



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

RESPON PERTAHANAN KULTUR PISANG KEPOK (*Musa balbisiana* cv. Kepok TERHADAP INOKULASI *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

SKRIPSI



REZKY LASTINOV AMZA
06 132 018

JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2011

**RESPON PERTAHANAN KULTUR PISANG KEPOK
(*Musa balbisiana* cv. Kepok) TERHADAP INOKULASI
Fusarium oxysporum f.sp *cubense***

Oleh

Rezky Lastinov Amza (06132018), Prof. Dr. Abdi Dharma¹⁾, Dr. Adlis Santoni²⁾

1)Pembimbing I

2)Pembimbing II

ABSTRAK

Inokulasi *Fusarium oxysporum* yang bersifat patogen pada tanaman kultur pisang kepok (*Musa balbisiana* cv. Kepok) mempengaruhi aktivitas enzim *Phenylalanin Amonia Lyase* (PAL) sebagai enzim ketahanan pada kultur pisang kepok dan produksi asam salisilat pada tanaman tersebut. Aktivitas enzim PAL dan produksi asam salisilat tersebut merupakan bentuk respon pertahanan tanaman terhadap infeksi patogen. Pada penelitian ini diamati aktivitas enzim PAL dan produksi senyawa asam salisilat pada kultur pisang kepok dengan variasi waktu 0, 12, 24, 36, dan 48 jam setelah inokulasi. Aktivitas enzim PAL pada sampel mengalami penurunan setelah inokulasi dan tidak melebihi aktivitas enzim PAL pada kontrol. Sedangkan produksi asam salisilat mengalami kenaikan pada 12 jam setelah inokulasi dan cenderung mengalami penurunan pada variasi waktu setelahnya. Dari kedua hasil analisis ini, dapat disimpulkan bahwa pisang kepok sangat rentan terhadap serangan patogen *Fusarium oxysporum*.

**THE DEFENSE RESPONDS OF BANANA CULTIVAR KEPOK
(*Musa balbisiana* cv. *Kepok*) CULTURE TO THE INOCULATION OF
Fusarium oxysporum f.sp *cubense***

By:

Rezky Lastinov Amza (06132018), Prof. Dr. Abdi Dharma¹⁾, Dr. Adlis Santoni²⁾

1)Advisor I

2)Advisor II

ABSTRACT

The inoculation of the pathogen *Fusarium oxysporum* to the culture of Banana cultivar Kepok (*Musa balbisiana* cv. *Kepok*) influences the *Phenylalanin Amonia-Lyase* (PAL) enzyme's activity as the resistance enzyme and the salicylic acid production of banana. The activity of PAL enzyme and production of salicylic acid are the plant's defense responds to the pathogenic infection. The activity of PAL enzyme and the production of salicylic acid of Banana cultivar Kepok with the variation times 0, 12, 24, 36, and 48 hours after inoculation were analyzed. The activity of PAL enzyme was decreased after inoculation and did not approach the PAL enzyme's activity of the control. The production of salicylic acid was increased 12 hours after inoculation and tended to be decreased for the next hours of inoculation. It can be concluded that banana cultivar kepok is susceptible to the infection of *Fusarium oxysporum*.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur terhadap Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul “ **Respon Pertahanan Kultur Pisang Kepok (*Musa balbisiana cv Kepok*) Terhadap Inokulasi *Fusarium oxysporum f.sp cubense***. Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat memperoleh gelar sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang. Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua yang telah memberi dukungan, inspirasi serta motivasi.
2. Bapak Prof. Dr. Abdi Dharma, M.Sc selaku pembimbing I yang telah memberikan dukungan, serta arahan dan motivasi dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
3. Bapak Dr. Adlis Santoni selaku pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, arahan dan masukan dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi.
4. Bapak Hasnirwan MS sebagai Penasihat Akademik yang telah memberikan masukan dan arahan dalam mengikuti kegiatan perkuliahan.
5. Bapak Dr. Nasril Nasir yang telah memberikan dukungan serta fasilitas dalam pelaksanaan penelitian.
6. Fitrinayanti, Amd sebagai analis laboratorium bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam Universitas Andalas, Padang yang telah membantu kelancaran penelitian ini.
7. Tim laboratorium kultur jaringan Parak Kopi, Padang yang telah membantu kelancaran penelitian ini.
8. Billy Harnaldo Putra dan Ragil Marwa selaku rekan satu tim penelitian yang telah berbagi dukungan, suka dan duka selama penelitian dan penulisan skripsi.

9. Rekan-rekan yang membantu kelancaran penelitian, Hendra, Addin, Wide, Rijal dan lainnya yang tidak bisa disebutkan satu persatu, yang telah membantu serta berkontribusi selama proses penelitian serta penulisan skripsi ini.

Padang, Oktober 2011



Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
ABSTRACT	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah.....	2
1.3. Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Pisang Kepok	4
2.2 Kultur Jaringan.....	6
2.3 Penyakit Layu Fusarium.....	7
2.4 Systemic Acquired Resistance (SAR).....	10
2.5 Phenilalanine Amonia-Lyase (PAL).....	12
2.4 Asam Salisilat.....	14
III. METODE PENELITIAN.....	16
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	16
3.2. Alat dan Bahan.....	16
3.2.1. Alat	16
3.2.2. Bahan.....	16
3.3. Prosedur Penelitian.....	17
3.3.1. Persiapan Materi.....	17
3.3.2. Sterilisasi Bahan dan Alat	17
3.3.3. Pembuatan Media MS	17
3.3.4. Sterilisasi Eksplan Pisang Kepok.....	18

3.3.5. Persiapan Jamur.....	18
3.3.6. Inokulasi Jamur.....	19
3.3.7 Ekstraksi Kultur Untuk Analisis Enzim dan Protein.....	19
3.3.8. Ekstraksi Kultur Untuk Analisis Asam Salisilat	16
3.3.9. Uji Aktivitas Enzim PAL	19
3.3.10 Uji Kadar Protein	20
3.3.11 Uji HPLC Ekstrak Metanol	20
IV. HASIL DAN DISKUSI.....	18
4.1. Hasil Kultur Jaringan Pisang Kepok.....	21
4.2. Hasil Isolat Jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	23
4.3. Hasil Inokulasi <i>Fusarium oxysporum</i> Pada Kultur Pisang Kepok.....	24
4.4 Kadar Protein.....	24
4.5 Pengaruh Infeksi <i>Fusarium</i> Terhadap Aktivitas Enzim Phenilalanine Ammonia-Lyase (PAL).....	25
4.6 Pengaruh Infeksi <i>Fusarium</i> Terhadap Perubahan Kandungan Asam Salisilat.....	27
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1. Kesimpulan.....	30
5.2. Saran	30
DAFTAR PUSTAKA	31
LAMPIRAN	

DAFTAR TABEL

Nama Tabel	Hal
1. Kandungan Gizi Pisang.....	5
2. Data Puncak Baru yang Muncul Pada Hasil Analisis HPLC Sampel...	29



DAFTAR GAMBAR

Nama Gambar	Hal
1. Pisang Kepok Kuning.....	5
2. Isolat Jamur <i>Fusarium oxysporum</i>	8
3. Daun Tanaman Pisang Yang Terserang Penyakit Layu Fusarium.....	9
4. Batang Tanaman Pisang Yang Terserang Penyakit Layu Fusarium.....	9
5. Buah Pisang Yang Terserang Penyakit Layu Fusarium.....	10
6. Mekanisme Biosintesis Asam Salisilat	13
7. Struktur Asam Salisilat.....	14
8. Hasil Kultur Jaringan Pisang Kepok	21
9. Kultur Pisang Kepok yang Berumur Empat Minggu.....	22
10. Isolat Jamur <i>Fusarium oxysporum</i> Setelah Satu Minggu.....	23
11. Kurva Hasil Uji Kadar Protein	24
12. Kurva Perbandingan Nilai Aktivitas Enzim PAL.....	26
13. Kurva Nilai Aktivitas Spesifik Enzim PAL.....	27
14. Kurva Data Perbandingan Kandungan Asam Salisilat Pada Kontrol dan Sampel.....	28

DAFTAR LAMPIRAN

- 1 Perhitungan Konsentrasi *Fusarium oxysporum* Dengan Menggunakan Haemocytometer
- 2 Komposisi Media MS
- 3 Skema Kerja Ekstraksi Dengan Metanol
- 4 Skema Kerja Evaporasi Pelarut Metanol
- 5 Data Kalibrasi Standar Bovine Serum Albumin (BSA)
- 6 Perhitungan Kadar Protein
- 7 Perhitungan Reagen Uji Enzim PAL, Aktivitas Enzim PAL dan Aktivitas Spesifik Enzim PAL
- 8 Perhitungan Volume Ekstrak Metanol
- 9 Data dan Hasil Kultur Jaringan Pisang Kepok
- 10 Data Hasil Kromatogram Uji HPLC



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pisang merupakan salah satu komoditi buah yang penting di Indonesia. Buah ini memiliki nilai gizi dengan kandungan vitamin, mineral dan karbohidrat yang tinggi. Selain itu, bagian lain dari tanaman pisang juga dapat dimanfaatkan. Kulit pisang dapat digunakan untuk produksi cuka melalui proses fermentasi alkohol dan cuka. Daun pisang dapat digunakan sebagai pembungkus makanan yang menarik dan higienis serta ramah lingkungan. Serat batang pisang tertentu dapat digunakan sebagai bahan dasar untuk produksi pakaian^[1].

