

PRODUKSI ENSIM KARBOKSI METIL SELULASE DAN EKSO-POLIGALAKTURONASE SERTA PERANANNYA DALAM MENENTUKAN TINGKAT PATOGENISITAS ISOLAT *Ralstonia solanacearum* ASAL JAHE

KARDEN MULYA¹, HENI RAHMANIA², SUPRIADI¹ dan ESTHER M. ADHI¹

¹ Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat

² Mahasiswa Fakultas MIPA, Institut Teknologi Bandung

RINGKASAN

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan penyakit paling merusak pada jahe (*Zingiber officinale* Roscoe). Jaringan tanaman yang terinfeksi patogen memperlihatkan gejala busuk, berarti telah terdegradasi oleh cairan enzim yang dihasilkan patogen. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis produksi enzim karboksimetil selulase (CMC-ase) dan ekso-poligalakturonase (ekso-PG) dari patogen ini. Secara *in vitro* produksi CMC-ase diukur dari diameter daerah transparan pada media CMC sedangkan produksi ekso-PG diukur berdasarkan reduksi Na-poligalakturonase oleh patogen. Virulensi isolat bakteri diuji pada tanaman tomat kultivar Gondol dengan menyiramkan 50 ml suspensi bakteri (10^7 cfu/ml) sekitar akar tanaman dan pada jahe kultivar jahe putih besar dengan cara pelukaan rimpang dan pangkal batang semu tanaman yang telah ditetesi bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat virulen dari *R. solanacearum* asal jahe memproduksi enzim CMC-ase dan ekso-PG masing-masing 2.23 cm diameter daerah bening dan 0.662 mg eq. Glucose/ml/jam/OD₆₀₀. Isolat avirulen dari *R. solanacearum* menghasilkan enzim lebih rendah yaitu 0.83 cm diameter bening dan 0.512 eq. glukosa/ ml/jam/OD₆₀₀ berturut-turut untuk CMC-ase dan ekso-PG. Tingkat produksi kedua enzim tersebut berkorelasi positif dengan intensitas penyakit layu yang disebabkan isolat tersebut. Intensitas penyakit dari isolat virulen adalah 0.6 dan 0.96 dari maksimum 1 berturut-turut pada tomat dan jahe, berbanding 0.04 dan 0.00 pada tanaman yang sama untuk isolat avirulen. Hal ini menunjukkan bahwa enzim ekso-PG dan CMC-ase memegang peranan penting dalam menentukan tingkat patogenisitas *R. solanacearum*.

Kata kunci : *Zingiber officinale*, *Ralstonia solanacearum*, karboksimetil selulase ekso-poligalakturonase, virulensi

ABSTRACT

Carboxy methyl cellulase and exo-polygalacturonase enzymes production and their role in determining the pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* isolated from ginger

Bacterial wilt disease on ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) caused by *Ralstonia solanacearum* is the most destructive disease. Infected tissues show macerated symptom on infected hosts indicating that the pathogen produces plant digestive enzymes. This research was aimed at analyzing carboxymethylcellulase (CMC-ase) and exopolysaccharuronase (exo-PG) enzymes production by the pathogen. *In vitro* production of CMC-ase of both virulent and avirulent isolates of *R. solanacearum* was measured from diameter of clearing zone around bacterial colony on CMC medium whereas exo-PG was measured by the reduction of Na-polygalacturonate by filtrate of the pathogen culture. Virulence of the pathogen was tested on tomato cultivar Gondol Hijau by pouring 50 ml of pathogen suspension (10^7 cfu/ml) around roots of the plant and it was also tested on ginger cultivar Jahe Putih Besar by pricking suspension of pathogen into rhizome and basal pseudostem of the plant. The results showed that CMC-ase and PG-ase were produced by virulent isolates of *R. solanacearum* at 2.23 cm clear zone and 0.662 mg eq. glucose/ml/hour/OD₆₀₀, respectively. The avirulent isolates, however,

produced lower activity (0.83 cm and 0.512 eq. glucose/ml/hour/OD₆₀₀ of CMC-ase and exo-PG, respectively). Enzymes activities were positively correlated with disease intensity of the isolates. Disease intensity of the virulent isolates was 0.6 and 0.96 on tomato and on ginger plants respectively, whereas the avirulent isolates was 0.04 and 0.00 respectively. Therefore, CMC-ase and exo-PG are important in determining pathogenicity level of *R. solanacearum*.

