

Aktivitas Kitinase dan Peroksidase dari Ekstrak Protein Daun, Akar, Kalus dan Tunas *In Vitro* *Trichosanthes tricuspidata* Lour.

Chitinase and Peroxydase Activities of Protein Extract from Leaves, Roots, In Vitro Calli and Shoots of *Trichosanthes tricuspidata* Lour.

Dewi Sukma^{1*}, Roedhy Poerwanto¹, Sudarsono¹, Nurul Khumaida¹,
Suryo Wiyono² dan I Made Artika³

Diterima 7 November 2007/Disetujui 27 Maret 2008

ABSTRACT

A number of *Trichosanthes* species has been reported as a source of bioactive protein associated with defense mechanisms such as chitinase. Chitinase and peroxidase of crude protein extracted from leaves, roots, in vitro calli and shoots of *T. tricuspidata* had been analysed. Calli were induced on MS medium containing combinations of 1 μ M NAA + 1 μ M BA (K1), 2 μ M NAA + 2 μ M BA (K2), 3 μ M NAA + 3 μ M BA (K3), or 4 μ M NAA + 4 μ M BA (K4). Shoots were cultured in MS with 1 mg/l of BA, while leaves and roots were harvested from six-month old plants grown on the field. Results of the experiment suggested that K1-K4 medium could be used to induce calli although weight of calli from all medium composition was not significantly different (0.19-0.31 g/explant/4 weeks). Calli from K1 medium had the highest of total crude protein content (3.24 mg/ml). The highest of chitinase activity was found in in vitro shoots (6.51 mM pNP/hour/mg protein) and the highest peroxidase activity was in the plant roots (0.25 420/minute/mg protein).

Key words: in vitro calli, shoots, crude protein, 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*. *T. tricuspidata* merupakan salah satu spesies yang ditemukan tumbuh liar di hutan penelitian Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, di Dramaga Bogor. *T. tricuspidata* bersifat perenial dengan batang agak berkayu sehingga dapat diperbanyak dengan stek batang (Sukma *et al.*, 2006).

Beberapa spesies *Trichosanthes* dilaporkan mengandung protein bioaktif antimikroba. *T. kirilowii* (spesies *Trichosanthes* yang banyak ditemukan di Cina) menghasilkan protein enzim kitinase dan protein penghambat ribosom (*ribosome inactivating protein* [RIP]) (Savary dan Flores, 1994). Pada *T. cucumerina* yang banyak di Indonesia ditemukan adanya aktivitas antikanker dari fraksi protein yang diisolasi dari akar rambut *in vitro* (Churiah, 2006). Namun aktivitas protein kitinase maupun protein bioaktif lainnya dari *T. tricuspidata* belum pernah dilaporkan.

Kitinase dan peroksidase merupakan dua enzim yang banyak berkaitan dengan respon ketahanan penyakit pada tanaman. Kitinase dapat mendegradasi senyawa kitin yang merupakan komponen utama dari dinding sel berbagai patogen cendawan melalui proses hidrolisis ikatan glikosida 1,4-. Peroksidase berperan dalam proses oksidasi dan polimerisasi prekursor pada proses biosintesis lignin yang berperan sebagai pertahanan fisik terhadap infeksi patogen pada tanaman (Oku, 1994). Peroksidase juga dilaporkan memiliki aktivitas anticendawan (Saikia *et al.*, 2006).

Kasprzewska (2003) menyatakan bahwa kitinase diekspresikan oleh berbagai gen *chi* secara konstitutif pada semua jaringan atau secara spesifik pada jaringan tanaman tertentu. Aktivitas enzim kitinase dan peroksidase pada tanaman dalam kultur *in vitro* juga menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Dengan demikian aktivitas kitinase kemungkinan tidak sama antar berbagai jaringan tanaman atau pada kondisi lapang dan *in vitro*. Identifikasi jaringan tanaman yang memiliki aktivitas kitinase dan peroksidase tinggi akan memudahkan penelitian-penelitian ke arah isolasi enzim maupun isolasi gen pengkode enzim tersebut.

