

# Aktivitas Enzim Kitinase pada Kacang Tanah yang Sehat dan yang Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*

## *Chitinase Activity in Healthy and Sclerotium rolfsii Infected Peanut*

ENDANG PUJJIHARTATI<sup>‡</sup>, SISWANTO<sup>2</sup>, SATRIYAS ILYAS<sup>1</sup>, SUDARSONO<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departemen Agronomi dan Hortikultura, Faperta, Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga, Bogor 16680

<sup>2</sup>Unit Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jalan Taman Kencana No. 1, Bogor 16151

Diterima 30 Agustus 2005/Disetujui 7 April 2006

The objectives of this experiment were to analyze the endo- or exo-chitinase activities of healthy and *Sclerotium rolfsii* infected peanuts. The experiment analyzed 24 different peanut genotypes. Results of the experiment showed chromogenic dimer was the most suitable substrate for analysing chitinase activities. Both endo- and exo-chitinases activities were detected in leaf, stem, and crown tissues. Increased in chitinase activities were detected in *S. rolfsii* infected peanut tissues than in healthy plant. Regression analysis showed negative slope between disease intensity and chitinase activity in *S. rolfsii* infected peanut tissue ( $R^2 = 0.45$ ).

Key words: Disease response, stem rot disease, endo- and exo-chitinase

### PENDAHULUAN

Tumbuhan memiliki berbagai mekanisme untuk melindungi dari berbagai infeksi patogen tanaman yang berpotensi merusak, antara lain dengan mensintesis berbagai protein yang menghambat perkembangan patogen. Induksi *pathogenesis related protein (PR-protein)* seperti kitinase seringkali terjadi segera setelah invasi patogen (Verburg & Huynh 1991). Kitinase adalah enzim yang umum diproduksi (*ubiquitous*) sel bakteri, cendawan, hewan, dan tumbuhan. Enzim kitinase yang dihasilkan tumbuhan dapat menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 antar subunit N-asetilglukosamina (NAcGlc) pada polimer kitin. Hidrolisis polimer kitin sebagai salah satu komponen dinding sel hifa cendawan dapat menghambat pertumbuhan hifa. Oleh sebab itu, kitinase dikenal sebagai salah satu protein anti cendawan (Wang *et al.* 2005).

Berdasarkan cara kerja hidrolisis, kitinase dikelompokkan menjadi tiga tipe utama (Brurberg *et al.* 1996), yaitu: (i) endo-kitinase, yang memotong secara acak polimer kitin secara internal sehingga menghasilkan oligomer pendek, (ii) ekso-kitinase (1,4- $\beta$ -kitobiosidase), yang memotong unit trimer kitobiosa pada ujung terminal polimer kitin, dan (iii) N-asetilglukosamidase, yang memotong unit monomer pada ujung terminal polimer kitin. Menurut Oku (1994), peranan kitinase pada ketahanan tanaman terhadap serangan patogen terjadi melalui dua cara, yaitu: (i) menghambat pertumbuhan cendawan dengan secara langsung menghidrolisis dinding miselia cendawan dan (ii) melalui pelepasan elisitor endogen oleh aktivitas kitinase yang kemudian memicu reaksi ketahanan sistemik (*systemic acquired resistance/SAR*) pada inang.

<sup>‡</sup>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

*Sclerotium rolfsii* Sacc. merupakan cendawan patogen tular tanah, bersifat nekrotropis, dan menjadi penyebab penyakit busuk pangkal batang/leher akar pada kacang tanah. Patogen *S. rolfsii* umumnya dijumpai pada pertanaman kacang tanah (Hardaningsih 1993; Backman & Breneman 1997). Pada kacang tanah yang peka terhadap serangan *S. rolfsii*, patogen ini menyebabkan penurunan hasil polong hingga 74% (Rani 2001). Hasil pengujian di lingkungan terkontrol menunjukkan 32 genotipe kacang tanah yang diuji tergolong sangat rentan, rentan, atau agak rentan terhadap infeksi *S. rolfsii* (Yusnita & Sudarsono 2004), dan tidak ada yang tergolong tahan atau agak tahan.

Aktivitas kitinase yang secara umum rendah pada jaringan tanaman sehat dapat diinduksi, sehingga meningkat tajam oleh pelukaan atau infeksi cendawan. Kacang tanah memiliki sejumlah gen yang termasuk dalam famili gen penyandi kitinase (Graham & Sticklen 1994). Lebih lanjut, Kellman *et al.* (1996) menyatakan bahwa tanaman kacang tanah memiliki dua gen penyandi kitinase kelas II.