Key words : *Zingiber officinale*, *Ralstonia solanacearum*, carboxymethylcellulase, exo-polygalacturonase, virulence

PENDAHULUAN

Penyakit layu bakteri merupakan kendala utama dalam budidaya jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) di Indonesia. Penyakit ini disebabkan oleh *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. Patogen tidak saja menginfeksi tanaman jahe, tetapi juga tanaman lain seperti tomat, cabe, dan terong (MULYA *et al.*, 1989; SUPRIADI *et al.*, 1995). Pada tanaman jahe, infeksi patogen menyebabkan rimpang busuk dan batang semu mudah lepas dari pangkalnya. Patogen dapat terbawa benih (rimpang) sehingga mudah tersebar ke daerah lain yang sangat jauh. Kerugian yang disebabkan penyakit ini tidak saja berupa produksi jahe turun drastis atau panen gagal, tetapi juga dapat menyebabkan lahan tercemar patogen sehingga lahan tidak layak ditanami oleh inang yang sama atau harus diselingi tanaman lain bukan inang selama periode tertentu.

Menurut HOLOWAY *et al.* (1994) ada tiga faktor yang mempengaruhi virulensi *R. solanacearum*, yaitu senyawa ekso-polisakarida (EPS), enzim pemecah jaringan tanaman yang meskipun bukan merupakan faktor utama dalam menentukan virulensi tetapi diduga menentukan tingkat patogenisitas, dan gen *hrp* dalam pembentuk gejala pada tanaman inang dan menginduksi hipersensitivitas pada tanaman non inang. Menurut SEQUEIRA (1992) enzim pemecah jaringan tanaman diduga berperan pada proses awal infeksi yaitu saat patogen harus memecah lapisan pelindung (*mucilage*) yang melapisi permukaan akar tanaman yang terdiri atas senyawa pektin. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *R. solanacearum* dapat memproduksi beberapa macam enzim pemecah jaringan tanaman seperti selulase dan pektinase (SCHELL *et al.*, 1988; ROBERTS *et al.*, 1988). Menurut ALLEN *et al.* (1991) enzim ekso-PG diduga berperan lebih aktif dari pada endo-PG

dalam menentukan tingkat patogenisitas. Enzim pemecah selulosa juga diduga berperan dalam menentukan virulensi *Pseudomonas syzygii*, *R. solanacearum* dan *blood disease bacteria* (SUPRIADI *et al.*, 2000).

Penelitian ini bertujuan untuk mengukur produksi enzim ekso-poligalakturonase dan enzim karboksimetil selulase serta kaitannya dengan tingkat patogenisitas dari isolat-isolat *R. solanacearum* asal tanaman jahe.