¹ Staf Pengajar Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta IPB, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga Bogor 16680, Telp/Fax (0251) 629353 Hp 0251-7131093, E-mail : dsukma70@yahoo.com (*Penulis untuk korespondensi)

² Staf Pengajar Departemen Proteksi Tanaman, Faperta IPB

³ Staf Pengajar Departemen Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, IPB

Potensi kultur kalus/suspensi sel untuk menghasilkan protein yang berkaitan dengan ketahanan tanaman terhadap patogen 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). Vivanco dan Flores (2000) melaporkan bahwa kultur kalus dan suspensi sel dari *Mirabilis expansa* dapat menghasilkan *ribosome inactivating proteins* (RIP). Kondisi *in vitro* yang steril dan terkontrol memudahkan untuk mempelajari faktor-faktor yang dapat meningkatkan biosintesis senyawa yang diinginkan.

Penelitian ini bertujuan untuk (i) menginduksi pembentukan kalus *in vitro* dari eksplan tunas (ii) menganalisis aktivitas enzim kitinase dan peroksidase pada daun dan akar tanaman dari lapang serta kalus dan tunas *in vitro* dari tanaman *T. tricuspidata*. Hasil analisis diharapkan dapat menjawab pertanyaan bagian tanaman yang memiliki aktivitas enzim kitinase dan peroksidase paling tinggi.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman yang Digunakan

Daun dan akar tanaman dari lapang. Daun dan akar diambil dari tanaman asal stek berdiameter ± 0.5 cm, umur 6 bulan setelah tanam. Tanaman tersebut ditanam dalam polibag dengan media tanah dan pupuk kandang (2:1). Daun yang diambil adalah daun yang sehat dan berkembang sempurna sedangkan akar yang digunakan adalah akar serabut. Daun dan akar dipanen dan segera disimpan dalam *cool box* lalu dibawa ke laboratorium untuk dianalisis.

Tunas *In Vitro*. Tunas *in vitro* *T. tricuspidata* asal kecambah *in vitro* dikulturkan dan diperbanyak dalam media MS (Murashige dan Skoog, 1962) dengan penambahan benziladenin (BA) 1 mg/l. Kultur dipelihara dalam ruang kultur dengan suhu 22-24°C dan pencahayaan terus menerus. Tunas disub kultur setiap 4 minggu sekali ke media yang sama dan digunakan untuk analisis pada umur 4 minggu setelah sub kultur.

Kalus. Induksi kalus dilakukan dalam satu percobaan dengan faktor tunggal komposisi media. Eksplan yang digunakan berupa potongan tunas *in vitro* dua buku. Eksplan 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 *Naphthalene Acetic Acid* (NAA) dan *Benzil Adenine* (BA). Perlakuan kombinasi NAA dan BA yang ditambahkan adalah (1) NAA 1 μ M + BA 1 μ M (K1), (2) NAA 2 μ M + BA 2 μ M (K2), (3) NAA 3 μ M + BA 3 μ M (K3), dan (4) NAA 4 μ M + BA 4 μ M (K4). Percobaan disusun dengan rancangan lingkungan acak lengkap. Satu unit percobaan terdiri atas satu botol

kultur yang ditanami dengan empat eksplan tunas sebagai sampel pengamatan. Setiap perlakuan diulang 10 kali. Kalus dipelihara dalam ruang kultur gelap dengan suhu 22-24°C. Pengamatan dilakukan terhadap waktu mulai terbentuk kalus, diameter kalus, bobot basah kalus.

Analisis Kadar Protein Total (TPT)

Total protein diekstrak dari kalus dan tunas *in vitro* serta dari daun dan akar tanaman dari lapang. Setiap jenis jaringan terdiri dari 3 sampel (3 ulangan). Jaringan tanaman sebanyak 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. Gerasan tanaman disentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm dan suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil dan ditentukan total protein terlarutnya (TPT) menggunakan metode Lowry *et al.* (1951).