Percobaan ini bertujuan menganalisis aktivitas enzim kitinase pada kacang tanah untuk menentukan substrat kromogenik yang sesuai, dan selanjutnya mengelompokkannya sebagai endo-kitinase dan ekso-kitinase. Tujuan lainnya adalah menganalisis aktivitas enzim tersebut pada jaringan leher akar, batang, dan daun tanaman kacang tanah sehat atau terinfeksi *S. rolfsii*. Dalam percobaan juga dianalisis perbedaan aktivitas enzim kitinase pada jaringan terinfeksi *S. rolfsii* dari 24 genotipe kacang tanah yang tergolong agak rentan, rentan, dan sangat rentan terhadap *S. rolfsii*. Hubungan antara intensitas serangan penyakit dan aktivitas enzim kitinase dalam jaringan pada 24 genotipe tanaman kacang tanah serta peningkatan aktivitas kitinase akibat infeksi *S. rolfsii* juga dievaluasi dengan analisis regresi.

## BAHAN DAN METODE

**Genotipe Kacang Tanah, Penanaman, dan Inokulasi *S. rolf sii*.** Benih kacang tanah diperoleh dari Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik, Bogor. Kacang tanah kultivar Tupai, Kelinci, dan Singa digunakan untuk pembakuan metode analisis aktivitas enzim kitinase. Hubungan antara aktivitas enzim kitinase dan intensitas serangan penyakit akibat infeksi *S. rolf sii* dilakukan pada 11 kultivar dan 13 galur lokal kacang tanah 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 steril yang terdiri atas campuran tanah, kompos, dan arang sekam (2:1:1 v/v).

Inokulasi tanaman kacang tanah menggunakan isolat *S. rolf sii* yang sudah diuji virulensinya (Yusnita & Sudarsono 2004). Inokulasi dilakukan pada tanaman kacang tanah sehat berumur 4 minggu (akhir fase vegetatif). Inokulum yang digunakan berupa potongan agar media PDA padat berukuran 0.5-1.0 cm<sup>2</sup> yang ditumbuhi hifa cendawan *S. rolf sii* berumur 5-6 hari. Inokulum ditempelkan pada daun atau batang primer tanaman kacang tanah yang diuji dan jaringan yang diinokulasi disungkup dengan kantong plastik untuk menjaga kelembapan. Inokulasi pada leher akar dilakukan dengan menempelkan inokulum pada leher akar dan diberi perekat supaya agar tidak terlepas.

**Ekstraksi Enzim Kasar dan Penetapan Kandungan Protein.** Ekstrak enzim kasar dari jaringan daun, batang, dan leher akar kacang tanah sehat diperoleh dari tanaman berumur 30 hari setelah tanam (hst). Pada jaringan yang terinfeksi *S. rolf sii*, enzim kasar diekstraksi setelah muncul gejala infeksi, yaitu dari jaringan daun kacang tanah dipanen 38 jam setelah inokulasi, dan dari jaringan leher akar serta batang kacang tanah pada 96 jam setelah inokulasi. Sementara untuk menganalisis aktivitas kitinase 24 genotipe kacang tanah, enzim kasar diekstraksi dari jaringan batang yang dipanen 72 jam setelah inokulasi.

Ekstrak enzim kasar diperoleh dengan menggerus jaringan leher akar, batang, atau daun kacang tanah dalam larutan penyangga fosfat 50 mM dengan pH 6.0 (perbandingan 1:4 b/v). Konsentrasi protein dari ekstrak enzim kasar diukur dengan metode Bradford (1976) menggunakan *bovine serum albumin* (BSA) sebagai standar.

**Penentuan Substrat Kitinase.** Pengukuran aktivitas hidrolitik kitinase dilakukan sesuai dengan prosedur yang digunakan Mathivanan *et al.* (1998) menggunakan 100 µl ekstrak enzim kasar. Substrat kromogenik (10 µl, 5 mM) yang digunakan, yaitu dimer (p-nitrofenil N-asetil β-D glukosaminida), trimer (p-nitrofenil N,N'-diasetil β-D-kitobiosida), atau tetramer (p-nitrofenil β-D-N,N',N''-triasetilkitotriosa). Setelah inkubasi selama 3 jam, reaksi enzim kitinase dihentikan dengan menambahkan TCA 20%. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer, pada panjang gelombang 405 nm. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai mM pNP yang dibebaskan tiap mg protein tiap jam pada kondisi analisis.