Jenis pisang di Indonesia cukup banyak, salah satunya yaitu pisang kepok (*Musa balbisiana cv. kepok*). Pisang jenis ini telah menjadi komoditi utama masyarakat di Indonesia khususnya di Sumatera Barat, terutama dalam pembuatan kolak dan goreng pisang. Konsumsi pisang kepok di Sumatera Barat cukup tinggi. Oleh karena itu, saat ini pemerintah daerah Sumatera Barat sedang menggiatkan peluang investasi komoditas pisang di Sumatera Barat. Kegiatan ini bertujuan untuk mendorong produksi pisang menjadi lebih meningkat^[2].

Akan tetapi, selama sepuluh tahun kebelakang, tanaman pisang masyarakat banyak yang mati karena terserang penyakit layu fusarium, dan menyebabkan kerugian yang cukup besar. Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum f. sp cubense*^[3]. Penyakit ini menghambat pertumbuhan tanaman pisang dan bahkan dapat mematikan tanaman pisang. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu usaha untuk menanggulangi masalah ini. Usaha penanggulangan masalah ini antara lain dengan eradikasi jamur patogen dari lahan yang terserang dan dengan pemuliaan tanaman pisang untuk mendapatkan bibit unggul yang tahan terhadap penyakit layu fusarium. Salah satunya yaitu dengan metoda kultur jaringan.

Teknologi kultur jaringan merupakan salah satu metoda yang efisien dan efektif untuk produksi bibit pisang secara masal dan bebas penyakit. Bibit pisang hasil kultur jaringan ideal untuk dijadikan sebagai sampel karena bebas dari penyakit,

sehingga respon yang diberikannya bila diinfeksi dengan *Fusarium*, semata-mata disebabkan oleh interaksinya dengan *Fusarium*.

Infeksi gen yang bersifat patogen mampu menginduksi *Systemic Acquired Resistance* (SAR) dari tanaman. SAR merupakan sebuah respon sistemik oleh tumbuhan yang terjadi akibat cekaman seperti infeksi oleh patogen. Respon sistemik ini berupa rangsangan pada sel tumbuhan untuk mengaktifkan enzim-enzim ketahanan yang memproduksi senyawa anti patogen, diantaranya adalah enzim *Phenylalanine Amonia-Lyase* (PAL) dan senyawa asam salisilat^[4]. Untuk melihat respon ketahanan tanaman pisang terhadap infeksi *Fusarium*, bibit pisang hasil kultur jaringan diinfeksi dengan jamur *Fusarium*, kemudian diamati perubahan aktifitas enzimatik PAL dan konsentrasi asam salisilat.

Respon berupa ekspresi enzimatik PAL serta produksi asam salisilat dari tanaman pisang terhadap infeksi biotik dari patogen *Fusarium* akan menjelaskan kenapa pisang kepek sangat rentan terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*. Senyawa asam salisilat dari ekstrak metanol sampel tanaman pisang diukur dengan *High Performance Liquid Cromatography* (HPLC)^[5]. Ekspresi enzim PAL dianalisis dengan menguji aktifitas enzimatik PAL terhadap substrat Phenilalanin. Produk reaksi yang dikatalis oleh PAL diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV (270 nm). Sedangkan kadar protein dianalisis dengan metoda Bradford..

1.2 Perumusan Masalah

Pada penelitian ini dilakukan analisis produksi asam salisilat, aktivitas enzim PAL dan kadar protein setiap variasi waktu inokulasi dari tanaman pisang kepek yang diinfeksi oleh jamur *Fusarium oxysporum*. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui respon ketahanan kultur pisang kepek terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*. Oleh karena itu, dapat dirumuskan beberapa permasalahan pada penelitian, yaitu:

1. Bagaimana profil perubahan aktifitas spesifik dari PAL persatuan waktu, terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*.
2. Bagaimana profil perubahan produksi asam salisilat didalam jaringan pisang terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*.

3. Bagaimana penjelasan tentang hipotesa respon sistim pertahanan (PAL dan asam salisilat) dari pisang kepok terhadap ketahanan pisang kepok di lapangan oleh infeksi *Fusarium oxysporum*.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan perumusan masalah di atas, maka dapat dirumuskan bahwa tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui ketahanan pisang kepok terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* dengan indikator perubahan aktivitas enzim PAL dan produksi asam salisilat sebagai respon pertahanannya.

1.4 Manfaat Penelitian

Berdasarkan latar belakang dan tujuan penelitian, maka manfaat dari penelitian ini yaitu menginformasikan respon pertahanan pisang kepok terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* melalui hasil analisis aktivitas enzim PAL dan produksi asam salisilat. Penelitian ini diharapkan dapat menyediakan sebuah referensi tentang respon ketahanan pisang terhadap penyakit layu Fusarium.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pisang Kepok (*Musa balbisiana*)

Tanaman pisang merupakan salah satu jenis tanaman hortikultura yang selain mempunyai arti ekonomis juga mempunyai nilai sosial budaya yang sangat penting. Salah satu jenis pisang yang buahnya banyak dikonsumsi yaitu pisang kepok (*Musa balbisiana* cv. kepok).



Gambar 2.1. Pisang kepok kuning^[7]

Pisang kepok memiliki warna yang cerah, terutama pisang kepok kuning (gambar 2.1), buah tidak berbiji, bertangkai, dalam bentuk sisir, dan warna daging berwarna kuning bersih. Pisang kepok termasuk ke dalam golongan pisang yang buahnya dapat dimakan setelah dimasak terlebih dahulu. Bentuk buahnya agak pipih sehingga kadang disebut pisang gepeng. Berat per tandan dapat mencapai 14-22 kg dengan jumlah sisir 10-16, setiap sisir terdiri dari 12-20 buah. Pisang kepok banyak jenisnya. Yang terkenal antara lain pisang kepok kuning. Pisang kepok putih warna dagingnya putih dan pisang kepok kuning warna dagingnya kuning. Pisang kepok kuning mempunyai rasa yang lebih enak dibanding pisang kepok putih. Karenanya, pisang kepok jenis kuning lebih disukai^[7].

Taksonomi pisang kepok^[7]:

Divisi : *Spermatophyta*
Sub divisi : *Angiospermae*
Kelas : *Monocotyledon*
Keluarga : *Musaceae*
Genus : *Musa*
Spesies : *Musa balbisiana cv kepok*

Berdasarkan klasifikasi taksonominya, pisang kepok termasuk ke dalam golongan famili *Musaceae* yang berasal dari India Selatan. Walaupun dapat dimakan dalam keadaan segar, tetapi kegunaannya lebih meluas terutama untuk diolah lebih lanjut menjadi hasil olahan lainnya, seperti kripik, gorengan, kolak pisang, sale dan lainnya. Oleh karena sifat dan kegunaannya ini, pisang kepok merupakan komoditi pertanian yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi yang menyebar ke seluruh dunia dan Indonesia^[20].

Tabel 2.1 Kandungan Gizi Pisang^[7]

Kandungan	Persen /berat
Air	62 - 78
Karbohidrat	18-25
Protein	0.1-0.2
Lemak	0.1-0.2
B-Caroten	1.5-2.0
Tiamin (B1)	0.3-0.6
Riacin	6.0-12.0
Riboflavin	0.23-0.87
Pyridoxine	3.2
Vitamin C	20-240

Pisang kepok, terutama pisang kepok kuning memiliki kandungan nilai gizi yang cukup tinggi. Tabel 2.1 menggambarkan kandungan nilai gizi pisang kepok yang cukup tinggi tersebut. Kandungan air pisang kepok sebanyak 62-78 % per satuan berat pisang. Kandungan karbohidrat, protein dan lemaknya berturut-turut 25,

0.2 dan 0.2 % per berat pisang. Selain itu pisang kepok juga memiliki kandungan vitamin dan mineral yang cukup.