Penetapan TPT dengan metode Lowry secara ringkas sebagai berikut: sebanyak 1 ml supernatan hasil ekstraksi protein ditambahkan 5 ml pereaksi C, divorteks, lalu didiamkan pada suhu ruang selama 10 menit. Larutan tersebut kemudian ditambah pereaksi D dan diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Setelah inkubasi, absorbansi larutan dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 500 nm. Total protein terlarut diketahui dengan menggunakan kurva standar dari *Bovin Serum Albumin* (BSA). 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.

Analisis Aktivitas Kitinase

Aktivitas kitinase dalam ekstrak kasar protein dari jaringan tanaman yang dianalisis ditentukan berdasarkan kemampuannya untuk mendegradasi substrat *dimmer p-nitrophenil N-asetil -D glucosaminide* (pNP-NacGluc) mengikuti metode yang digunakan oleh Pujihartati *et al.* (2006a). Sebanyak 100 μ l supernatan hasil ekstraksi protein dicampur dengan 10 μ l substrat pNP-NacGluc 5 mM, divorteks, lalu diinkubasi selama 0 dan 3 jam. Setelah inkubasi, reaksi dihentikan dengan penambahan *Trichloroacetic Acid* (TCA) 20% sebanyak 125 μ l, divorteks lalu disentrifugasi pada 5000 rpm selama 5 menit. Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak 0.3 ml dan ditambahkan 0.7 ml NaOH 0.5 mM. Larutan diinkubasi selama 30 menit, lalu nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 405 nm. Aktivitas kitinase dihitung sebagai banyaknya pNP NacGluc (mM) yang dibebaskan per jam per mg protein (mM pNP/jam/mg protein).

Analisis Aktivitas Peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dari jaringan tanaman yang diuji ditentukan dengan metode yang digunakan sebelumnya (Kar dan Mishra, 1976; Pudjihartati *et al.*, 2006b). Sebanyak 100 µl ekstrak protein jaringan ditambahkan ke dalam larutan 2.5 ml pirogalol 0.2 M. Ke dalam campuran ditambahkan H₂O₂ (1%) sebanyak 250 µl. Nilai absorbansi larutan sesudah reaksi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 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 ($A_{420}/\text{menit}/\text{mg}$ protein) pada kondisi analisis.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pertumbuhan Kalus *T. tricuspidata*

Kalus *T. tricuspidata* dapat terbentuk dari eksplan tunas yang ditanam pada empat komposisi media yang diuji yaitu media K1 (MS + NAA 1 µM + BA 1 µM), K2 (MS + NAA 2 µM + BA 2 µM), K3 (MS + NAA 3 µM + BA 3 µM) dan K4 (MS + NAA 4 µM + BA 4 µM) (Tabel 1). Kalus mulai terbentuk pada 1 Minggu Setelah Tanam (MST), terutama pada media K1 (MS + NAA 1 µM + BA 1 µM), K2 (MS + NAA 2 µM + BA 2 µM) dan pada 2 MST pada K3 (MS + NAA 3 µM + BA 3 µM) dan K4 (MS + NAA 4 µM + BA 4 µM).

Tabel 1. Keberhasilan menginduksi pembentukan kalus dalam berbagai media MS dengan penambahan NAA dan BA

Perlakuan	Eksplan berkalus (%)			Diameter kalus (cm)		Akar (3 MST)	
	1 MST	2 MST	3MST	3 MST	4 MST	%	Jumlah
K1	25	67	100	0.73	0.75	100 a	10a
K2	10	65	100	0.89	1.03	0 b	0 b
K3	5	100	100	0.92	1.01	0 b	0 b
K4	0	100	100	0.84	0.95	0 b	0 b

