

## AKTIVITAS ENZIM PEROKSIDASE DAN POLIFENOLOKSIDASE PADA BEBERAPA VARIETAS KEDELAI (*Glycine max* (L.) Merrill) YANG TERSERANG PENYAKIT KARAT

Harmida dan Juswardi  
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya

### ABSTRAK

*Penelitian tentang Aktivitas enzim peroksidase (PO) dan polifenoloksidase (PFO) pada beberapa varietas kedelai (Glycine max (L.) Merrill) telah dilakukan dari bulan Juli sampai Desember 2000 bertempat di laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sriwijaya. Rancangan yang digunakan adalah rancangan acak kelompok dengan 4 perlakuan dan 5 ulangan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat perbedaan aktivitas PO dan PFO antara tanaman kedelai baik yang terserang maupun tidak terserang penyakit karat. Pada tanaman yang terserang penyakit karat terjadi peningkatan aktivitas PO dan PFO. Untuk mengetahui sifat resistensi tanaman kedelai terhadap penyakit karat (Phakopsora pachyrizi Syd) dapat dievaluasi melalui aktivitas PO dan PFO.*

### ABSTRACT

*Peroxidase and polyphenoloxidase activities in some varieties of soybean (Glycine max (L.) Merrill) infected with rush disease. Investigation about peroxidase (PO) and polyphenoloxidase (PPO) in some varieties of soybean infected with rush disease (Phakopsora pachyrizi Syd.) has done in July to December 2000 at Microbiology and Biotechnology laboratory, Department of Biology Faculty Mathematics and Natural Sciences University of Sriwijaya. The experiment design used randomised block design with 4 treatments and 5 replications. The result of experiment show that PO and PPO activities are differ with soybean infected and non infected of rush disease. Soybean infected rush disease are increasing PO and PPO. The activity of PO and PPO enzymes will be know to evaluated resistance soybean to rush disease (Phakopsora pachyrizi Syd).*

### PENDAHULUAN

**K**edelai (*Glycine max* (L.) Merrill) merupakan salah satu jenis kacang-kacangan yang cukup penting di Indonesia,

baik sebagai bahan makanan maupun sebagai bahan baku industri. Sebagai bahan makanan, kedelai mempunyai nilai gizi yang cukup tinggi dengan kandungan protein nabati 40-45%,

lemak 18,1% dan karbohidrat 44,8% (Anonymous, 1985).

Berdasarkan luas lahan panen di Indonesia, kedelai menempati urutan ke-4 sebagai tanaman palawija, setelah jagung dan ubi kayu. Rata-rata luas pertanaman kedelai pertahun adalah 1.665.706 ha dengan total produksi 1.869.714 ton (Biro Pusat Statistik, 1997). Walaupun demikian, dari tahun ke tahun konsumsi kedelai ini semakin meningkat, sehingga harus dilakukan berbagai upaya untuk mempertinggi produksinya disamping impor dari luar negeri. Faktor-faktor yang sering menyebabkan rendahnya produksi kedelai di Indonesia adalah faktor kekeringan, banjir, serangan hama dan penyakit, serta persaingan dengan gulma.

Menurut Wrather et al (1997) salah satu kendala dalam peningkatan produksi kedelai di negara-negara penghasil kedelai adalah penyakit yang menyerang tanaman tersebut, seperti penyakit karat, penyakit bercak daun yang disebabkan oleh bakteri *Xanthomonas phaseoli*, penyakit busuk batang yang disebabkan oleh cendawan *Phythium* sp dan penyakit mozaik oleh virus (Suprpto, 1991).

Di Indonesia dilaporkan bahwa, penyakit karat pada tanaman kedelai

disebabkan oleh jamur karat (*Phakopsora pachyrhizi*) (Sinclair & Backman, 1994). Serangan jamur ini pada tanaman dapat menurunkan produksi dalam jumlah besar, karena tidak berisinya polong akibat terganggunya fotosintesis pada daun (Suprpto, 1991).

Salah satu upaya untuk menghindari serangan penyakit karat ini adalah dengan menanam varietas-varietas kedelai yang (resisten) tahan terhadap penyakit karat. Di Indonesia pada saat ini telah disebarakan kepada para petani berbagai varietas kedelai dengan tingkat ketahanan yang berbeda terhadap penyakit karat, seperti Orba, Wilis, Ringgit, Guntur, Lokon, Davros, dan sebagainya (Suprpto,1991).