BAHAN DAN METODE

Strain Bakteri

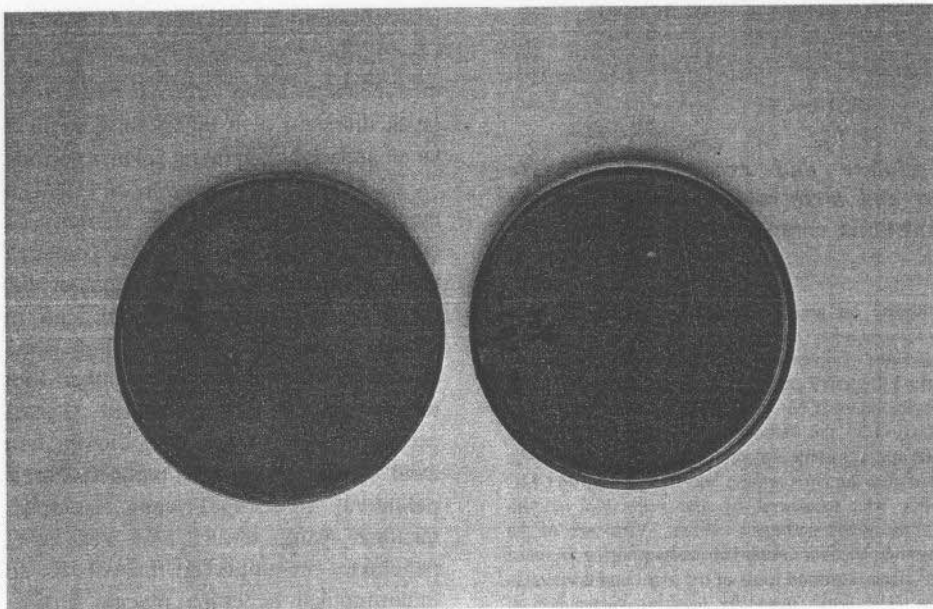
Isolat *R. solanacearum* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Koleksi Kultur Bakteri, Laboratorium Penyakit Tanaman, Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Isolat T447, T585 dan T872 diisolasi dari tanaman jahe putih besar. Ketiga isolat ini bersifat virulen berdasarkan bentuk koloninya yang fluidal-putih, sedangkan isolat T872-AV dan T585AV merupakan mutan spontan avirulen dan koloni non-fluidal, dan isolat T592 merupakan mutan avirulen hasil induksi isolat T447 dengan acridine orange, koloni fluidal (SUPRIADI *et al.*, 2000). Isolat bakteri disimpan dalam bentuk kering beku (*freeze drying*) dan suspensi dalam air steril. Isolat-isolat dikulturkan pada media sukrosa-pepton agar (SPA; HAYWARD, 1964) atau triphenyl tetrazolium chloride (TTC; KELMAN, 1954).

Pengukuran Enzim Karboksimetil Selulase

Kultur bakteri yang berumur tiga hari diinokulasi pada media karboksimetil selulosa (CMC; CORNEL and JONSON, 1986) kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 5 hari. Selanjutnya permukaan media digenangi dengan larutan merah kongo (1 mg/ml) dan dibiarkan selama 15 menit. Setelah larutan merah kongo dibuang, permukaan medium digenangi dengan larutan 1 M NaCl selama 15 menit. Adanya zona bening di sekitar koloni bakteri (Gambar 1) menunjukkan bahwa CMC telah diurai oleh enzim CMC-ase yang dihasilkan oleh bakteri. Lebar zona tersebut diukur sebagai parameter untuk membedakan banyaknya produksi enzim oleh isolat-isolat bakteri.

Deteksi Enzim Ekso-poligalakturonase

Enzim ekso-poligalakturonase diukur berdasarkan kemampuan filtrat kultur bakteri untuk mengurai garam natrium-poligalakturonat. Sebanyak 5 ml suspensi bakteri (10^7 sel/ml) diinokulasikan ke dalam 50 ml media cair M9 (MANIATIS *et al.*, 1982) dalam labu erlenmeyer berukuran 250 ml dan diinkubasi pada *rotary shaker* selama 24 jam. Sebanyak 500 μ l kultur diambil dan diinokulasikan ke dalam media M9. Sumber karbon yang digunakan disetarakan dengan 1% glukosa. Sel dipisahkan dari supernatan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 4 000 rpm selama 30 menit diikuti dengan penyaringan dengan membran selulosa steril (diameter pori 0.45 μ m).



Gambar 1. Zona bening di sekeliling kultur isolat virulen dari *Ralstonia solanacearum* (kanan) menunjukkan degradasi sodium karboksimetil selulosa oleh bakteri

Figure 1. Clear zone surrounding culture of the virulent isolate of *Ralstonia solanacearum* (right) indicating the degradation of sodium carboxymethyl cellulose by enzyme produced by the bacterium

Enzim yang ada dalam filtrat diukur berdasarkan nilai kesetaraan gula tereduksi dari garam natrium poligalakturonat setelah diinkubasi dengan filtrat. Substrat terdiri atas 0,5 ml larutan buffer Tris. HCl (pH 8.5) dan 0.05 ml CaCl_2 pada setiap campuran substrat ditambah 0.5 ml filtrat dan 0.95 ml Na-poligalakturonat 1%, kemudian diinkubasi pada suhu 50°C. Gula tereduksi diukur dengan cara yang dijelaskan oleh SOMOGYI (1952).