Keterangan: K1 (MS + NAA 1 µM + BA 1 µM); K2 (MS + NAA 2 µM + BA 2 µM); K3 (MS + NAA 3 µM + BA 3 µM); dan K4 (MS + NAA 4 µM + BA 4 µM). Angka yang diikuti oleh huruf yang sama untuk kolom yang sama pada masing-masing peubah, tidak berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada =0.05

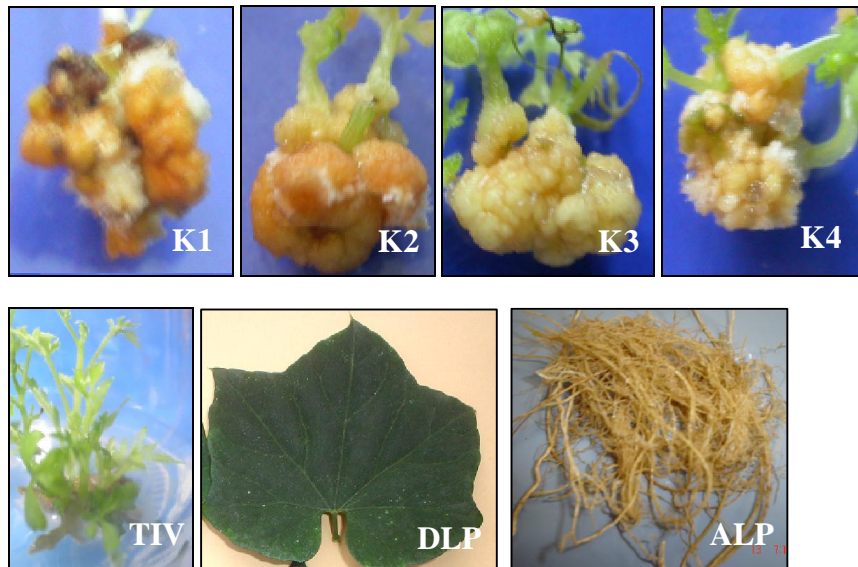
Diameter kalus diukur pada 3 dan 4 MST karena pada 1 dan 2 MST diameter kalus masih terlalu kecil (kurang 5 mm). Pada umur 3 dan 4 MST, tidak terdapat perbedaan yang nyata dari diameter kalus yang dihasilkan pada empat komposisi media yang diuji. Pada media K1 (MS + NAA 1 µM + BA 1 µM), kalus yang dihasilkan juga membentuk akar mulai 3 MST, sedangkan pada 3 media lainnya tidak terbentuk akar. Jumlah akar yang terbentuk pada kalus di media K1 cukup banyak (lebih dari 20 akar) dan berukuran kecil sehingga sulit untuk dihitung. Bobot kalus yang dihasilkan dari setiap eksplan tidak berbeda pada empat

komposisi media yang diuji (Tabel 2). Rata-rata bobot kalus per eksplan yang diperoleh masih kurang dari 0.5 g. Rendahnya bobot kalus yang dihasilkan kemungkinan karena konsentrasi NAA dan BA dalam media yang belum optimal, terutama BA kemungkinan terlalu rendah. Zheng *et al.* (2001) melaporkan bahwa kalus *T. kirilowii* dapat diinduksi dalam media MS yang ditambahkan BA 4 mg/l (10.3 µM) dan IAA 0.2 mg/l (1.141 µM), namun tidak diperoleh informasi biomassa kalus yang diperoleh dari media tersebut. Morfologi kalus yang dihasilkan seperti terlihat pada Gambar 1.

Tabel 2. Rataan bobot kalus pada 4 MST dari berbagai komposisi media MS dengan penambahan NAA dan BA

Perlakuan	Rataan bobot basah		
	Kalus per eksplan (g)	Kalus per botol (g)	Biomasa per botol (g)
K1	0.19	0.76	1.16
K2	0.31	1.24	1.38
K3	0.30	1.20	1.29
K4	0.31	1.24	1.27

Keterangan: K1 (MS + NAA 1 µM + BA 1 µM); K2 (MS + NAA 2 µM + BA 2 µM); K3 (MS + NAA 3 µM + BA 3 µM); dan K4 (MS + NAA 4 µM + BA 4 µM).



