batang. Gejala infeksi sudah terlihat 30 jam setelah inokulasi jaringan daun, tetapi baru setelah 60 jam pada jaringan batang dan leher akar. Jaringan daun yang terinfeksi *S. rolfisii* mengalami peningkatan aktivitas peroksidase dalam waktu yang lebih cepat dibandingkan dengan jaringan batang atau leher akar.

Genotipe kacang tanah yang menunjukkan respons agak rentan atau rentan terhadap infeksi *S. rolfisii* menunjukkan peningkatan aktivitas peroksidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan yang sangat rentan. Namun demikian, peningkatan aktivitas peroksidase akibat infeksi cendawan yang diamati dalam percobaan ini belum dapat menghambat perkembangan penyakit busuk pangkal batang pada kacang

tanah. Hal ini terjadi karena konsentrasi absolut peroksidasinya masih terlalu rendah untuk menghambat perkembangan *S. rolfisii*. Berdasarkan persamaan regresi, ada kemungkinan menciptakan kultivar kacang tanah tahan terhadap serangan *S. rolfisii* (IP 0-10%) dengan meningkatkan aktivitas enzim peroksidase pada jaringan terinfeksi sebesar $3.34 \Delta A_{420}/\text{menit/mg protein}$ pada batang atau $3.8 \Delta A_{420}/\text{menit/mg protein}$ pada leher akar sebagai mekanisme ketahanan. Hal ini dapat dilakukan dengan menggunakan rekayasa genetika untuk mendapatkan tanaman kacang tanah transgenik yang mengekspresikan aktivitas peroksidase pada tingkat tersebut.

Infeksi *S. rolfisii* pada leher akar dan batang kacang tanah yang diuji dapat meningkatkan kandungan lignin jaringan. Meski peningkatan kandungan lignin yang diamati dalam percobaan ini tidak melindungi jaringan kacang tanah dari infeksi *S. rolfisii*, sintesis lignin pada jaringan xilem leher akar diduga mengurangi tingkat keparahan gejala infeksi karena terjadi penurunan tingkat kematian tanaman.

Hasil regresi antara kandungan lignin dan intensitas serangan *S. rolfisii* dalam penelitian ini mengindikasikan bahwa lignin dan peningkatan lignifikasi tidak berperan langsung dalam mekanisme ketahanan terhadap infeksi *S. rolfisii*. Patogen ini mampu mendegradasi senyawa lignin, seperti halnya cendawan *Basidiomycetes* yang lain sebagai ciri dari cendawan saprofitik pembusuk kayu. Hal ini memperkuat penelitian Sachslehner *et al.* (1998) yang menemukan bahwa miselia *S. rolfisii* terinduksi oleh beberapa mono-, oligo-, dan polisakarida untuk mensintesis mananase, silanase, dan selulase (endoglukanase).

Hasil analisis reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif dalam penelitian ini menunjukkan bahwa infeksi *S. rolfisii* pada semua genotipe uji tidak mengaktifkan pembentukan AOS, tidak seperti cendawan nekrotropis lain, seperti *B. cinerea* yang menggunakan kekuatan oksidatif untuk menyerang, menginvasi, dan merusak jaringan tanaman (von Tiedemann 1997). Mekanisme penekanan pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif pada jaringan kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii* diduga melalui mekanisme yang sama dengan yang diamati pada proses infeksi *Sclerotinia sclerotiorum*. Asam oksalat yang disekresikan *S. sclerotiorum* dilaporkan mempunyai kemampuan menghambat sintesis H_2O_2 (Cessna *et al.* 2000).

Terjadinya nekrosis dan kematian jaringan kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii* bukan karena aktivitas HR, tetapi akibat toksin atau enzim pektolitik yang disekresikan cendawan patogen. Hasil penelitian sebelumnya melaporkan nekrosis jaringan tanaman yang terinfeksi *S. rolfisii* disebabkan oleh aktivitas pektinase dan toksin asam oksalat yang bekerja secara sinergis (Bateman & Beer 1965; Smith *et al.* 1986).