Aktivitas kitinase pada berbagai jaringan tanaman kacang tanah dibandingkan antara ekstrak enzim kasar yang diperoleh

dari jaringan leher akar, jaringan batang, dan daun. Pengukuran aktivitas enzim kitinase pada jaringan leher akar, batang, dan daun dilakukan dengan menggunakan substrat terpilih dari tahapan percobaan sebelumnya. Substrat terpilih selanjutnya juga digunakan untuk mengukur aktivitas kitinase dari jaringan batang 24 genotipe kacang tanah yang sehat atau terinfeksi *S. rolf sii*.

**Penentuan Tipe Enzim Kitinase pada Jaringan Kacang Tanah.** Aktivitas enzim endo-kitinase dan ekso-kitinase, dilakukan dengan analisis sesuai prosedur Dörnenburg dan Knorr (1994) yang dimodifikasi. Sebanyak 234 µl kitin (*chitin from crab shells*, Sigma C 7170) ditambahkan pada 100 µl sediaan enzim kasar. Sampel diinkubasi selama 0 dan 2 jam pada suhu 37 °C. Aktivitas endo-kitinase diukur dengan menambahkan 40 µl sitohelikase (3%) pada campuran contoh, sedangkan untuk mengukur ekso-kitinase, campuran contoh tidak ditambah sitohelikase. N-Asetilglukosamin yang terbentuk oleh aktivitas kitinase diukur dengan cara menambahkan 0.2 ml K<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 0.2M dan 2 ml p-dimetilaminbensaldehid (DABD) 3.3%. Absorbansi dibaca pada panjang gelombang 544 nm setelah terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Pada kurva standar digunakan 0.1-0.75 mM NAcGlc.

**Hubungan antara Intensitas Penyakit dan Aktivitas Kitinase.** Respons terhadap infeksi *S. rolf sii* diamati 10 hari sesudah inokulasi (hsi) untuk jaringan leher akar atau 4 hsi untuk batang dan daun kacang tanah. Gejala penyakit yang muncul pada jaringan kacang tanah diamati dengan menggunakan kriteria skoring yang telah dikembangkan sebelumnya (Yusnita & Sudarsono 2004). Intensitas penyakit (IP) dihitung menggunakan metode yang dikembangkan oleh Townsend dan Heuberger (Yusnita & Sudarsono 2004). Nilai IP selanjutnya digunakan untuk mengelompokkan respons ketahanan 24 genotipe kacang tanah yang diuji terhadap infeksi *S. rolf sii* menggunakan kriteria yang telah dikembangkan oleh Yusnita dan Sudarsono (2004). Analisis regresi dilakukan untuk mengevaluasi hubungan nilai IP dengan aktivitas kitinase serta peningkatan aktivitas kitinase pada jaringan batang tanaman kacang tanah yang terinfeksi *S. rolf sii*.

## HASIL

**Penentuan Substrat Kitinase.** Hasil evaluasi menggunakan tiga jenis substrat kromogenik menunjukkan bahwa substrat dimer paling baik untuk mendeteksi aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh jaringan leher akar kacang tanah (Tabel 1). Hal tersebut dapat dilihat pada jaringan kacang tanah yang sehat atau yang terinfeksi *S. rolf sii*. Pada percobaan selanjutnya, substrat dimer digunakan untuk mengevaluasi aktivitas kitinase kacang tanah.

**Penentuan Tipe Kitinase pada Jaringan Kacang Tanah.** Aktivitas endo- dan ekso-kitinase keduanya terdeteksi pada jaringan leher akar kacang tanah cv. Tupai, Kelinci, dan Singa. Pada kacang tanah cv. Tupai, aktivitas endo- dan ekso-kitinase relatif sama dan mempunyai pola peningkatan yang sama akibat infeksi *S. rolf sii* (Tabel 2). Pada kacang tanah cv. Kelinci

Tabel 1. Aktivitas kitinase ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/jam) pada jaringan leher akar tanaman kacang tanah cv. Tupai, Kelinci, dan Singa yang sehat dan terinfeksi *S. rolf sii* menggunakan substrat dimer ([pNP-GlcNAc]), trimer ([pNP-GlcNAc]<sub>2</sub>), atau tetramer ([pNP-GlcNAc]<sub>3</sub>)

Genotipe dan kondisi jaringan leher akar	Aktivitas kitinase ( $\mu\text{M}$ pNP/mg protein/jam) dengan tiga macam substrat		
	Dimer	Trimer	Tetramer
Tupai: Sehat	1.96	0.46	0.23
Terinfeksi	2.15	0.62	0.28
Rataan	2.06a*	0.54bB	0.26bA
PK (%)**	10	36	20
Kelinci: Sehat	2.05	0.21	0.36
Terinfeksi	2.70	0.35	0.27
Rataan	2.37aA	0.28bB	0.31bA
PK (%)	32	67	-24
Singa: Sehat	1.81	0.80	0.33
Terinfeksi	2.11	1.24	0.36
Rataan	1.96aA	1.02bA	0.34cA
PK (%)	17	54	9