Pisang kepok sering juga disebut dengan nama pisang batu, walaupun sebenarnya pisang batu merupakan salah satu jenis pisang yang lain. Hal ini disebabkan oleh kulitnya yang keras dan daging buahnya yang cukup alot, sehingga diperlukan pengolahan terlebih dahulu sebelum dikonsumsi. Beberapa cara untuk mengkonsumsi pisang kepok ini yaitu dengan merebusnya terlebih dahulu dan dapat dijadikan sebagai bahan dasar pembuatan kolak.

2.2 Kultur Jaringan

Kultur jaringan berasal dari bahasa asing yaitu *tissue culture*. Kultur adalah budidaya dan jaringan adalah sekelompok sel yang mempunyai bentuk dan fungsi yang sama. Maka, kultur jaringan berarti membudidayakan suatu jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya^[6].

Kultur jaringan termasuk salah satu teknologi perbanyakan tanaman secara vegetatif atau pembelahan biji. Metoda vegetatif digunakan karena sifatnya yang efisien dan efektif untuk menumbuhkan dan memperbanyak suatu jenis tanaman. Salah satu keuntungan dari kultur jaringan yaitu didapatkannya tanaman yang mirip sifat induknya. Oleh sebab itu, pada kultur jaringan induk yang dipilih seharusnya yang berkualitas baik. Selain diperolehnya tanaman baru yang sifatnya mirip dengan induknya, kultur jaringan juga memiliki keuntungan terhadap waktu, dimana proses penggunaan kultur jaringan terhadap tanaman relatif lebih singkat dibandingkan dengan metoda konvensional^[6]. Oleh karena itu, pada penelitian ini, digunakan teknik kultur jaringan untuk memperbanyak sampel pisang kepok.

Bagian yang dikultur yaitu jaringan meristem pada tanaman pisang kepok. Jaringan meristem yaitu jaringan muda, jaringan yang terdiri dari sel-sel yang membelah dan dindingnya masih tipis. Karena jaringan ini selalu membelah, maka cocok digunakan untuk kultur jaringan karena diduga memiliki hormon pertumbuhan^[6]. Bagian tersebut yaitu bonggol pisang kepok. Bagian bonggol digunakan karena bonggol merupakan pusat titik tumbuh tanaman pisang. Bagian bonggol dibersihkan

dan dibelah untuk ditanam ke dalam media MS (Murashige & Skoog). Penggunaan media MS sudah umum digunakan pada proses kultur hamper setiap jenis tanaman, karena media ini dinilai memiliki kandungan nutrisi yang cukup^[6].

Setiap media pertumbuhan pada kultur jaringan memiliki kandungan nutrisi berupa makro dan mikro nutrisi. Makro nutrisi merupakan nutrisi yang ditambahkan ke dalam media dalam jumlah yang banyak selain unsur C, H, dan O. Unsur-unsur yang termasuk makro ini yaitu Nitrogen (N), Fosfor (P), Kalium (K), Sulfur (S), Kalsium (Ca), dan Magnesium (Mg). Unsur NPK merupakan unsur makro yang mutlak diperlukan pada media pertumbuhan kultur jaringan karena ketiga unsur ini berperan dalam proses metabolisme tumbuhan^[6].

2.3 Penyakit Layu Fusarium

Penyakit layu fusarium disebut juga dengan penyakit Panama karena pada awalnya penyakit ini berasal dari negara Panama. Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum f.sp cubense*. Jamur ini merupakan jenis yang menginfeksi tanaman pisang dan menyebabkan penyakit layu fusarium. *Fusarium oxysporum* banyak terdapat di tanaman dan di dalam tanah. Jamur ini menyebar pada tanah yang berpasir dan lembab. *Fusarium oxysporum* merupakan jenis jamur yang patogen^[21].

Jamur dapat dideskripsikan secara morfologi makroskopik dan morfologi mikroskopik. Morfologi makroskopik jamur dapat berbeda nyata pada media yang berbeda. Media yang digunakan biasanya PDA pada suhu 25°C dengan cahaya yang cukup 12 jam setiap harinya. Koloni berbentuk wol dengan *mycelium* berwarna krem atau putih *mycelium* putih (gambar 2.2)^[14].



Gambar 2.2 Isolat jamur *Fusarium oxysporum*

Morfologi mikroskopik dari *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* yaitu memiliki dua jenis konidia yakni makrokonidia dan mikrokonidia. Makrokonidia berbentuk seperti bulan sabit, bersepta, terdiri atas 4-7 sel, dan berukuran $45 \times 2,9 \mu\text{m}$, sedangkan mikrokonidia berbentuk elips, terdiri atas 1 sel, berukuran $15,8 \times 1,93 \mu\text{m}$. Pada kondisi yang kurang menguntungkan, *Fusarium* dapat membentuk klamidospora sebagai fase istirahatnya di dalam tanah sehingga dapat bertahan di dalam tanah dalam jangka waktu yang lama. Klamidospora berbentuk bulat, berwarna coklat biasanya solitair dengan diameter $(5,3) - 10,25 \mu\text{m}$ ^[14].

Berikut merupakan taksonomi dari *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*:

Kingdom	:Fungi
Phylum	:Ascomycota
Kelas	:Sordariomycetes
Orde	:Hypocreales
Famili	:Nectriaceae
Genus	: <i>Fusarium</i>
Spesies	: <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>

Beberapa spesies dari *Fusarium* menghasilkan senyawa mycotoxin yang berbahaya bagi manusia dan hewan. Racun utama pada *Fusarium* terutama

fumonisin dan *trichotesins*^[14]. Salah satu bentuk sifat patogen dari *Fusarium* yaitu pada tanaman pisang.



Gambar 2.2 Daun tanaman pisang yang terserang penyakit layu fusarium^[3]



Gambar 2.3 Batang tanaman pisang yang terserang penyakit layu fusarium^[3]

Gejala serangan penyakit ini pada tanaman pisang tampak dari daun yang menguning, terutama di sepanjang tepi daun yang menyebabkan daun layu dengan cepat, tangkai daun patah, dan batang membusuk (gambar 2.2). Pada jaringan batang, terlihat berwarna kuning dengan titik-titik dan garis-garis merah sampai sawo matang (gambar 2.3). Sedangkan pada buah, terjadi pembusukan dengan gejala berubah warna menjadi kecoklatan hingga kemerahan (gambar 2.4).



Gambar 2.4 Buah pisang yang terserang penyakit layu fusarium^[3]

Akan tetapi, serangan *Fusarium oxysporum* pada tanaman, terutama tanaman pisang dapat menginduksi ketahanan pisang itu sendiri. Aktivasi enzim Phenylalanin Amonia-Lyase (PAL) dan produksi asam salisilat pada tanaman pisang yang diinduksi oleh *Fusarium oxysporum* merupakan indikator ketahanan tanaman pisang terhadap penyakit layu fusarium. Pada penelitian ini, akan diamati kedua bentuk indikator tersebut sebagai bentuk respon ketahanan pisang kepok, walaupun di lapangan, pisang kepok merupakan salah satu jenis tanaman pisang yang rentan terhadap penyakit layu fusarium^[11].

2.4 Systemic Acquired Resistance (SAR)

Systemic Acquired Resistance (SAR) merupakan mekanisme pertahanan yang terinduksi yang berfungsi sebagai perlindungan terhadap keberadaan mikroorganisme. Beberapa tanaman memiliki mekanisme pertahanan terhadap serangan pathogen. Kontak terhadap pathogen sering memicu reaksi pertahanan yang terlokalisasi, yang disebut *Hypersensitive Reaction* (HR). HR merupakan mekanisme pertahanan yang cepat dan ditandai dengan matinya sel pada area infeksi^[4]

Pertarungan antara patogen dan tanaman ini sering bergantung kepada kecepatan. Pemenang biasanya dapat dilihat dari berapa cepatnya pathogen dapat mengakibatkan kerusakan, tergantung dari seberapa cepat tanaman memberikan respon pada level yang sesuai. Apabila gen tumbuhan mengenali gen pathogen, maka

mekanisme pertahanan seperti HR akan segera teraktivasi untuk mencegah terjadinya infeksi^[19].