Jaringan kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii* tidak menunjukkan reaksi pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, tetapi umumnya menunjukkan peningkatan aktivitas peroksidase dan peningkatan kandungan lignin jaringan. Berdasarkan hubungan IP dengan aktivitas peroksidase jaringan pada 24 genotipe kacang tanah uji, diperoleh hasil regresi dengan kemiringan negatif, yang berarti

individu tanaman dengan nilai IP yang tinggi (semakin rentan) cenderung mempunyai aktivitas peroksidase yang semakin rendah. Dengan demikian, peningkatan resistensi terhadap infeksi *S. rolfsii* dimungkinkan dengan peningkatan aktivitas peroksidase pada jaringan kacang tanah. Sebaliknya, hasil regresi antara nilai IP dan kandungan lignin jaringan tidak nyata ($P \leq 0.05$) sehingga diduga cendawan *S. rolfsii* mampu mendegradasi lignin.

UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP) angkatan I: *Rekayasa Genetika dan Seleksi In Vitro untuk Mendapatkan Plasma Nutfah Kacang Tanah dengan Novel Characters: Toleran Cekaman Kekeringan dan Resisten terhadap Penyakit Busuk Batang Sclerotium*, atas nama Sudarsono dengan No. Kontrak: 340/P4T/DPPM/IV/2003, Tanggal 25 April 2003, Departemen Pendidikan Nasional, Republik Indonesia. Endang Pudjihartati mendapatkan beasiswa BPPS, Departemen Pendidikan Nasional, Republik Indonesia, untuk program S3 di Sekolah Pascasarjana, IPB, Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

- Backman PA, Breneman TB. 1997. Stem rot. Di dalam: Kokalis-Burelle N, Porter DM, Rodríguez-Kábana R, Smith DH, Subrahmanyam P (ed). *Compendium of Peanut Diseases*. St Paul: APS Pr. hlm 36-37.
- Bateman DF, Beer SV. 1965. Simultaneous production and synergistic action of oxalic acid and polygalacturonase during pathogenesis by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 55:204-211.
- Cessna SG, Sears VE, Dickman MB, Low PS. 2000. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of host plant. *Plant Cell* 12:2191-2200.
- Deighton N, Muckenschnabel I, Goodman BA, Williamson B. 1999. Lipid peroxidation and oxidative burst associated with infection of *Capsicum annuum* by *Botrytis cinerea*. *Plant J* 20:485-492.
- Do HM et al. 2003. Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol Plant-Microb Interac* 16:196-205.
- Gozzo F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Agric Food Chem* 51:4487-4503.
- Hardaningsih S. 1993. Penyakit-penyakit yang disebabkan jamur pada kacang tanah dan cara pengendaliannya. Di dalam: Kasno A, Winarto A, Sunardi (ed). *Monograf Balittan Malang*. No. 12. Malang: Departemen Pertanian. hlm 171-191.
- He CY, Hsiang T, Wolyn DJ. 2002. Induction of systemic disease resistance and pathogen defence responses in *Asparagus officinalis* inoculated with nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol* 51:225-230.
- Kar M, Mishra D. 1976. Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol* 57:315-319.
- Lyl H. 1965. On the toxicity of oxidized phenols. *Phytopathol Z* 52:229-233.
- Maksimov IV, Cherepanova EA, Khairullin RM. 2003. "Chitin-specific" peroxidases in plants. *Biochemistry* 68:111-115.
- Rani I. 2001. Tingkat ketahanan beberapa varietas kacang tanah terhadap *Sclerotium rolfsii* Sacc. [Skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Sachslehner A, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D. 1998. Induction of mannanase, xylanase, and endoglucanase activities in *Sclerotium rolfsii*. *Appl Environ Microbiol* 64:594-600.
- Smith VL, Punja ZK, Jenkins SF. 1986. A histological study of infection of host tissue by *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* 76:755-759.
- Tobing N. 1976. Analisa lignin secara spektrofotometri dari beberapa kayu di Indonesia. *Berita Selulosa* 12:12-19.
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* 18:259-288.
- von Tiedemann A. 1997. Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol* 50:151-166.
- Wolfe J, Hutcheon CJ, Higgins VJ, Cameron RK. 2000. A functional gene-for-gene interaction is required for the production of an oxidative burst in response to infection with avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Mol Plant Pathol* 56:253-261.
- Yusnita, Sudarsono. 2004. Metode inokulasi dan reaksi ketahanan 30 genotipe kacang tanah terhadap penyakit busuk batang *Sclerotium*. *Hayati* 11:53-58.