\*Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil atau dalam kolom dengan huruf besar yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada  $\alpha=0.05$ . \*\*PK: persentase peningkatan aktivitas kitinase, dihitung dengan rumus  $PK = [(Kt - Ks) / Ks] \times 100\%$ , Ks: aktivitas kitinase pada jaringan sehat dan Kt: pada jaringan terinfeksi

yang mempunyai aktivitas endo-kitinase dan ekso-kitinase sama pada jaringan leher akar sehat, mengalami peningkatan aktivitas endo-kitinase yang lebih tinggi (135%) akibat infeksi *S. rolf sii* dibandingkan ekso-kitinase (25%) (Tabel 2). Sebaliknya, pada kacang tanah cv. Singa, aktivitas endo-kitinase pada jaringan leher akar yang sehat atau terinfeksi *S. rolf sii* lebih rendah dibandingkan dengan ekso-kitinase. Akan tetapi aktivitas endo-kitinase pada jaringan leher akar kacang tanah cv. Singa yang terinfeksi *S. rolf sii* mengalami peningkatan yang lebih besar (124%) dibandingkan ekso-kitinase (52%) (Tabel 2).

**Aktivitas Kitinase pada Jaringan Kacang Tanah.** Analisis aktivitas kitinase pada jaringan leher akar, batang, dan daun menunjukkan aktivitas kitinase terendah diamati pada daun kacang tanah. Pada kacang tanah cv. Kelinci, aktivitas kitinase pada jaringan leher akar dan batang sehat relatif sama dengan jaringan daun. Dalam kondisi terinfeksi *S. rolf sii*, aktivitas kitinase jaringan leher akar dan batang kacang tanah cv. Kelinci meningkat masing-masing 135 dan 196% dibandingkan jaringan sehat, sedangkan pada jaringan daun hanya meningkat 17% (Tabel 3).

Pola respons yang hampir sama juga diamati pada jaringan kacang tanah cv. Singa (Tabel 3). Pada kacang tanah cv. Singa, aktivitas kitinase pada jaringan leher akar dan batang sehat atau terinfeksi *S. rolf sii* lebih tinggi dibandingkan jaringan daun. Dalam kondisi terinfeksi *S. rolf sii*, aktivitas kitinase jaringan leher akar dan batang kacang tanah cv. Singa meningkat masing-masing 220 dan 131% dibandingkan jaringan sehat sedangkan jaringan daun meningkat 12%.

**Hubungan antara Intensitas Penyakit dan Aktivitas Kitinase.** Respons jaringan batang dan leher akar pada 24 genotipe kacang tanah yang diinokulasi dengan *S. rolf sii* digunakan sebagai dasar untuk menentukan ketahanan genotipe yang diuji terhadap infeksi *S. rolf sii*. Pendugaan ketahanan berdasarkan respons jaringan batang dan leher

akar terhadap infeksi *S. rolf sii* memberikan hasil yang hampir sama (Tabel 4). Kacang tanah cv. Simpai, Panter, Kelinci, dan galur lokal Ciampea yang masing-masing dikelompokkan sebagai rentan berdasarkan data respons leher akar, dikelompokkan sebagai agak rentan (Simpai) atau sangat rentan (Kelinci, Panter, dan lokal Ciampea) berdasarkan respons batang terhadap infeksi *S. rolf sii* (Tabel 4). Genotipe kacang tanah lainnya tergolong ke dalam kelompok yang sama berdasarkan data respons leher akar dan batang terhadap infeksi *S. rolf sii*. Hasil evaluasi 24 genotipe kacang tanah yang dilakukan dalam percobaan ini juga menunjukkan tidak ada genotipe kacang tanah yang resisten terhadap infeksi *S. rolf sii* (Tabel 4).