Virulensi *Ralstonia solanacearum*

Uji virulensi menggunakan tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* L.) kultivar Gondol Hijau dan Jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) kultivar jahe putih besar. Benih tomat disemai pada pot yang berisi tanah steril. Setelah terbentuk sepasang daun sempurna, bibit dipindahkan ke dalam pot yang berisi media tumbuh yaitu campuran tanah dengan pupuk kandang (2:1) yang telah disterilkan. Tanaman yang telah berumur 1 bulan setelah pemindahan digunakan untuk menguji virulensi. Inokulasi patogen dilakukan dengan cara menyiramkan 50 ml suspensi *R. solanacearum* (10^7 cfu/ml) di sekitar perakaran yang tanpa dilukai sebelumnya. Satu bulan setelah diinokulasi gejala penyakit diberi skor (0-5) dan dihitung intensitasnya (MULYA *et al.*, 2000).

Benih jahe ditanam pada pot berisi media steril. Setelah tanaman berumur 2 bulan dipilih tanaman yang

seragam. Inokulasi dilakukan dengan cara pelukaan pada batang semu dan rimpang tanaman (SUPRIADI *et al.*, 1995).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Produksi Enzim

Produksi enzim karboksimetil-selulase dapat dideteksi pada media agar CMC yaitu dengan adanya zona bening di sekitar koloni bakteri yang terlihat kontras dengan warna merah kongo 1% (Gambar 1). Hasil pengukuran lebar zona bening tersebut menunjukkan bahwa semua isolat avirulen menghasilkan zona bening lebih kecil dari isolat virulen, bahkan isolat T585AV tidak membentuk zona bening (Tabel 1). Hal ini mengindikasikan bahwa isolat virulen memproduksi enzim karboksimetil selulosa lebih banyak dari isolat avirulen. Menurut ROBERTS *et al.* (1988) produksi enzim selulase, terutama enzim endoglukanase, berperan dalam menentukan tingkat patogenisitas *R. solanacearum*. Enzim CMC-ase termasuk dalam kompleks enzim selulase yang berfungsi memecah secara acak turunan senyawa selulosa seperti karboksimetil-selulosa. Selulosa banyak ditemukan pada bagian tanaman terutama pada jaringan umbi-umbian, seperti halnya rimpang jahe.

Aktivitas enzim ekso-PG dalam filtrat kultur *R. solanacearum* terdeteksi dengan adanya pelepasan gula dari substrat Na-poligalakturonat oleh filtrat. Baik isolat virulen maupun isolat avirulen memproduksi enzim ini namun isolat virulen memproduksi enzim ekso-PG lebih tinggi dari isolat avirulen. Menurut ALLEN *et al.* (1992) enzim PG berfungsi menghidrolisis dinding sel dan lamela tengah jaringan tanaman. Enzim ekso-PG pada isolat virulen asal jahe diduga berperan dalam menyebabkan maserasi batang semu jahe sehingga batang semu jahe yang terinfeksi mudah patah dari pangkalnya (rimpang).

Tingkat Patogenesis dan Produksi Enzim

Isolat virulen menyebabkan tanaman tomat layu pada minggu pertama setelah inokulasi. Tanaman jahe mulai layu pada 10 hari setelah inokulasi. Tomat yang diinokulasi dengan isolat avirulen tidak menunjukkan gejala layu, tetapi batangnya terlihat garis menghitam sampai helai daun.