Gambar 1. Morfologi tunas *in vitro* (TIV), kalus *in vitro* pada media : K1 (MS + NAA 1 μ M + BA 1 μ M); K2 (MS + NAA 2 μ M + BA 2 μ M); K3 (MS + NAA 3 μ M + BA 3 μ M); dan K4 (MS + NAA 4 μ M + BA 4 μ M) serta daun (DLP) dan akar tanaman (ALP) yang digunakan dalam penelitian.

Kadar Protein Total dari Jaringan Tanaman

Nilai TPT, kadar protein dan persentase protein pada kalus dari empat komposisi media, tunas *in vitro*, daun dan akar dari tanaman di lapang seperti terlihat pada Tabel 3. Perlakuan media induksi kalus tidak berbeda pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan biomasa kalus, namun nyata mempengaruhi total protein dari kalus. TPT tertinggi

dihasilkan dari jaringan kalus yang ditumbuhkan pada media K1 (MS + NAA 1 μ M + BA 1 μ M) yaitu sebesar 3.24 mg/l dan yang terendah dari jaringan tunas *in vitro* dan jaringan akar dari lapangan sebesar 0.74 dan 0.86 mg/l. Nilai kadar protein jaringan dan persentase protein memiliki pola yang sama dengan nilai total protein terlarut dari semua jaringan yang dianalisa.

Tabel 3. Nilai total protein dari berbagai jaringan *T. tricuspidata*

Jaringan tanaman	Total protein terlarut (mg/ml)	Kadar protein (mg/g bahan segar)	Persentase protein
<i>Kalus - in vitro:</i>			
- K1	3.24 a	12.95 a	1.29 a
- K2	2.68 ab	10.73 ab	1.07 ab
- K3	2.21 bc	8.83 bc	0.88 bc
- K4	1.62 cd	6.50 cd	0.65 cd
Tunas <i>in vitro</i> (TIV)	0.74 d	2.95 d	0.29 d
Daun lapang (DLP)	1.54 cd	6.17 cd	0.61 cd
Akar lapang (ALP)	0.86 d	3.46 d	0.34 d

Keterangan: K1 (MS + NAA 1 μ M + BA 1 μ M); K2 (MS + NAA 2 μ M + BA 2 μ M); K3 (MS + NAA 3 μ M + BA 3 μ M); dan K4 (MS + NAA 4 μ M + 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 $\alpha=0.05$.

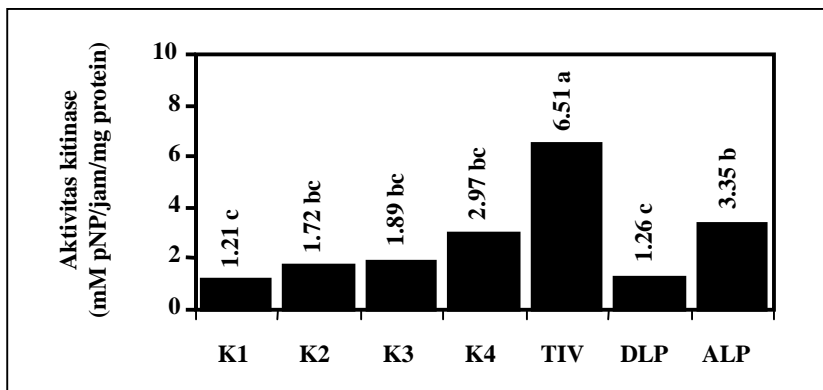
Aktivitas Kitinase

Jenis jaringan yang diuji berpengaruh nyata terhadap aktivitas kitinase dari ekstrak protein tanaman (Gambar 2). Aktivitas enzim kitinase tertinggi ditemukan pada ekstrak protein dari tunas *in vitro* (6.51

mM pNP/jam/mg protein), 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 K2 (MS + NAA