Pada jaringan batang sehat, aktivitas kitinase pada 24 genotipe kacang tanah yang diuji mempunyai nilai antara 0.06 hingga 0.60 (Tabel 4). Nilai aktivitas tertinggi diamati pada kacang tanah genotipe Kacang Lokal (0.60). Aktivitas kitinase pada jaringan batang semua genotipe kacang tanah yang

Tabel 2. Aktivitas enzim endo-kitinase dan ekso-kitinase ( $\text{mM}$  pNP/mg protein/jam) pada jaringan leher akar tanaman kacang tanah cv. Tupai, Kelinci, dan Singa yang sehat dan terinfeksi *S. rolf sii* menggunakan substrat kitin dari *crab shell* (Sigma C7170)

Genotipe dan kondisi jaringan leher akar	Tipe aktivitas kitinase ( $\text{mM}$ NAcGlc/mg protein/jam)	
	Endo-kitinase	Ekso-kitinase
Tupai: Sehat	2.40aB*	2.75aB
Terinfeksi	3.26aA	3.83aA
PK (%)**	36	39
Kelinci: Sehat	2.14aB	2.40aB
Terinfeksi	5.04aA	2.99bA
PK (%)	135	25
Singa: Sehat	0.85bB	2.80aB
Terinfeksi	1.90bA	4.26aA
PK (%)	124	52

\*Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil atau dalam kolom untuk masing-masing kultivar - dengan huruf besar yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada  $\alpha=0.05$ . \*\*PK: persentase peningkatan aktivitas kitinase, dihitung dengan rumus  $PK = [(Kt - Ks) / Ks] \times 100\%$ , Ks: aktivitas kitinase pada jaringan sehat dan Kt: pada jaringan terinfeksi

Tabel 3. Aktivitas kitinase pada jaringan leher akar, batang, dan daun tanaman kacang tanah cv. Kelinci dan Singa yang sehat dan terinfeksi *S. rolf sii* menggunakan substrat dimer (pNP-GlcNAc)

Genotipe dan kondisi jaringan leher akar	Aktivitas kitinase ( $\mu\text{M}$ pNP/mg protein/jam) pada jaringan:		
	Leher akar	Batang	Daun
Kelinci: Sehat	1.08aB*	0.65bB	0.68bA
Terinfeksi	2.54aA	1.92bA	0.79cA
PK (%)	135	196	17
Singa: Sehat	0.61aB	0.47aB	0.52aA
Terinfeksi	1.96aA	1.09bA	0.58cA
PK (%)	220	131	12

\*Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil atau dalam kolom untuk masing-masing kultivar - dengan huruf besar yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada  $\alpha=0.05$ . \*\*PK: persentase peningkatan aktivitas kitinase, dihitung dengan rumus  $PK = [(Kt - Ks) / Ks] \times 100\%$ , Ks: aktivitas kitinase pada jaringan sehat dan Kt: pada jaringan terinfeksi

Tabel 4. Aktivitas kitinase ( $\mu\text{M}$  pNP/mg protein/jam) pada jaringan batang menggunakan substrat dimer (pNP-GlcNAc) serta pengelompokan ketahanan berdasarkan respons jaringan leher akar dan batang dari 11 kultivar kacang tanah unggul nasional dan 13 genotipe kacang tanah lokal terhadap infeksi cendawan *S. rolf sii*

Genotipe kacang tanah	Aktivitas kitinase		PK (%)**	Respons	
	Sehat	Terinfeksi		LA	BT
Kultivar kacang tanah unggul nasional:					
Simpai	0.23b C-H	1.67a A*	639	r	Ar
Kidang	0.14b H-K	0.95a D-H	604	r	r
Banteng	0.16b G-K	1.14a C-F	626	r	r
Badak	0.21b C-H	1.03a C-G	387	r	r
Zebra	0.26b C-F	1.33a BC	406	r	r
Tupai	0.16b G-K	1.52a AB	873	r	r
Landak	0.10b I-K	1.05a C-F	961	r	r
Panter	0.17b F-J	1.10a C-F	555	r	Sr
Kelinci	0.60a A	1.22a B-E	105	r	Sr
Jerapah	0.08 b JK	0.64a HI	680	Sr	Sr
Singa	0.31 b C	0.69a G-I	126	Sr	Sr
Genotipe kacang tanah lokal (Lk.):					
Lampung	0.23b C-H	0.89a E-H	285	r	r
Podoelo	0.19b D-I	1.25a B-D	556	r	r
Kacang lokal	0.06b K	1.34a BC	2023	r	r
Kacang Rende	0.26b C-F	1.25a B-D	380	r	r
Madura	0.29b CD	1.00a C-G	243	r	r
Sul-Sel I	0.21b C-H	1.03a C-G	386	r	r
Citayam	0.41a B	0.86a F-H	109	r	r
Lanbau	0.10b I-K	0.86a F-H	758	r	r
Suuk putih	0.41a B	1.03a C-G	147	r	r
Gombong B	0.18b E-J	0.87a F-H	386	r	r
Ciampea	0.25b C-G	0.52a I	104	r	Sr
Leuweung Kolot	0.09b I-K	0.20a J	122	Sr	Sr
Wonogiri	0.28b C-E	0.64a HI	129	Sr	Sr