Kurangnya sinyal untuk mengetahui keberadaan patogen sering menyebabkan infeksi pada tanaman. Untuk mengatasi terjadinya infeksi lanjutan, tanaman memberikan mekanisme pertahanan sekunder yang dikenal dengan nama SAR. Induksi SAR membutuhkan sinyal dari molekul asam salisilat yang terakumulasi pada tanaman selama aktivasi SAR^[19].

SAR diaktivasi oleh peningkatan keberadaan gen-gen *Pathogenic-Related* (PR) pada jaringan-jaringan lokal maupun sistemik. Bukti bahwa asam salisilat merupakan sinyal pada pengaktifan SAR terdapat pada penelitian yang dilakukan oleh Malamy et al, dimana terjadi peningkatan konsentrasi asam salisilat pada jaringan-jaringan lokal dan sistemik setelah tanaman tembaaku diinfeksi oleh Tobacco Mosaic Virus (TMV). Kenaikan konsentrasi asam salisilat ini berhubungan dengan meningkatnya induksi PR gen^[4].

Mekanisme pertahanan ini diduga juga terjadi ketika kultur pisang kepok diinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* yang bersifat patogen. Jaringan pada tanaman pisang yang diinfeksi akan memberikan sinyal pertahanan berupa akumulasi asam salisilat sebagai senyawa anti mikroba. Proses produksi asam salisilat ini tentunya melibatkan berbagai macam reaksi dan biosintesis pada jaringan tanaman, termasuk salah satunya reaksi enzimatis yang melibatkan enzim ketahanan PAL. Aktivasi enzim PAL sebagai enzim ketahanan produksi asam salisilat memiliki peranan penting terhadap mekanisme pertahanan pisang kepok terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*.

Aktivasi enzim PAL dan produksi asam salisilat diamati dengan menginfeksi *Fusarium oxysporum* pada tanaman pisang kepok. Proses infeksi dilakukan dengan metoda inokulasi jamur pada bonggol pisang. Inokulasi merupakan penimbunan, atau perekayasa proses dengan penambahan suatu elisator atau yang disebut juga penginfeksi pada sel tumbuhan dengan tujuan menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder. Elisitasi merupakan proses yang terjadi pada tanaman akibat inokulasi agen hayati. Agen-agen hayati yang

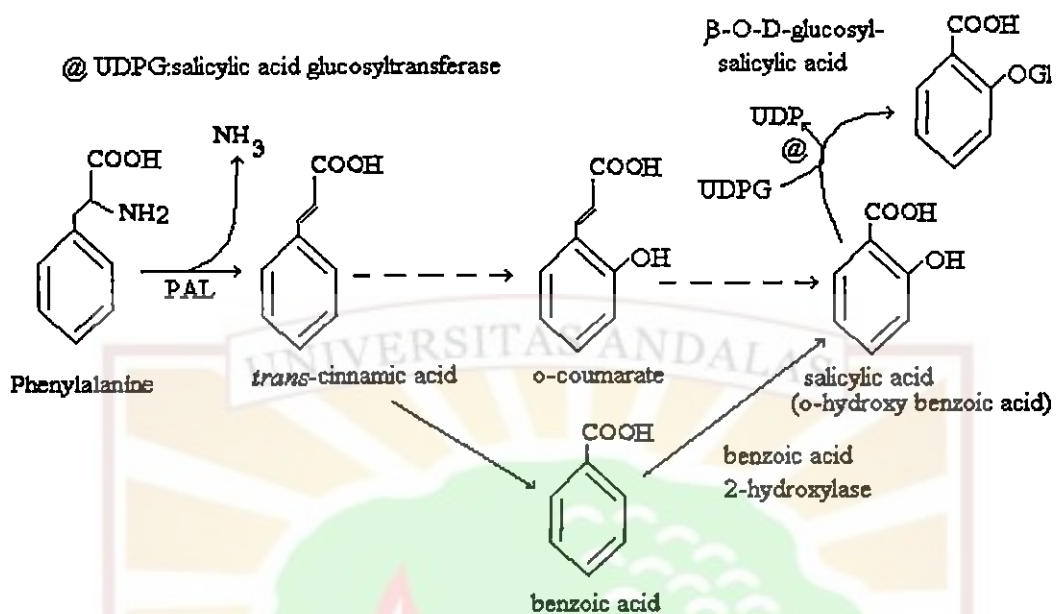
menginduksi tanaman disebut dengan elisitor atau inducer. Elisitor ada 2 kelompok, yaitu elisitor abiotik dan elisitor biotik^[13].

1. Elisitor abiotik, bisa berasal dari senyawa anorganik, radiasi secara fisik, seperti ultraviolet, logam berat, dan detergen.
2. Elisitor biotik dapat dikelompokkan dalam elisitor endogen, dan elisitor eksogen, yaitu:
 - a) Elisitor endogen, umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dari dinding sel (oligogalakturonat) yang rusak. Rusaknya dinding sel ini, disebabkan oleh suatu serangan patogen. Dinding sel yang rusak dan terluka oleh karena aktivitas enzim hidrolisis dari serangan patogen.
 - b) Elisitor eksogen, bisa berasal dari dinding jamur misalnya kitin, atau glukukan. Selain itu dapat berupa senyawa yang disintesis, misalnya protein.

2.5 Phenylalanine Ammonia-Lyase (PAL)

Enzim *Phenylalanine Ammonia Lyase* (PAL) merupakan salah satu enzim ketahanan yang terdapat pada tumbuhan. Enzim-enzim ketahanan akan teraktivasi apabila terjadi gangguan berupa infeksi patogen terhadap jaringan tumbuhan. Infeksi patogen ini akan mengaktifkan sinyal pada jaringan tumbuhan untuk memproduksi enzim-enzim ketahanan, termasuk enzim PAL^[10].

Enzim PAL sebagai enzim kunci biosintesis asam salisilat terlihat pada gambar 2.6. Substrat dari enzim PAL yaitu L-phenylalanine. Enzim PAL akan mengkatalisis reaksi enzimatik apabila direaksikan dengan L-phenylalanine. Salah satu senyawa yang akan terbentuk apabila enzim PAL bereaksi dengan L-phenylalanine yaitu asam trans-sinamat. Asam sinamat yang terbentuk akan membentuk asam benzoate melalui proses biosintesis di dalam jaringan tumbuhan. Terbentuknya asam salisilat pada jaringan tumbuhan terjadi akibat reaksi yang dikatalisis oleh enzim asam benzoate 2-hidroksidase^[18].



Gambar 2.6. Mekanisme biosintesis asam salisilat

Enzim PAL banyak terdistribusi pada tumbuhan. Enzim ini termasuk ke dalam famili Lyase. Enzim PAL terlibat di dalam lima jalur metabolisme yaitu, metabolisme tyrosin, metabolisme nitrogen, biosintesis fenilpropanoid dan alkaloid, serta metabolisme phenylalanine^[9].

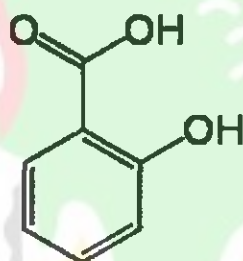
Menurut Gianinazzi (1994), induksi patogen terhadap tanaman akan mengaktivasi enzim-enzim hidrolitik seperti enzim *peroksidase* (PO), *polyphenol oksidase* (PPO) dan *Phenylalanine Ammonia-Lyase* (PAL). Selain peningkatan aktivitas enzim PAL, juga terjadi peningkatan PR-protein. Diketahui bahwa tanaman menghasilkan sejumlah protein baru sebagai respon terhadap induksi patogen^[10].

PAL berhubungan erat dengan ketahanan tanaman. Peningkatan senyawa fenol dan turunannya melalui jalur fenolik dan shikimat dicirikan oleh adanya peningkatan aktivitas enzim-enzim dalam jalur tersebut, terutama PAL. Menurut Agrios (1988), PAL merupakan enzim kunci dalam jalur tersebut. Sebagai enzim kunci, PAL memindahkan secara irreversible fenilalanin dalam metabolisme protein pada sintesis fenol selama lignifikasi. Pada penelitiannya, Higuchi (1994) menyatakan bahwa enzim ini hanya terdapat pada organisme yang membentuk lignin

atau beberapa turunan asam sinamat^[10]. Oleh sebab itu aktivitas enzim PAL berpengaruh terhadap respon ketahanan pisang kepok oleh inokulasi *Fusarium oxysporum*.