Pada Tabel 1 tampak bahwa rata-rata produksi enzim CMC-ase dan PG-ase pada kelompok isolat virulen lebih tinggi dari kelompok isolat avirulen. Demikian pula indeks penyakit yang timbul sebagai hasil inokulasi. Hasil analisis regresi menunjukkan bahwa hubungan antara produksi

Tabel 1. Produksi enzim karboksimetil-selulase (CMC-ase) dan ekso-poligalakturonase serta virulensi dari beberapa isolat *Ralstonia solanacearum* asal jahe

Table 1. Production of carboxymethylcellulase (CMC-ase) and exopoligalacturonase as well as virulent levels of several isolates of *Ralstonia solanacearum* from ginger

Isolat Isolates	Aktivitas enzim Enzyme activities		Tingkat virulensi (Indeks penyakit) ¹ Virulence levels (Disease indices)	
	CMC-ase ² CMC-ase	Ekso-PG ³ Exo-PG	Tomat Tomato	Jahe Ginger
Virulen Virulent				
T447	2.20 ± 0.00	0.586 ± 0.004	1.00	1.00
T585	2.23 ± 0.02	0.863 ± 0.003	0.40	0.90
T872	2.27 ± 0.06	0.536 ± 0.006	0.40	1.00
Rata-rata	2.23 ± 0.02	0.662 ± 0.004	0.60	0.96
Avirulen Avirulent				
T585AV	0.00 ± 0.00	0.689 ± 0.005	0.00	0.00
T592	1.23 ± 0.06	0.357 ± 0.001	0.00	0.00
T872AV	1.27 ± 0.06	0.485 ± 0.003	0.13	0.00
Rata-rata	0.83 ± 0.02	0.510 ± 0.003	0.04	0.00

Keterangan : ¹ skala 0-1 scale : 0-1, ² : cm cm, ³ : mg ekuivalen glukosa/ml filtrat/jam/OD₆₆₀ mg equivalent glucose/cc filtrate/hour/OD₆₆₀

ensim CMC-ase dan ekso-PG dengan virulensi menunjukkan fungsi linier yang nyata pada tanaman tomat (Y (tingkat patogenisitas)** = $-0.9354 + 0.2737x1$ (aktivitas ensim CMC-ase)** + $1.2809x2$ (aktivitas ensim ekso-PG); $p=92.26$) dan jahe ($Y^{**} = -0.985 + 0.4433x1^{**} + 1.2809x2$; $p=87.09$). Hal ini menunjukkan bahwa ensim CMC-ase dan ekso-PG memberikan indikasi tingkat patogenisitas isolat sehingga dapat digunakan sebagai salah satu indikator dalam memilih isolat-isolat yang memiliki tingkat patogenisitas tinggi untuk skrining ketahanan tanaman.

Sejauh ini metode deteksi *R. solanacearum* dapat dilakukan dengan mempergunakan media selektif, serologi atau memanfaatkan marka molekuler. Kedua metode yang pertama secara baik dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *R. solanacearum* tetapi tidak dapat digunakan untuk membedakan ras patogen. Padahal pengelompokan ras atau kisaran inang *R. solanacearum* sangat berguna dalam ekologi patogen, terutama untuk menyusun strategi pengendalian penyakit layu bakteri (FRENCH, 1994). Penggunaan marka molekuler memberikan harapan dalam memperbaiki metode deteksi sampai tingkat perbedaan ras meskipun masih terbatas untuk ras tertentu (COOK dan SEQUEIRA, 1992).

Pendekatan pemilihan marka untuk pembedaan spesifikasi tingkat intra spesies dapat dilakukan secara acak dari *genomic library* (TSUCHIYA dan HORITA, 1998) atau dari analisis sekuen gen tertentu (COOK *et al.*, 1989). Gen yang mengkode produksi CMC dan PG dari *R. solanacearum* terutama isolat tomat dan tembakau telah berhasil dicangkok (ROBERTS *et al.*, 1988; SCHELL *et al.*, 1988). Mengingat CMC-ase dan PG-ase memiliki peran dalam menentukan tingkat patogenisitas, maka gen yang mengendalikan sifat tersebut dapat dijadikan sebagai salah satu target dalam penelusuran marka molekuler untuk deteksi spesifikasi patogenisitas *R. solanacearum*. Deteksi cepat yang dapat membedakan perbedaan ras-ras *R. solanacearum* membuka peluang dalam mengungkap ekologi patogen serta epidemiologi dan strategi pengendalian penyakit layu bakteri.