Tanaman yang resisten terhadap penyakit akan melakukan perubahan metabolisme bila terserang penyakit. Perubahan metabolisme tersebut dapat diamati melalui aktivitas enzim yang terlibat pada berbagai jalur reaksi. Perubahan aktivitas enzim spesifik terjadi bila ada interaksi antara inang dengan toksin (Tamari et al., 1965). Athur dan Schipper (1974) menjelaskan, pada tanaman *Populus* spp terjadi peningkatan aktivitas peroksidase karena adanya invasi toksin oleh *Hypoxyton mammatum*. Dan Tamari et al. (1965) juga melaporkan adanya perubahan

aktivitas peroksidase dan polifenoloksidase pada padi (beberapa sub-spesies *japonica* dan *indica*) akibat aksi toksin asam alfa pikolinat. Dan dari inokulasi TNV (tobacco necrosis virus) pada dua daun terbawah tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum*) dapat menginduksi resisten sistemik terhadap penyakit "late blight" yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora infestans*, dan adanya peningkatan aktivitas enzim peroksidase dan beta 1,4 glukonase pada daun yang diprainokulasi dengan TNV tersebut (Buchenauer, 1997).

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengevaluasi aktivitas enzim peroksidase dan polifenoloksidase pada beberapa varietas kedelai yang berbeda ketahanannya terhadap penyakit karat. Sehingga dapat diketahuinya hubungan resistensi tanaman kedelai yang telah direkomendasikan dengan aktivitas enzim peroksidase dan polifenoloksidase.

## **METODA PENELITIAN**

### **Waktu dan Tempat**

Penelitian dilakukan dari bulan Juli sampai Desember 2000 bertempat di kebun Botani, Lab. Botani dan Lab. Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA UNSRI Indralaya.

### **Bahan Dan Alat**

Kedelai yang digunakan dalam penelitian ini adalah varietas Orba, Ringgi dan Wilis yang didapatkan dari Balai Penelitian dan pengembangan (Balitbang) Tanaman Pangan Sukarami, Padang, tanah kebun, pupuk Urea, KCl, dan TSP, HCl 0,0625 M, Triton-X100, reagen Biuret, pirogalol 10 mM, akuades, alkohol 96%, protein standar albumin.

Alat-alat yang digunakan adalah spektrofotometer 20-D, sentrifuge, tabung eppendorf, kapas, mikro pipet, kuvet, gelas ukur, pipet tetes, timbangan, mortar, syring, mikro syring, erlenmeyer, beker glass, kertas label.

### **Metoda Penelitian**

Metoda yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok dengan 4 perlakuan dan 7 ulangan.

### **Cara Kerja**

Pelaksanaan penelitian ini terdiri dari :

#### **1. Penyediaan Sumber Tanaman**

Tanaman kedelai yang digunakan adalah tanaman kedelai yang ditanam didalam polybag dengan menggunakan tanah kebun dan diberi pemupukan sesuai dengan rekomendasi untuk tanaman kedelai. Sebelum dan setelah

tanaman memperlihatkan gejala serangan penyakit karat (pada saat munculnya bunga). maka daun kedele diambil untuk dievaluasi aktivitas enzim PO dan PPO, kadar protein.

## 2. Ekstraksi Enzim Dari Daun

Ekstraksi enzim dari daun dilakukan menurut metode Widiyanto (1992 dalam Juswardi, 1996 yang dimodifikasi). Sebanyak 200 mg daun digerus dan dihomogenasi dalam 2,0 ml 0,0625 M dapar Tris -HCl pH 8,0 dan 0,15% Triton-X100 pada suhu 0°C. Homogenat yang didapatkan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 12,500 g pada suhu 0°C selama 20 menit. Supernatan yang didapatkan dimasukkan kedalam tabung Eppendorf dan disimpan pada suhu 0-4°C untuk tahap kerja berikutnya.

## 3. Penentuan kadar protein total

Penentuan kadar protein total dilakukan untuk mengetahui berapa volume supernatan yang akan digunakan dalam menguji aktivitas enzim. Penentuan kadar protein total dilakukan dengan menggunakan reagent Biuret dari Biosystem yang dimodifikasi. Absorban protein standar (Ast) ditentukan dengan

menggunakan campuran 1000 µl reagen biuret, 2000 µl akuades dan 2000 µl protein standar (BSA) yang diukur pada panjang gelombang yang diukur pada panjang gelombang 545 nm. Protein sampel diukur dengan menggunakan 200 µl sampel dicampur 1000 µl reagen biuret dan 4800 µl akuades. Selanjutnya absorbansi sampel (As) diukur pada panjang gelombang 545 nm.