2.6 Asam Salisilat

Asam salisilat merupakan senyawa fenolik dengan rumus molekul $C_6H_4(OH)COOH$. Asam salisilat juga sering disebut sebagai asam 2-hidroksibenzenkarboksilat. Asam salisilat memiliki gugus hidroksi dalam posisi orto dengan gugus karboksilat (gambar 2.2). Asam salisilat merupakan hormon fenolik pada tumbuhan dan sering memegang peranan pada pertumbuhan dan perkembangan tanaman, fotosintesis dan transpor ion [8].



Gambar 2.5. Struktur asam salisilat

Asam salisilat pada tanaman pisang dapat dihasilkan melalui aktivasi enzim PAL dengan substrat L-phenylalanine melalui jalur fenolik. Enzim PAL pada penelitian ini diaktivasi oleh infeksi jamur patogen *Fusarium oxysporum* dengan penambahan substrat L-phenylalanine melalui mekanisme *Systemic Acquired Resistance* (SAR). SAR merupakan suatu bentuk respon tanaman terhadap infeksi pathogen. Aktivasi SAR akan menstimulasi produksi asam salisilat pada tanaman^[4]. Asam salisilat yang dihasilkan akibat infeksi patogen berfungsi sebagai senyawa anti terhadap patogen tersebut^[8]. Menurut Shirasu et al, asam salisilat memiliki peranan penting baik pada ketahanan tumbuhan terhadap penyakit dan respon ketahanan sistemik pada tanaman.

Asam salisilat merupakan senyawa fenolik yang memiliki sifat antimikroba. Senyawa ini juga memerlukan enzim untuk mengaktivasi karakter ketahanannya^[4].

Senyawa-senyawa fenolik memainkan peranan penting dalam perlindungan tanaman terhadap patogen. Analisis produksi asam salisilat diperlukan untuk mengetahui respon kultur pisang kepok terhadap inokulasi *Fusarium oxysporum*. Hal ini dilakukan untuk melihat seberapa cepat tanaman memberikan respon berupa asam salisilat terhadap infeksi patogen.



BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April 2010 s.d bulan Mei 2011 di Laboratorium Kultur Jaringan, Kelurahan Parak Kopi, Padang Timur, Kota Padang; Laboratorium Bioteknologi Jurusan Kimia FMIPA Universitas Andalas; Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Andalas; Laboratorium Dasar Universitas Andalas; dan Laboratorium Biologi Sentra Universitas Andalas.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC), *autoclave*, *High Pressure Liquid Chromatography* (HPLC) Shimadzu: fasa terbalik kolom C-18, detektor UV, dan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu-1700 Pharma.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu sampel tanaman pisang (Bonggol Pisang berasal dari Rumah Kaca Parak Kopi Padang), isolat Jamur *Fusarium oxysporum* asal Peureulak, Aceh Timur NAD varietas Barangan, VCG: 01213/16, tanggal korsen: 8/2008 yang diinokulasi di Balai Penelitian dan Budi Daya Tanaman (BALITBU) Solok, Sumatera Barat, bahan-bahan kimia pembuatan medium MS (lampiran 3), bahan kimia inisiasi dan subkultur pisang: air steril, fungisida, larutan pemutih, dan sabun antibakteri, metanol destilat, 150 mM Buffer Tris HCl, pH 8.5 Sigma Prod. No. T-1503 (lampiran VII), Coumassine Brilliant Blue (CBBG), H₃PO₄ 85 %, etanol 95%, methanol HPLC, asam asetat PE, aquabidest dan asam salisilat murni.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan tanaman pisang kepok hasil kultur jaringan yang dilakukan di laboratorium Kultur Jaringan Pisang Parak Kopi Padang. Sampel yang diambil berupa bonggol pisang dengan ukuran panjangnya ± 10 cm. Bonggol ini digunakan sebagai bahan tanam (eksplan) kultur jaringan dengan cara mengambil jaringan meristemnya dengan ukuran $\pm 0,5$ cm.

3.3.2 Sterilisasi Bahan dan Alat

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian disterilisasi menurut cara yang sesuai. Alat gelas seperti cawan petri, botol kultur, dan media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 30 menit. *Laminar Air Flow* (LAF) media kerja aseptik dibersihkan dengan etanol 70%.

3.3.3 Pembuatan Media MS

Medium dibuat dengan cara memasukkan masing-masing larutan stok yang telah dibuat (lampiran III). Zat-zat dicampur sesuai takaran ke dalam labu 1 L. Kondisi pH media diatur menjadi 5,8-6,0 dengan menggunakan pH-meter atau kertas pH. Jika nilai pH lebih tinggi, medium ditetesi dengan HCl 3 N sedangkan jika lebih rendah ditetesi dengan NaOH 1 N. Media ditambahkan pematat atau agar. Setelah itu, media dimasak sampai mendidih. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam botol kultur dan ditutup dengan plastik lalu disterilisasi menggunakan autoclave pada suhu 121°C , tekanan 15 psi selama 20 menit.

3.3.4 Sterilisasi Eksplan Pisang Kepok

Sterilisasi eksternal dan internal dilakukan terhadap eksplan agar menghilangkan kontaminasi diluar dan di dalam jaringan eksplan. Eksplan pisang berupa bonggol dikupas beberapa lapis dan dicuci dengan air. Setelah dibersihkan, eksplan dibawa ke dalam laminar dan direndam dalam air steril dengan penambahan sabun antibakteri selama 30 menit. Perendaman selanjutnya menggunakan larutan fungisida selama 25

menit dan dibilas dengan air steril 1 kali. Kemudian eksplan direndam dengan larutan pemutih 30% selama 20 menit dan dibilas dengan air steril 1 kali. Eksplan ini dikupas satu lapis dalam petridis, dan direndam kembali dengan larutan pemutih 20% selama 15 menit, selanjutnya dibilas dengan air steril 1 kali. Sterilisasi dengan perendaman pemutih ini dilanjutkan dengan konsentrasi 10% selama 10 menit. Tahap akhir sterilisasi dalam proses inisiasi ini, dimana eksplan dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali.

Eksplan yang telah disterilisasi ini kemudian dibelah menjadi dua di dalam petridis. Belahan tepat dilakukan pada bagian tengah dari eksplan yang merupakan titik tumbuh dari tanaman pisang. Belahan eksplan tersebut ditanam dalam botol kultur yang telah berisi \pm 20 ml media Murashige and Skoog (MS) steril dengan pH 5,8. Eksplan pisang dipelihara dalam ruangan kultur dengan suhu 18 °C dan penyinaran 12-20 jam per hari selama \pm 6 minggu

3.3.5 Persiapan Jamur

Konidia Jamur *Fusarium oxysporum* dibiakkan dan diremajakan di media Potato Dextrose Agar (PDA) sampai terbentuk konidia. Konidia jamur yang telah dibiakkan kemudian disuspensikan ke dalam 400 mL aquibidest steril dengan melepaskan hifa-hifa yang tumbuh pada media Potato Dextrose Agar (PDA) dengan kuas dan kemudian dihitung konsentrasinya sebagai perisapan untuk proses inokulasi.

3.3.6 Inokulasi Jamur

Planlet yang sudah memiliki akar dan umur yang cukup (3-5 bulan) diinokulasikan dengan jamur *Fusarium oxysporum*. Konsentrasi jamur yang didapatkan yaitu $3,2 \times 10^6$ cfu/mL setelah dihitung dengan menggunakan peralatan Haemocytometer (lampiran I). Proses inokulasi dilakukan dengan cara menyuntikan jamur yang telah disuspensikan kepada bagian bonggol tanaman kultur pisang. Pengamatan dan perlakuan dilakukan terhadap variasi waktu 0 (standar), 12 jam, 24 jam, 36 jam, dan 48 jam.

menit dan dibilas dengan air steril 1 kali. Kemudian ekstrak direndam dengan larutan pemutih 0,5% selama 30 menit dan dibilas dengan air steril 1 kali. Ekspansi ini dilakukan satu lapis dalam petridis dan diberikan kembali dengan larutan pemutih 0,5% selama 15 menit, selanjutnya dibilas dengan air steril 1 kali. Analisis dengan perendaman pemutih ini dilanjutkan dengan konsentrasi 10% selama 10 menit. Langkah akhir sterilisasi dalam proses ini adalah dimana ekstrak dibilas dengan air steril sebanyak 3 kali.

Ekspansi yang telah disterilkan ini kemudian dibalut menjadi dua di dalam petridis. Balutan tepi dilakukan pada bagian tengah dari ekspansi yang merupakan titik tumbuh dari tanaman paku. Balutan ekspansi tersebut ditaman dalam botol kultur yang telah berisi 1/20 ml media Murashige and Skoog (MS) steril dengan pH 5,8. Ekspansi paku dipelihara dalam ruangan kultur dengan suhu 18 °C dan penyinaran 12-20 jam per hari selama 4-6 minggu.