2 μM + BA 2 μM), K3 (MS + NAA 3 μM + BA 3 μM) dan K4 (MS + NAA 4 μM + BA 4 μM), tetapi nyata lebih tinggi dibandingkan dengan dari jaringan yang ditumbuhkan dalam media K1 (MS + NAA 1 μM + BA 1 μM) (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 kitinase pada ekstrak protein kalus dari media K1 (MS + NAA 1 μM + BA 1 μM); K2 (MS + NAA 2 μM + BA 2 μM); K3 (MS + NAA 3 μM + BA 3 μM); dan K4 (MS + NAA 4 μM + BA 4 μM), tunas *in vitro* (TIV) dalam media MS + BA 1 mg/l, serta daun (DLP) dan akar tanaman (ALP) *T. tricuspidata* dari lapangan.

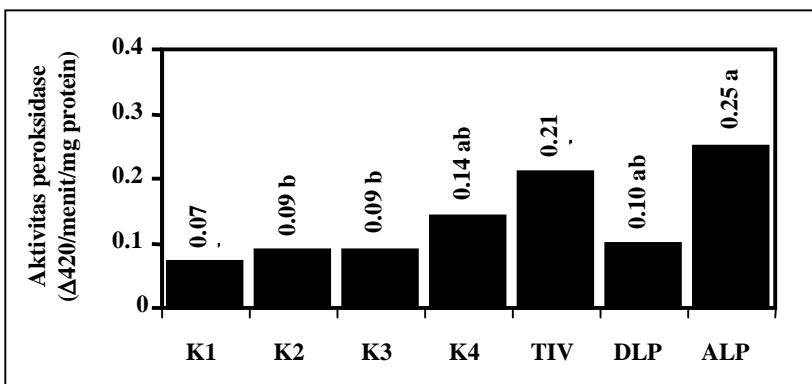
Aktivitas Peroksidase

Jenis jaringan nyata mempengaruhi aktivitas peroksidase dari ekstrak protein tanaman (Gambar 3). Aktivitas peroksidase tertinggi (0.25 [$\Delta 420$ /menit/mg protein]) ditemukan pada ekstrak protein dari akar tanaman dari lapangan, tetapi nilainya hanya berbeda nyata dengan aktivitas kitinase pada ekstrak protein dari kalus yang ditumbuhkan pada media K1 (MS + NAA 1 μM + BA 1 μM), K2 (MS + NAA 2 μM + BA 2 μM), K3 (MS + NAA 3 μM + BA 3 μM). Aktivitas peroksidase pada ekstrak protein dari kalus pada

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

Hubungan antara Kandungan Protein Jaringan dan Aktivitas Enzim.

Hasil analisis korelasi menunjukkan total protein terlarut berkorelasi positif dengan kadar protein jaringan dan presentase protein. Aktivitas kitinase dan peroksidase berkorelasi negatif dengan total protein terlarut dengan nilai korelasi masing-masing -0.76 dan -0.80. Sementara aktivitas kitinase dan peroksidase berkorelasi positif dengan nilai korelasi 0.70.



Gambar 3. Aktivitas peroksidase pada ekstrak protein kalus dari media K1 (MS + NAA 1 μM + BA 1 μM); K2 (MS + NAA 2 μM + BA 2 μM); K3 (MS + NAA 3 μM + BA 3 μM); dan K4 (MS + NAA 4 μM + BA 4 μM), tunas *in vitro* (TIV) dalam media MS + BA 1 mg/l, serta daun (DLP) dan akar tanaman (ALP) *T. tricuspidata* dari lapangan.