Protein total dihitung dengan rumus :

$$\frac{As}{Ast} \times 500 \text{ µg/ml protein}$$

## 4. Penentuan aktivitas enzim peroksidase

Penentuan aktivitas PO dilakukan berdasarkan metoda Kar dan Misra (1976 dalam Juswardi, 1996). Aktivitas PO diuji menggunakan campuran pereaksi 10 mM

pirogalol, 0,0025 mM dapar fosfat pada pH 6,8. Kedalam 5 ml campuran pereaksi ditambahkan 10 mM peroksida ( $H_2O_2$ ) sebelum 20  $\mu$ l protein pada suhu 25°C. Hasil oksidasi pirogalol (purpurogalin) diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Aktivitas enzim peroksidase dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

Aktivitas PO =

$$\frac{\text{Absorbansipada waktutertentu}}{\text{Konsentrasiproteinekstrak}}$$

#### 5. Penentuan aktivitas polifenoloksidase

Penentuan aktivitas PPO ditentukan berdasarkan metoda Kar dan Misra (1976) Yang dimodifikasi oleh Widiyanto dalam Juswardi (1996). Penentuan aktivitas PPO dengan cara menggunakan campuran pereaksi 10 mM pirogalol, 0,0025 mM dapar fosfat pada pH 6,8. Kedalam campuran pereaksi ditambahkan 50 $\mu$ g protein. Hasil oksidasi pirogalol diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm. Aktivitas PPO diukur dengan menggunakan rumus :

= Absorbansi/konsentrasi protein/menit.

#### Parameter Pengamatan

Data yang diamati pada penelitian ini adalah :

1. Kadar protein total
2. Aktivitas enzim peroksidase (PO)
3. Aktivitas enzim polifenoloksidase (PPO)

#### Analisis Data

Data-data yang didapatkan dianalisis varians. Jika terdapat perbedaan sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji lanjut perbandingan berganda Duncans dengan  $\alpha$  0,05 (Gomez and Gomez, 1995).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian tentang aktivitas enzim peroksidase (PO) dan polifenoloksidase (PFO) pada beberapa varietas tanaman kedelai yang terserang penyakit karat didapat hasil sebagai berikut :

#### Aktivitas Peroksidase (PO)

Aktivitas enzim peroksidase yang diuji pada tanaman kedelai yang terinfeksi dan tidak terinfeksi penyakit karat untuk dua varietas tanaman kedelai dengan tingkat resistensi yang berbeda didapat hasil seperti tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Aktivitas enzim peroksidase (PO) pada tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) yang terinfeksi dan tidak terinfeksi penyakit karat

Perlakuan	Aktivitas PO (U/mg protein/menit)
Varietas resisten tidak iinfeksi	0,1074 b
Varietas resisten iinfeksi	0,1568 d
Varietas agak tahan idak diinfeksi	0,0838 a
Varietas agak tahan iinfeksi	0,1454 c

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada uji lanjut Duncans  $\alpha$  5%.

Tabel 2. aktivitas PO dari tanaman kedelai varietas yang resisten dan agak tahan menunjukkan perbedaan yang nyata baik saat terinfeksi maupun tidak terinfeksi oleh jamur *Phakopsora pachyrizi*. Hal ini menunjukkan bahwa secara genetik sifat tanaman ini sudah berbeda dalam mengekspresikan aktivitas enzim PO. Menurut Cakmak (1986) bahwa aktivitas PO dapat berbeda dari satu spesies, varietas atau genotip yang berbeda. Perbedaan ekspresi PO ini juga dapat digunakan untuk petunjuk berbagai indikator fisiologi, molekuler dari berbagai pengaruh lingkungan.

Aktivitas PO pada varietas yang resisten lebih besar dibandingkan dengan varietas agak tahan. Lebih besarnya aktivitas PO pada varietas yang resisten merupakan suatu mekanisme tanaman tersebut untuk merespons jika adanya cekaman lingkungan termasuk infeksi penyakit. Hal ini sesuai yang dijelaskan Ito *et al.* (1991) bahwa enzim Po mempunyai banyak fungsi diantara berperan dalam biosintesis dinding sekunder (lignifikasi), dalam penyembuhan luka, metabolisme hormon, diferensiasi sel dan resistensi terhadap infeksi.