\*Angka rata-rata dalam baris dengan huruf kecil atau dalam kolom dengan huruf besar yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT pada  $\alpha=0.05$ . \*\*PK: persentase peningkatan aktivitas kitinase, dihitung dengan rumus  $PK = [(Kt - Ks) / Ks] \times 100\%$ . Ks: aktivitas kitinase pada jaringan sehat dan Kt: pada jaringan terinfeksi. LA: leher akar, BT: batang, Ar: agak rentan, r: rentan, Sr: sangat rentan

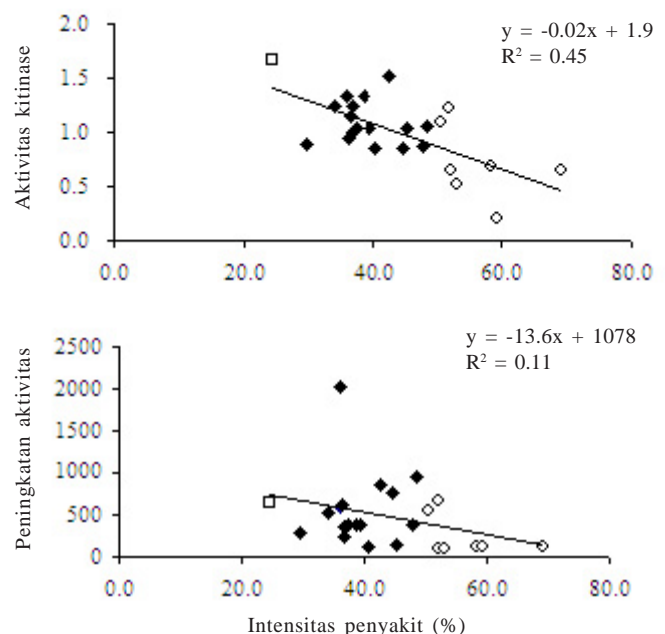
terinfeksi *S. rolf sii* mengalami peningkatan yang berkisar antara 104-2023% dibandingkan jaringan sehat (Tabel 4).

Aktivitas kitinase pada batang kacang tanah cv. Singa, lokal Leuweung Kolot, dan lokal Wonogiri yang tergolong sangat rentan berdasarkan respon leher akar dan batang, serta kacang tanah Kelinci dan lokal Ciampea yang juga tergolong sangat rentan berdasarkan respons batang, hanya meningkat antara 104-129% (Tabel 4). Aktivitas kitinase pada jaringan batang terinfeksi *S. rolf sii* untuk kultivar kacang tanah unggul nasional yang tergolong rentan meningkat dengan kisaran 387-961% (Tabel 4), sedangkan untuk galur kacang tanah lokal meningkat dengan kisaran antara 109% hingga 2023% (Tabel 4).

Regresi antara IP (%) dengan aktivitas enzim kitinase ( $R^2=0.45$ ) pada jaringan batang tanaman kacang tanah yang terinfeksi *S. rolf sii* mempunyai nilai kemiringan negatif. Tidak ada korelasi antara IP (%) dengan aktivitas kitinase pada jaringan batang sehat ( $R^2=0.01$ ) maupun peningkatan aktivitas enzim kitinase ( $R^2=0.11$ ) (Gambar 1).

## PEMBAHASAN

Total protein yang diekstraksi dari jaringan kacang tanah terbukti mempunyai aktivitas kitinase karena mampu memotong kitin dan melepas monomer pNP ketika diuji dengan menggunakan substrat kromogenik dimer, trimer, maupun



Gambar 1. Regresi antara intensitas serangan (IP, %) dengan aktivitas enzim kitinase dan persentase peningkatan aktivitas kitinase pada jaringan batang tanaman kacang tanah akibat infeksi *S. rolf sii*. Genotipe kacang tanah (□) agak rentan, (◆) rentan, dan (○) sangat rentan terhadap infeksi *S. rolf sii*.



tetramer. Hal ini mengindikasikan bahwa pada jaringan kacang tanah disintesis kitinase kelompok glukosaminidase yang memotong unit monomer pada ujung terminal kitin. Hasil identifikasi juga mengindikasikan terdapatnya aktivitas endo- dan ekso-kitinase pada jaringan kacang tanah terinfeksi *S. rolfisii*.

Infeksi *S. rolfisii* pada jaringan leher akar kacang tanah nyata meningkatkan aktivitas kitinolitik dengan substrat dimer, namun demikian peningkatan yang ada tidak dapat mencegah proses infeksi dan kerusakan jaringan akibat infeksi *S. rolfisii*. Terinfeksi jaringan leher akar dan batang, menunjukkan bahwa peningkatan tersebut tidak mampu mencegah proses infeksi. Hal ini diduga karena peningkatan aktivitas kitinase yang terjadi masih cukup rendah untuk dapat menghambat atau mematikan perkembangan hifa *S. rolfisii* yang menyerang.