Pembahasan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar protein dari semua jaringan tanaman yang diuji baik massa sel yang belum terorganisir berupa kalus maupun sel-sel yang sudah terdiferensiasi membentuk organ batang dan daun (tunas *in vitro*), daun dan akar tanaman dari lapang menunjukkan aktivitas kitinase dan peroksidase. Menurut Collinge *et al.* (1993) dan Regalado *et al.* (2000), enzim kitinase ada yang terakumulasi secara vakuolar atau apoplastik dan diekspresikan 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).

Nilai absolut aktivitas kitinase dan peroksidase berbeda antar jaringan tanaman. Hal ini kemungkinan disebabkan perbedaan tingkat diferensiasi sel/jaringan dan juga faktor lingkungan. Pada kalus dan tunas *in vitro*, lingkungan dalam kondisi steril sehingga faktor yang berpengaruh terhadap ekspresi gen kitinase dan peroksidase kemungkinan adalah faktor abiotik seperti media dan lingkungan. Pada kalus dari empat komposisi media [MS + 1 μ M NAA + 1 μ M BA (K1), MS + 2 μ M NAA + 2 μ M BA (K2), MS + 3 μ M NAA + 3 μ M BA (K3), atau MS + 4 μ M NAA + 4 μ M BA (K4)] terlihat bahwa makin tinggi konsentrasi auksin dan sitokinin dalam media, makin tinggi aktivitas kitinase yang dihasilkan. NAA, BA atau interaksi keduanya kemungkinan dapat meningkatkan aktivitas kitinase. Barwe *et al.*, (2001) melaporkan bahwa BA dapat menginduksi peningkatan aktivitas kitinase pada kotiledon kecambah ketimun. Sementara Hughes dan Dickerson (1991) melaporkan terjadinya peningkatan aktivitas kitinase dan glukukanase oleh perlakuan auksin IAA pada *Phaseolus vulgaris*.

Pada daun dan akar tanaman dari lapang, faktor biotik dan abiotik dapat mempengaruhi ekspresi gen kitinase dan peroksidase. Kitinase termasuk dalam *Pathogenesis Related Proteins* (PRPs) yang ekspresinya meningkat karena adanya infeksi patogen maupun kondisi yang berhubungan dengan proses infeksi patogen (Collinge *et al.*, 1993; Stintzi, 1993; van Loon *et al.*, 1994; Bishop *et al.*, 2000). Kitinase termasuk dalam famili PR-3, 4, 8 dan 11 sedangkan peroksidase ada yang termasuk ke dalam PR-9 (Lagrimini *et al.*, 1997). Stress biotik dan abiotik dari lingkungan dapat mendorong akumulasi PR-protein pada tanaman (van Loon dan Strien, 1999). Tingginya aktivitas kitinase dan peroksidase pada akar tanaman dari lapang kemungkinan diinduksi oleh interaksi

tanaman dengan faktor biotik dan abiotik pada media tanam dengan akar tanaman.

Tunas *in vitro* menunjukkan aktivitas kitinase dan peroksidase yang cukup tinggi dibanding akar, kalus dan daun tanaman dari lapang. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya faktor yang menginduksi ekspresi gen kitinase pada tunas tersebut. Kultur tanaman dalam botol yang tertutup menyebabkan akumulasi etilen (Mele dalam Pierrick, 1987), sementara etilen merupakan salah satu senyawa signal yang berperan dalam induksi ekspresi gen ketahanan ketika terjadi serangan patogen pada tanaman (Kitajima dan Sato, 1999). Tingginya aktivitas kitinase pada tunas *in vitro* diduga diinduksi oleh akumulasi etilen yang ada dalam botol. Akumulasi etilen pada kultur tunas *in vitro* kemungkinan lebih besar dari kultur kalus, karena biomassa tanaman dalam kultur tunas yang lebih banyak dibanding kultur kalus atau kemungkinan karena perbedaan tingkat diferensiasi sel. Huxter dalam Pierrick (1987) menemukan bahwa pada kalus tembakau, biosintesis etilen meningkat ketika kalus berdiferensiasi membentuk tunas adventif. Hughes dan Dickerson (1991) juga melaporkan adanya peningkatan aktivitas kitinase pada *Phaseolus vulgaris* setelah perlakuan etefon (penghasil etilen).