3.3.5. Persiapan Jamur

Konidia jamur *Aspergillus oryzae* dibilakkan dan ditempatkan di media Potato Dextrose Agar (PDA) sebagai sumber konidia. Konidia jamur yang telah dibilakkan kemudian diuspensikan ke dalam 400 ml. adididat steril dengan memakai filter hisis yang terdapat pada media Potato Dextrose Agar (PDA) dengan luas dan jumlah bibit yang konduktifnya sebagai parameter untuk proses inkubasi.

3.3.6. Inkubasi Jamur

Platler yang sudah memiliki akar dan umur yang cukup (3-5 bulan) diinkubasikan dengan jamur *Aspergillus oryzae*. Konduktasi jamur yang didapatkan yaitu 3,5 x 10⁷ cfu/ml. Setelah bibit yang digunakan terdapat dalam Petri dish (lampiran 1), proses inkubasi dilakukan dengan cara menyuntikkan jamur yang telah diuspensikan kepada bagian bawah bagian bawah petri dish yang sudah dan berakumulasi dilakukan setiap 24 jam (standar) 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam.

3.3.7 Ekstraksi Planlet Untuk Analisis Enzim dan Protein

Protein dari kultur pisang yang sudah diperlakukan dan kontrol diekstrak dengan larutan buffer tris-HCl (20 mL untuk setiap sampel) dimana buffer ditambahkan HCl untuk menyesuaikan pH menjadi 8 (lampiran VII). Kemudian filtrat disaring dengan kain kasa steril, dan *disentrifuge*. Filtrat hasil *sentrifuge* ditampung di dalam tabung reaksi dan disimpan dalam suhu 2° C. Filtrat adalah ekstrak kasar protein dan akan diuji terhadap aktifitas enzim PAL dan kadar protein.

3.3.8 Ekstraksi Planlet Untuk Analisis Asam Salisilat

Planlet pisang yang diperlakukan dan kontrol direndam dengan methanol destilat (300 mL) dan disaring. Hasil ekstraksi dengan methanol ditampung dalam sebuah wadah untuk kemudian dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* (lampiran III & IV). Hasil evaporasi akan diuji terhadap kandungan asam salisilat menggunakan HPLC.

3.3.9 Uji Alktivitas Enzim Phenilalanine Ammonia Liase (PAL)

Aktivitas enzim PAL ditentukan dengan mengukur produk yang terbentuk sebagai hasil reaksi yang dikatalis oleh enzim PAL. Reaksi dilakukan pada suhu 30°C, pH 8.5, dan produk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm. Campuran reaksi terdiri dari 0.1 mL buffer Tris HCl 0.15 M (reagen A), 2.0 mL larutan substrat L-Phenylalanine 0.003 M (reagen B). Reaksi dimulai dengan memasukkan 0.1 mL ekstrak kasar protein preparat PAL (Reagen C), dan penambahan 0.9 mL aquabidest didalam sebuah tabung reaksi. Campuran reaksi diinkubasi pada 30°C, pH 8.5, selama 5. menit. Reaksi enzimatik dihentikan dengan penambahan TCA 2N (3 mL), untuk mendenaturasi protein enzim. Hasil reaksi dikur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 270 nm. ^[15].

3.3.10 Uji Kadar Protein

Analisis protein dilakukan dengan menggunakan metoda Bradford. Metoda ini dilakukan dengan menambahkan filtrat (enzim PAL) dengan reagen Bradford (0.01 g

CBBG didalam 5 mL etanol 96% dan H_3PO_4 85 % 10 % (10 mL dalam 100 mL)). Campuran reaksi diinkubasi selama 10 menit, kemudian serapan diukur dengan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 590 nm). Kurva standard dibuat dengan standar protein Bovine Serum Albumin (BSA). Larutan protein standar BSA dibuat dengan variasi konsentrasi 0 s/d 1000 ppm (rentang 200 ppm). Data hasil pengujian standar BSA digunakan untuk mendapatkan persamaan regresi yang akan digunakan untuk menentukan kadar protein pada sampel.

3.3.11 Uji HPLC Ekstrak Metanol

Ekstrak metanol dari sampel dikeringkan dengan alat rotary evaporator., kemudian diukur massanya. Sebelum dianalisa, ekstrak kental sampel dilarutkan dengan campuran methanol dengan air (40:60%) dan asam asetat murni 1.5%, kemudian dianalisa dengan HPLC Shimadzu kolom C-18 dengan metoda gradient dan *flow rate* 1 mL/menit (lampiran VIII) ^[16].

BAB IV HASIL DAN DISKUSI

4.1 Hasil Kultur Jaringan Pisang Kepok



Gambar 4.1 Hasil kultur jaringan pisang kepok (umur \pm 3 bulan)

Kultur pisang kepok yang digunakan untuk diperlakukan dengan patogen yaitu yang telah memiliki perakaran yang kuat karena proses respon sistemik pada tanaman berawal dari bagian akar, sehingga apabila diinfeksi dengan patogen, mampu bertahan dengan memberikan respon yang cukup. Gambar 4.1 menunjukkan kultur pisang kepok yang telah cukup umur (3 bulan) serta memiliki perakaran yang kuat. Kultur pisang ini yang digunakan untuk analisis enzim PAL, kadar protein dan kandungan asam salisilat. Jumlah pisang kepok yang berhasil dikultur yaitu sebanyak 59 eksplan (lampiran IX).



Gambar 4.2 Kultur pisang kepok yang berumur empat minggu

Perkembangan kultur pada empat minggu pertama dapat dilihat dari pertumbuhan batang dan daun serta bonggol, tetapi belum memiliki perakaran yang kuat (gambar 4.2). Pertumbuhan kultur pada empat minggu ketiga dinilai cukup baik untuk dianalisis karena sudah memiliki perakaran yang cukup kuat seperti terlihat pada gambar 4.1.

Pertumbuhan bonggol di dalam media MS terjadi karena bonggol menyerap nutrisi-nutrisi yang terdapat di dalam media MS. Proses ini dilakukan dalam keadaan sangat steril untuk mencegah mikroorganisme yang tidak diinginkan masuk ke dalam media dan mengkontaminasi media sehingga pertumbuhan tanaman pisang menjadi terhambat. Proses kontaminasi oleh mikroorganisme inilah yang menjadi hambatan terbesar di dalam proses kultur tanaman pisang kepok. Sebagian kultur pisang yang telah diinisiasi maupun yang disubkultur terinfeksi oleh mikroorganisme baik oleh bakteri ataupun jamur, sehingga target jumlah pertumbuhan kultur tanaman pisang kepok terganggu.

Kontaminasi oleh bakteri atau jamur biasanya disebabkan oleh proses inisiasi atau subkultur yang tidak bersih atau steril. Kontaminasi oleh bakteri biasanya disebabkan oleh keberadaan air di tanaman atau di media MS. Keberadaan air di tanaman ataupun di media MS sebagai media pertumbuhan tanaman akan menjadi sumber kehidupan bagi bakteri. Sementara kontaminasi oleh jamur disebabkan oleh sisa-sisa kotoran proses inisiasi ataupun subkultur yang secara tidak sengaja ikut masuk ke dalam media pertumbuhan MS.

4.2 Hasil isolat jamur *Fusarium oxysporum*

Konidia jamur *Fusarium oxysporum* yang telah ditanam didalam media Potato Dextrose Agar (PDA), telah membentuk koloni-koloni dalam bentuk hifa setelah satu minggu. Jamur yang dibiakkan menghasilkan koloni-koloni yang berwarna ungu seperti terlihat pada gambar 4.3.