Kitinase diketahui ikut berperan dalam mekanisme ketahanan terhadap infeksi cendawan karena dapat menghidrolisis ikatan  $\beta$ -1,4 di antara subunit N-asetilglukosamina (NAcGlc) pada polimer kitin (Neuhaus 1999). Enzim kitinase mempunyai peran penting dalam kontrol biologi berbagai cendawan patogen dengan mendegradasi senyawa kitin yang ada pada dinding sel cendawan (El-Katatny *et al.* 2001). Senyawa kitin diketahui merupakan salah satu penyusun dinding sel hifa *S. rolfisii* (Zhang *et al.* 2001). Degradasi senyawa kitin pada ujung hifa *S. rolfisii* diharapkan juga dapat menghambat perkembangan normal hifa dan selanjutnya mengganggu proses infeksi cendawan ini pada tanaman inangnya. Selain itu kitinase juga dilaporkan ikut berperan dalam proses pelepasan elisitor yang mampu memicu reaksi ketahanan sistemik (*systemic acquired resistance/SAR*) pada inang sehingga menghambat perkembangan penyakit (Oku 1994).

Kacang tanah cv. Tupai (rentan), Kelinci (rentan), dan Singa (sangat rentan), mempunyai aktivitas ekso-kitinase dan peningkatan aktivitas ekso-kitinase akibat infeksi *S. rolfisii* yang relatif sama. Sebaliknya, kacang tanah Singa yang sangat rentan mempunyai aktivitas endo-kitinase yang lebih rendah dibandingkan kacang tanah Tupai dan Kelinci yang rentan terhadap infeksi *S. rolfisii*. Meskipun dengan jumlah aktivitas dan pola peningkatan yang berbeda, endo- dan ekso-kitinase dijumpai pada jaringan kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii*.

Dalam penelitian sebelumnya dilaporkan kitinase pada kacang tanah tergolong ke dalam kitinase kelas II (Kellman *et al.* 1996), yang umumnya termasuk tipe ekso-kitinase (Patil *et al.* 2000). Sebaliknya kitinase kelas I sebagian besar termasuk tipe endo-kitinase (Patil *et al.* 2000). Endo-kitinase diketahui efektif berfungsi sebagai anticendawan, terutama bila digabungkan dengan enzim  $\beta$ -1,3 glukukanase. Sebaliknya, kitinase kelas II hanya mempunyai aktivitas anti cendawan jika digabungkan dengan  $\beta$ -1,3 glukukanase (Graham & Sticklen 1994; El-Katatny *et al.* 2000; Chenault *et al.* 2005). Perbedaan efektivitas keduanya dilaporkan ada hubungannya dengan struktur protein penyusun enzimnya (Neuhaus 1999).

Infeksi *S. rolfisii* menginduksi peningkatan aktivitas kitinase pada sebagian besar genotipe kacang tanah yang diuji. Genotipe kacang tanah yang menunjukkan respons agak

rentan atau rentan terhadap infeksi *S. rolfisii* mampu meningkatkan aktivitas kitinase yang lebih tinggi (0.86-1.67  $\mu$ M pNP/mg protein/jam) dibandingkan yang sangat rentan (0.2-0.69  $\mu$ M pNP/mg protein/jam), meskipun sama persentase peningkatan aktivitas kitinasenya (berturut-turut 52-96% dan 52-88%).

Hasil analisis regresi menunjukkan adanya nilai kemiringan (*slope*) yang negatif antara aktivitas kitinase pada jaringan terinfeksi dengan intensitas serangan (IP). Hal ini mengindikasikan adanya peranan kitinase dalam respons ketahanan terhadap infeksi *S. rolfisii* pada jaringan kacang tanah. Namun demikian, aktivitas kitinase yang meningkat akibat infeksi *S. rolfisii* pada 24 genotipe kacang tanah yang dievaluasi belum dapat menghambat perkembangan penyakit. Genotipe kacang tanah yang diuji (24 genotipe) hanya tergolong sebagai agak rentan, rentan, dan sangat rentan, tidak dijumpai genotipe yang tahan maupun agak tahan. Sedangkan nilai korelasi mengindikasikan bahwa aktivitas kitinase absolut lebih menentukan ketahanan kacang tanah terhadap infeksi *S. rolfisii* daripada persentase peningkatan aktivitasnya.