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut: (i) media K2, K3 dan K4 dapat digunakan untuk menginduksi dan menumbuhkan kalus dari eksplan tunas *in vitro* *T. tricuspidata* dengan pertumbuhan akar yang minimal dari jaringan eksplan, (ii) peningkatan konsentrasi BA dan NAA meningkatkan aktivitas kitinase dan peroksidase pada kalus dan (iii) aktivitas kitinase tertinggi ditemukan pada tunas *in vitro* dan aktivitas peroksidase tertinggi ditemukan pada akar tanaman dari lapang.

UCAPAN TERIMA KASIH

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*. 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

- Barwe, S.P., M.Sathiyabama, C. Jayabaskaran. 2001. Induction of chitinase activity by exogenous cytokinins in excised dark-grown cucumber cotyledones: involvement Ca^{2+} and staurosporine-sensitive protein kinase (s) in cytokinin signalling. *J. Plant Physiol.* 158(1):1-7.
- 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.
- Churiah. 2006. Protein bioaktif dari bagian tanaman dan akar transgenik Cucurbitaceae serta aktivitas antiproliferasi galur sel kanker *in vitro*. (Disertasi) Sekolah Pascasarjana. Institut Pertanian Bogor.
- 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.
- Hodge, A., I.J. Alexander, G.W. Gooday. 1996. Measurement *in situ* of chitinase and -N-acetylglucosaminidase activities in germinating seeds of *Pinus sylvestris* and *Eucalyptus pilularis*. *Plant Physiol. Biochem.* 34: 301-306.
- Hughes, R.K., A.G. Dickerson. 1991. Modulation of elicitor induced chitinase and -1,3-glucanase activity by hormones in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Cell Physiol.* 32(6):853-861.
- 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.
- Kitajima, S., F. Sato. 1999. Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J. Biochem.* 125:1-8.
- Kurosaki, F. N. Tashiro, A. Nishi. 1990. Chitinase induction in carrot cell cultures treated with various fungal components. *Biochem. Int.* 20:99-106.
- Lagrimini, L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap, T-TY Liu. 1997. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol.* 33:887-895.
- 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.
- Pierik, R. L. M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Martinus Nijhoff Publ. Netherlands. 344 p.
- 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, 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, A.P., C. Pinheiro, S. Vidal, I. Chaves, C.P.P. 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, W.J., J.O. De Wilde. 1997. *Trichosanthes* L. (*Cucurbitaceae*) in Java. *Blumea* 42:471-482.
- Saikia, R., R. Kumar, D.K. Arora, D.K. Gogoi, P. Azad. 2006. *Pseudomonas aeruginosa* inducing rice resistance against *Rhizoctonia solani* folia: Production of salicylic acid and peroxidase. *Microbiol.* 51(5):375-380
- 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.

- Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiederman-Merdinoglu, S. Kaufmann, P. Geoffroy M. Legrand and B. Fritig. 1993. Plant "pathogenesis related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75:87-706.
- 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.
- Van Loon, L.C., W.S. Pierpoint, T. Boller, V. Conejero. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12:245-264.
- Van Loon, L.C., E.A. van Strien. 1999. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:85-97.
- Vivanco, J.M., H.E. Flores. 2000. Biosynthesis of ribosome in activating protein from callus and cell suspension cultures of *Mirabilis expansa* (Ruiz & Pavon). *Plant Cell Reports* 19:1033-1039.
- Zheng, S.S., H.Y. Yuan, L.J. Wang, C.C. An, Z.L. Chen. 2001. The tissue culture of medicinal plant *Trichosanthes kirilowii* and its protein analysis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 17 (4):420-422.