Jika dibandingkan tanaman yang tidak terinfeksi dengan yang terinfeksi penyakit karat ini terlihat terjadi peningkatan aktivitas PO yang sangat berbeda. Dimana aktivitas PO yang terbesar didapatkan pada varietas yang resisten terinfeksi dan diikuti oleh varietas agak tahan juga menunjukkan perbedaan yang nyata dengan tanaman yang tidak terinfeksi. Peroksidase pada tanaman dalam mekanisme pertahanan terhadap infeksi adalah mencegah pertumbuhan hifa jamur pada tanaman ini. Peroksidase akan mengkatalisis senyawa fenol dan hidrogen peroksida menjadi senyawa quinon dan molekul air. Senyawa quinon ini merupakan hasil perantara yang bersifat toksik bagi jamur. Disekitar jaringan yang terinfeksi

terjadinya pencoklatan, yang juga merupakan cara untuk mencegah pertumbuhan hifa.

### Aktivitas Polifenoloksidase (PFO)

Aktivitas enzim polifenoloksidase yang diuji pada tanaman kedelai yang terinfeksi dan tidak terinfeksi penyakit karat untuk dua varietas tanaman kedelai dengan tingkat resistensi yang berbeda didapat hasil seperti tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas enzim polifenoloksidase (PFO) pada tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) yang terinfeksi dan tidak terinfeksi penyakit karat

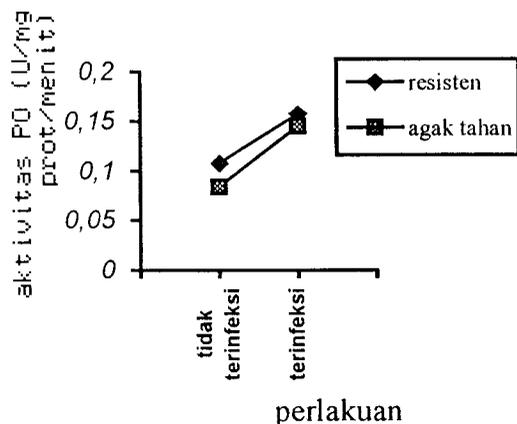
Perlakuan	Aktivitas PFO (U/mg protein/menit)
Varietas resisten tidak diinfeksi	0,1842 a
Varietas resisten diinfeksi	0,2154 c
Varietas agak tahan tidak diinfeksi	0,1970 b
Varietas agak tahan diinfeksi	0,2426 d

Keterangan : Angka-angka yang diikuti oleh huruf kecil yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata pada uji lanjut Duncans  $\alpha$  5%.

Tabel 2., aktivitas enzim PFO menunjukkan perbedaan yang nyata antara tanaman yang terserang dengan yang tidak

terserang penyakit karat baik pada tanaman kedelai varietas resisten maupun agak tahan. Perbedaan ini memperlihatkan bahwa enzim PFO ini merupakan enzim yang berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman terhadap penyakit. Hal ini sesuai dengan yang jelaskan Rathjen & Robinson (1992). Aktivitas PFO sering kali berhubungan dengan resistensi tanaman terhadap penyakit. Lebih lanjut dijelaskan (Callow, 1983) akativitas PFO akan meningkat pada tumbuhan yang terinfeksi patogen.

Dari Gambar 1. dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan aktivitas PO antara varietas kedelai tahan dengan agak tahan terhadap penyakit karat, tetapi kedua varietas tersebut tetap memperlihatkan pola yang sama. Pola perubahan aktivitas PO terlihat adanya peningkatan aktivitas dari tanaman kedelai yang tidak terinfeksi ke tanaman yang terinfeksi pada sifat yang sama. Hal ini disebabkan kedua varietas tanaman yang dievaluasi adalah tanaman yang mempunyai sifat yang dekat yaitu resisten dan agak tahan. Pola yang berbeda mungkin akan terlihat jika tanaman yang dievaluasi varietas peka atau sangat peka.



Gambar 1. Perubahan aktivitas enzim peroksidase (PO) tanaman kedelai (*Glycine max* (L.) Merrill) dari yang tidak terinfeksi ke terinfeksi jamur karat (*Phakopsora pachyrizi* Syd.)