Gambar 4.3 Isolat Jamur *Fusarium oxysporum* setelah satu minggu

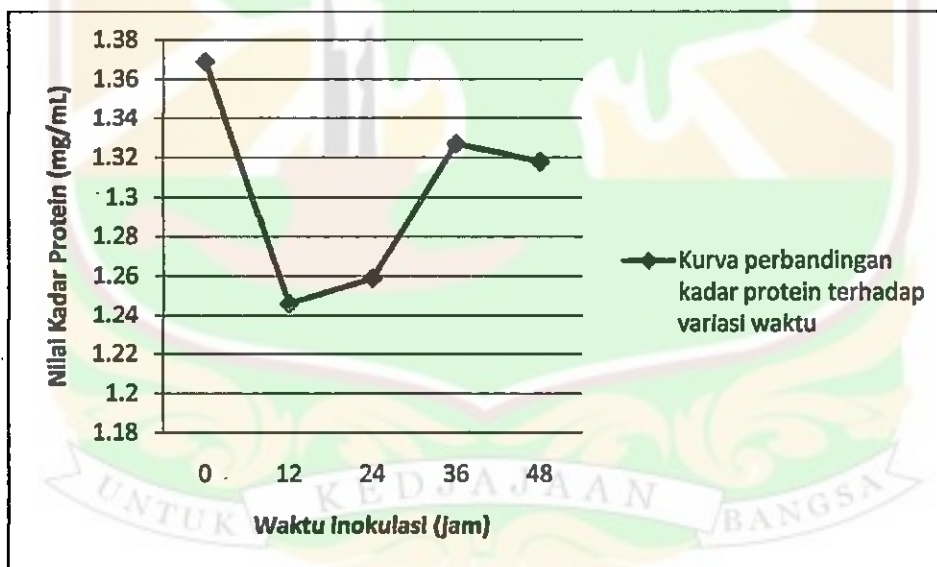
Konidia yang ada dipermukaan dilepaskan dengan menggunakan sebatang kuas dan disuspensikan untuk menghitung konsentrasi konidia jamur. Konsentrasi kondia dihitung dengan Haemocytometer, dan didapatkan konsentrasinya yaitu $3,2 \times 10^6$ cfu/mL (lampiran II).

4.3 Hasil Inokulasi *Fusarium oxysporum* pada Kultur Pisang Kepok

Infeksi *Fusarium oxysporum* pada kultur pisang kepok pada penelitian ini belum menghasilkan perubahan morfologis yang signifikan karena waktu pengamatan yang singkat, yaitu hanya sampai 48 jam setelah inokulasi. Sementara itu perubahan fisiologis terjadi, hal ini dapat dilihat dari analisis enzim PAL dan produksi asam salisilat.

4.4 Kadar Protein

Nilai kadar protein didapatkan dengan memasukkan nilai absorbansi pada uji spektrofotometer visible (590 nm) kepada persamaan regresi yang didapatkan pada uji standar BSA (lampiran VI). Kurva pada gambar 4.4 dibawah ini menunjukkan hasil perhitungan kadar protein pada pisang kepok yang diinfeksi oleh *Fusarium oxysporum*.



Gambar 4.4 Kurva hasil uji kadar protein

Kadar protein pisang kepok yang diperlakukan terlihat menurun dengan drastis pada 12 jam pertama setelah infeksi. Setelah itu kadar protein mulai naik kembali sampai jam ke 36, dan kemudian menurun kembali setelah jam ke 36 setelah

infeksi. Kenaikan kadar protein tidak melebihi kadar protein yang terdapat pada kontrol. Dengan kata lain, terjadi penurunan kadar protein pada tanaman pisang kepok yang diperlakukan. Menurut Julhasratman *et al* (2009) penurunan kadar protein pada tanaman pisang kepok disebabkan oleh inokulasi patogen. Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Suswati (2011), terjadinya penekanan kadar protein diduga akibat peningkatan enzim PPO yang membentuk senyawa o-quinon yang bersifat reaktif dan mampu secara kovalen memodifikasi pelepasan gugus amino dan subhidril dalam protein. Hipotesa ini berkaitan dengan hasil analisis aktivitas enzim PAL dimana terjadi penekanan terhadap aktivitas enzim PAL oleh aktivitas enzim PPO pada variasi waktu yang sama.

Kadar protein yang didapatkan memiliki hubungan dengan nilai aktivitas enzim. Data nilai kadar protein menunjukkan similaritas dengan nilai aktivitas enzim. Similaritas ini juga ditemukan pada hasil uji nilai aktivitas spesifik enzim PAL yang didapatkan berdasarkan nilai kadar protein.

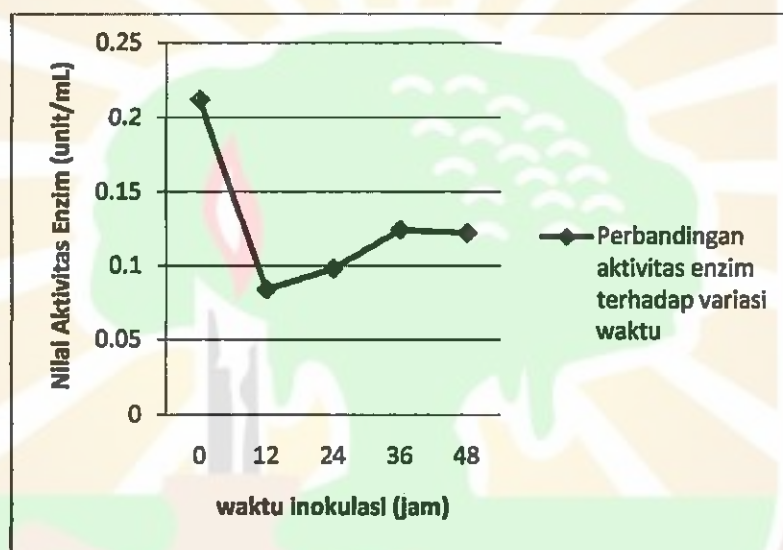
4.5 Pengaruh Infeksi Fusarium Terhadap Aktivitas Enzim Phenilalanine Ammonia-Lyase (PAL)

Nilai aktivitas enzim PAL didapatkan melalui reaksi enzimatik dengan mereaksikan ekstrak enzim dari pisang kepok dengan larutan substrat L-Phenylalanine selama 5 menit dengan penambahan inhibitor TCA. Nilai aktivitas enzim PAL didapatkan melalui perhitungan terhadap data absorbansi yang didapatkan melalui uji menggunakan spektrofotometer *visible* dengan panjang gelombang 590 nm (lampiran VIII).

Aktivitas enzim PAL pada jaringan pisang yang diperlakukan terlihat menurun pada 12 jam pertama, kemudian naik sampai jam ke 36, dan menurun kembali setelah jam ke 36. Kenaikan aktifitas enzimatik PAL tidak mencapai nilai aktifitas PAL sebelum diperlakukan (Gambar 4.5). Kecenderungan yang sama juga terlihat pada pengaruh infeksi terhadap kandungan protein didalam jaringan pisang. Penurunan kandungan protein maupun aktifitas enzimatik PAL secara umum mungkin disebabkan karena terjadinya gangguan metabolisme pada pisang akibat infeksi.

Perubahan pada aktifitas enzimatis PAL didalam jaringan yang diperlakukan, diduga disebabkan oleh menurunnya kandungan protein didalam jaringan secara umum.

Selain itu, penekanan terhadap nilai aktivitas enzim PAL ini juga diduga akibat meningkatnya aktivitas enzim ketahanan lain seperti Poliphenol Peroksidase (PPO). Peningkatan aktivitas PPO mampu menekan aktivitas enzim PAL karena aktivitas kedua enzim ini bertolak belakang, ketika aktivitas enzim PPO tinggi, maka aktivitas enzim PAL sebaliknya^[10].

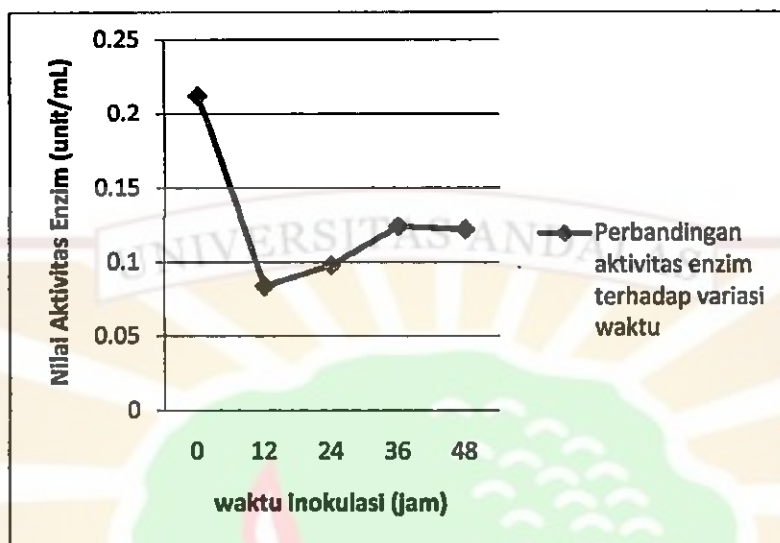


Gambar 4.5 Kurva perbandingan nilai aktivitas enzim PAL

Nilai aktivitas enzim PAL yang didapatkan juga menjelaskan bagaimana respon pisang kepok berupa aktivitas enzim PAL terhadap infeksi *Fusarium oxysporum*. Penekanan dan rendahnya nilai aktivitas enzim PAL pada sampel menjelaskan bahwa respon ketahanan berupa enzim PAL yang dihasilkan oleh tanaman pisang kepok tidak terjadi. Hal ini membuktikan bahwa pisang kepok rentan terhadap serangan patogen *Fusarium oxysporum*.