Sejumlah isolat *S. rolfisii* yang telah dipelajari menunjukkan bahwa hifa cendawan ini mempunyai kandungan kitin berkisar antara 12-31% (Zhang *et al.* 2001). Aktivitas kitinase yang dikeluarkan oleh cendawan *Trichoderma harzianum* telah dilaporkan mampu menghidrolisis senyawa kitin pada miselium cendawan *S. rolfisii* dan menghambat perkembangan hifa (El-Katatny *et al.* 2000; El-Katatny *et al.* 2001). Hal ini mengindikasikan peningkatan ketahanan kacang tanah terhadap infeksi *S. rolfisii* kemungkinan dapat dilakukan dengan meningkatkan aktivitas kitinase pada jaringan kacang tanah yang terinfeksi *S. rolfisii* melebihi tingkat aktivitas yang diamati pada penelitian ini. Peningkatan aktivitas kitinase tersebut dapat dilakukan dengan pendekatan rekayasa genetika untuk mengintroduksi dan mengekspresikan gen penyandi kitinase tambahan, juga meregenerasikan tanaman kacang tanah transgenik. Kacang tanah transgenik yang mengekspresikan gen kitinase padi saat ini sedang dalam proses regenerasi. Respons tanaman kacang tanah transgenik yang mengekspresikan kitinase padi terhadap infeksi *S. rolfisii* dapat dievaluasi setelah tanaman transgeniknya berhasil diregenerasikan.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Sebagian penelitian ini dibiayai oleh Hibah Penelitian Tim Pascasarjana (HPTP) angkatan I: berjudul 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, 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.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brurberg MB, Nes IF, Eijsink VGH. 1996. Comparative studies of chitinases A and B from *Serratia marcescens*. *Microbiology* 142:1581-1589.
- Chenault KD, Melouk HA, Payton ME. 2005. Field reaction to Sclerotinia blight among transgenic peanut lines containing antifungal genes. *Crop Sci* 45:511-515.
- Dörnenburg H, Knorr D. 1994. Elicitation of chitinases and anthraquinones in *Morinda citrifolia* cell cultures. *Food Biotech* 8:57-65.
- El-Katatny MH, Gudelj M, Robra KH, Elnaghy MA, Gübitz GM. 2001. Characterization of chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 56:137-143.
- El-Katatny MH, Somitsch W, Robra KH, El-Katatny MS, Gübitz GM. 2000. Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Abst Food Technol Biotechnol* 38:1-21.
- Graham LS, Sticklen MB. 1994. Plant chitinases. *Can J Bot* 72:1057-1083.
- Hardaningsih S. 1993. Penyakit-penyakit yang disebabkan jamur pada kacang tanah dan cara pengendaliannya. Di dalam: Kasno A, Winarto A, Sunardi (ed). *Monograf Balitan Malang*, no.12. Malang: Departemen Pertanian. hlm 171-191.
- Kellman JW, Kleinow T, Engelhardt K, Phillip C. 1996. Characterization of two class II chitinase genes from peanut and expression studies in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 30:351-358.
- Mathivanan N, Kabilan V, Murugesan K. 1998. Purification, characterization, and antifungal activity of chitinase from *Fusarium chlamydosporum*, a mycoparasite to groundnut rust, *Puccinia arachidis*. *Can J Microbiol* 44:646-651.
- Neuhaus JM. 1999. Plant Chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). Di dalam: Datta SK, Muthukrishnan S (ed). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. London: CRC Pr. hlm 77-105.
- Oku H. 1994. *Plant Pathogenesis and Disease Control*. London: Lewis Publ.
- Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV. 2000. Chitinolytic on enzyme: an exploration enzyme and microbial technology. *Enzyme Microb Tech* 26:473-483.
- Rani I. 2001. Tingkat ketahanan beberapa varietas kacang tanah terhadap *Sclerotium rolfsii* Sacc [Skripsi]. Bogor: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Verburg JG, Huynh QK. 1991. Purification and characterization of an antifungal chitinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 95:450-455.
- Wang S, Wu J, Rao P, Ng TB, Ye X. 2005. A chitinase with antifungal activity from the mung bean. *Protein Expr Purif* 40:230-236.
- Yusnita, Sudarsono. 2004. Metode inokulasi dan reaksi ketahanan 30 genotipe kacang tanah terhadap penyakit busuk batang *Sclerotium*. *Hayati* 11:53-58.
- Zhang M, Melouk HA, Chenault K, El Rassi Z. 2001. Determination of cellular carbohydrates in peanut fungal pathogens and baker's Yeast by capillary electrophoresis and electrochromatography. *J Agric Food Chem* 49:5265-5269.