Menurut van Loon (1986) bahwa resistensi tanaman terhadap toksin berhubungan dengan peningkatan aktivitas PO dalam jaringan. Kenaikan aktivitas PO yang cepat merupakan bagian pertahanan tanaman untuk mengatasi penyebaran patogen. Lebih lanjut van Lelyveld & van Vuuren (1988 dalam Roosina dkk., 1997) hasil oksidasi PO merupakan racun bagi sel yang secara cepat dapat membatasi patogen. Peroksidase dengan fenol tertentu dapat bersifat bakterisidal karena terbentuknya quinon. Quinon terakumulasi dengan cepat menjadi konsentrasi yang beracun melalui

perantara PO. Sebagai perantara akumulasi quinon, PO mereduksi percepatan pembesaran luka.

Pola perubahan yang sama terlihat juga pada enzim PFO, karena kedua enzim ini disamping katalase (Cat) merupakan enzim yang umum digunakan untuk melihat pengaruh cekaman lingkungan dan infeksi patogen. Menurut (de Man, 1997) bahwa PFO merupakan enzim yang terlibat di dalam pencoklatan tanaman. Polifenoloksidase mampu mengoksidasi fenol menjadi o-quinon.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian tentang aktivitas enzim peroksidase dan polifenoloksidase pada beberapa varietas kedelai yang terserang penyakit karat dapat diambil simpulan dan saran sebagai berikut :

### Kesimpulan

1. Terdapat perbedaan aktivitas PO dan PFO antara tanaman kedelai yang tidak terserang dengan yang terserang penyakit karat.
2. Aktivitas PO dan PFO pada tanaman yang terserang penyakit karat lebih tinggi dibandingkan tanaman yang tidak terserang.

3. Varietas kedelai yang resisten mempunyai aktivitas PO dan PFO yang lebih tinggi dibandingkan varietas agak tahan baik yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi jamur karat.
4. Aktivitas PO dan PFO dapat digunakan untuk evaluasi tanaman kedelai yang terinfeksi jamur karat (*Phakopsora pachyrizi* Syd.).

#### Saran

Perlu dilakukan pengujian aktivitas PO dan PFO pada beberapa intensitas serangan untuk mengetahui tingkat resistensi tanaman kedelai terhadap penyakit karat ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous, 1985. *Kedelai tanaman pangan penuh gizi*. Dep. Pertanian. Balai Informasi Pertanian Kalimantan Barat.
- Arthur, L. & Jr. Schipper. 1974. Changes in dehydrogenase and peroxidase activities of Aspen infected with *Hypoxylon mammatum*. *Phytopathology*. 65.
- Carlie, M.J. & S.C. Watkinson 1995. *The Fungi*. Acad Pres. London.
- Cummin, G.B & Y. Hirose. Illustrated genera of rust fungi. *The Am. Phyto. Soc.* St Paul, Minnesota.
- Gomez, A.K. & A.A. Gomez. 1995. *Prosedur statistik untuk penelitian pertanian*. UI Press. Jakarta.
- Ito, H., N. Hiraoka, A. Ohbayashi & Y. Ohashi. 1991. Purification and characterization of rice peroxidases. *Agric. Biol. Chem.* 55.
- Juswardi, 1996. Aktivitas enzim peroksidase kalus padi (*Oryza sativa* L.) kultivar Sei Lilin varian adaptasi cekaman aluminium. *Jur. Bio FMIPA. UNSRI*.
- Keog, R. 1974. *Phakopsora pachyrizi* Syd. The causal agent of soybean rust. *Aust. Plant Path. Soc. Newsltr.*
- Littlefield, L.J. 1981. *Biology of the plant rust*. Iowa State University. Ames.
- Rathjen, A.H. & S.P. robinson. 1992. Aberrant processing of poliphenooxidase in varigated grapevine mutan. *Plant Physiol.* 99.
- Sinclair, J.B. & P.A. Backman. 1994. *Compendium of Soybean Diseases*. 4 th. Edition. APS Press.
- Suprpto, H.S. 1991. *Bertanam Kedelai*. Penebar Swadaya., Jakarta.
- Takahana, U. & T. Oniki. 1991. Participation of peroxidase in the metabolism of 4,4-dihydroxy phenylalanin and hydrogen peroxide in vacuoles of *Vicia faba* mesophyll Cells. *Plant Cell Physiol.* 42.

- Tamari, K., N. Ogasawara & J. Kaji. 1965.  
Biochemical product of the  
metabolism of *Pyricularia oryzae*.  
Dalam The rice blas diseases. *Proc.*  
*Symp. IRRI.*
- Yang, C.j. 1977. Soybean rust in the eastern  
hermisphere. Soybean rust workshop  
and Seminar. Manila.