KESIMPULAN

Isolat *R. solanacearum* asal jahe memproduksi ensim CMC-ase dan PG. Produksi kedua ensim tersebut berkaitan erat dengan tingkat virulensi dari isolat-isolat tersebut. Hasil ini memberikan konfirmasi terhadap hasil penelitian pada komoditas lain seperti tomat dan tembakau. Untuk itu gen yang mengkode kedua ensim tersebut berpotensi untuk dijadikan salah satu marka molekuler dalam meneliti variasi dalam species *R. solanacearum*.

DAFTAR PUSTAKA

- ALLEN, C., L. SIMON, M. ATKINSON and L. SEQUEIRA. 1992. Analysis of polygalacturonase as a component of bacterial wilt disease. G. L. Hartman, G.L. and A.C. Hayward (Eds.) Bacterial Wilt, ACIAR Proceedings No. 45: 238-244.
- ALLEN, C., Y. HUANG and L. SEQUEIRA. 1991. Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*, Mol. Plant-Microbe Interact. 4:147-154.
- COOK, D. and L. SEQUEIRA. 1992. Strain differentiation of *Pseudomonas solanacearum* by molecular genetic methods. In : A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.) Bacterial Wilt. The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK.: 77-93.
- COOK, D., E. BARLOW and L. SEQUEIRA. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum* detection of restriction fragment length polymorphism with DNA probe that specify virulence and hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2:113-121.
- CORNEL, J.M. and H.M. JOSON. 1986. Isolation, screening and characterization of cellulose-utilizing bacteria. The Phillipine J. Sci. 115:223-232.
- FRENCH, E.R. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In : A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.) Bacterial Wilt. The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas Solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK.:199-208.
- HAYWARD, A.C. 1964. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*. J. Appl. Bacteriol. 27:265-277.
- HOLOWAY, B.W., V. V. KRISHNAPILLAI and M.D. ESCUADRA. 1994. Whole genome analysis of pseudomonads and its application to *Pseudomonas solanacearum*. In : A.C. Hayward and G.L. Hartman (Eds.) Bacterial Wilt. The Disease and Its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, UK.: 59-75.
- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on tetrazolium medium. Phytopathology 44:693-695.
- MANIATIS, R., E.F. FRITSCH and J. SAMBROOK. 1982. Molecular cloning. Cold Spring-Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 286 pp.
- MULYA, K., T. SHIOMI, and M. ONIKI. 1989. Bacterial wilt on industrial crops in Indonesia. Industrial Crops Research Journal. 2(2) :30-36.
- MULYA, K., N. KARYANI and E.M. ADHI. 2000. Characteristics of Bacterial Wilt Resistance on *Solanum torvum*. Buletin Plasma Nutfah 6 (2):14-20.

- ROBERTS, D.P., T.P. DENNY and M.A. SCHELL. 1988. Cloning of the *eglI* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170:1445-1451.
- SCHELL, M.A., D.P. ROBERTS and T.P. DENNY. 1988. Analysis of *Pseudomonas solanacearum* polygalacturonase encoded by *pglA* and its involvement in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 170:4501-4508.
- SEQUEIRA, L. 1992. Bacterial wilt: past, present and future. *In* : G.L. Hartman and A.C. Hayward (Eds.) *Bacterial Wilt. ACIAR Proceedings No. 45*:12-21.
- SOMOGYI, M. 1952. Note on sugar determination. *J. Biol. Chem.* 195:19-23.
- SUPRIADI, K. MULYA, E.M. ADHI and N. KARYANI. 2000. Assesing virulence of *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii* and Blood Disease Bacterium based on their cellulase production, *Forestry and Est. Crops J.* 1 :1-4
- SUPRIADI, J.G. ELPHINSTONE, S.J. EDEN-GREEN and S.Y. HARTATI. 1995. Physiological, serological and pathological variation amongst isolates of *Pseudomonas solanacearum* from ginger and other host in Indonesia. *Jurnal Penelitian Tanaman Industri.* 1 (2):88-98.
- TSUCHIYA, K. and M. HORITA. 1998. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in Japan, *In* : Prior, Ph., C. Allen and J.E. Elphinstone (Eds.) *Bacterial Wilt Disease. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg* : 61-73.