Dugaan diatas didukung oleh data nilai aktivitas spesifik enzim PAL, dimana juga ditemukan pola perubahan aktifitas spesifik PAL yang sama dengan pola perubahan aktifitas enzimatis enzim PAL didalam jaringan tanaman pisang kepok yang diperlakukan (Gambar. 4.6). Nilai aktivitas spesifik enzim PAL didapatkan

dengan membandingkan nilai aktivitas enzim PAL dan nilai kadar protein pada sampel pisang kepek setiap variasi waktu (lampiran VII).



Gambar 4.6 Kurva nilai aktivitas spesifik enzim PAL

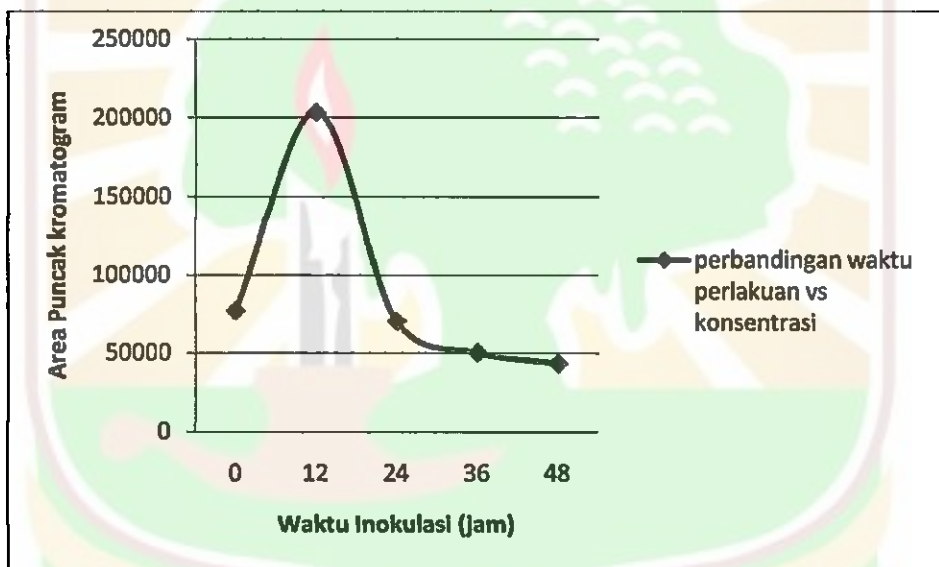
4.6. Pengaruh Infeksi *Fusarium* Terhadap Perubahan Kandungan Asam Salisilat

Kandungan asam salisilat didalam jaringan pisang yang diperlakukan dengan *Fusarium* diuji dengan metoda *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Berdasarkan hasil uji HPLC standar asam salisilat, puncak senyawa asam salisilat diperkirakan berada pada waktu retensi sekitar 2 menit. Hal ini disebabkan karena pada waktu retensi tersebut didapatkan puncak dengan luas area tertinggi, mengingat kromatogram yang didapatkan memunculkan lebih dari satu puncak (gambar 4.7).

Kemunculan puncak lebih dari satu pada kromatogram standar kemungkinan disebabkan oleh terjadinya ikatan hidrogen intra dan intra molekul asam salisilat. Terbentuknya ikatan hidrogen ini disebabkan oleh adanya molekul air yang terdapat pada sampel dan udara yang bereaksi pada saat pengukuran sehingga memungkinkan terbentuknya empat senyawa berbeda yang berasal dari asam salisilat.

Hasil uji HPLC terhadap kontrol dan sampel menunjukkan bahwa kandungan asam salisilat berubah setiap variasi waktu perlakuan (gambar 4.7). Peningkatan

kandungan asam salisilat terjadi pada 12 jam setelah perlakuan dan cenderung menurun pada variasi waktu setelahnya. Bahkan, kandungan asam salisilat setelah 12 jam perlakuan lebih rendah dibandingkan dengan control. Hasil ini menunjukkan bahwa respon ketahanan berupa asam salisilat pada pisang kepok yang diinfeksi terjadi dengan cepat, tetapi tidak bertahan lama. Pisang kepok hanya mampu memberikan respon pada 12 jam pertama setelah infeksi, dan cenderung melemah setelahnya karena menurunnya kandungan asam salisilat. Dengan kata lain, pisang kepok cukup rentan apabila diserang oleh *Fusarium oxysporum*. Kromatogram hasil uji HPLC kontrol dan sampel dapat dilihat pada lampiran X.



Gambar 4.7 Kurva data perbandingan kandungan asam salisilat pada kontrol dan sampel

Peningkatan aktivitas enzim PAL pada 12 jam setelah infeksi merupakan hasil induksi *Systemic Acquired Resistance* (SAR) pada tanaman pisang kepok. Induksi SAR terjadi akibat infeksi patogen terhadap tanaman. Akan tetapi, induksi SAR berupa asam salisilat pada tanaman pisang kepok yang diperlakukan mengalami penurunan yang diduga akibat lemahnya induksi yang terjadi. Lemahnya induksi ini diduga akibat terjadinya penurunan aktivitas enzim-enzim ketahanan, terutama enzim PAL, yang memiliki kaitan dengan produksi asam salisilat melalui jalur shikimat.

Tabel 4.1 Data puncak baru yang muncul pada hasil analisis HPLC sampel

Variabel	Rt Asam Salisilat	Jumlah Puncak	Puncak Baru Terhadap Kontrol	Rt Puncak Baru
standar	2.281	4		
kontrol	2.141	7		
12	2.174	9	3	0.808 , 1.148, 5.500
24	2.125	8	2	3.408 & 5.525
36	2.136	9	2	3.433 & 5.508
48	2.137	7	1	3.425

Puncak-puncak data HPLC sampel dan kontrol yang didapatkan tidak tajam karena sampel dan kontrol yang diuji berupa ekstrak methanol dan bukan senyawa yang murni sehingga masih belum terpisah dengan sempurna. Perubahan yang terjadi akibat infeksi *Fusarium* tidak hanya terjadi pada kandungan asam salisilat, tetapi juga senyawa-senyawa lain. Hal ini dapat dilihat pada tabel 4.1 dimana didapatkan kemunculan puncak-puncak baru pada pisang kepok yang diperlakukan. Kemunculan puncak baru terbanyak didapatkan pada waktu 12 jam setelah infeksi, sama dengan waktu didapatkannya kandungan asam salisilat terbanyak. Kemunculan puncak-puncak baru ini membuktikan bahwa terjadinya perubahan kandungan senyawa-senyawa yang dihasilkan oleh pisang kepok akibat infeksi *Fusarium oxysporum*.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Melalui hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa respon pertahanan pisang kepok yang diinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* berupa perubahan aktivitas enzim PAL dan produksi asam salisilat dapat diketahui. Adapun beberapa pernyataan yang dapat disimpulkan berdasarkan hasil penelitian yaitu:

1. Penurunan aktivitas enzim PAL pisang kepok yang diperlakukan dan nilainya yang tidak melebihi kontrol merupakan indikator bahwa pisang kepok tidak memberikan respon berupa aktivitas enzim PAL yang optimal setelah diinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*.
2. Perubahan kandungan asam salisilat pada pisang yang diperlakukan, dimana didapatkan kandungan tertinggi pada 12 jam setelah infeksi dan cenderung menurun dan lebih rendah daripada kontrol pada variasi waktu setelahnya menyatakan bahwa respon ketahanan berupa asam salisilat pada pisang kepok terjadi cukup cepat tetapi tidak bertahan lama.
3. Nilai aktivitas enzim PAL dan kandungan salisilat yang didapatkan membuktikan bahwa pisang kepok tidak memberikan respon pertahanan yang cukup baik sehingga bersifat sangat rentan apabila terinfeksi oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* yang patogen.

5.2 Saran

Setelah mengamati dan menganalisa hasil penelitian, didapatkan beberapa hal yang perlu untuk diperhatikan selanjutnya:

1. Analisis terhadap senyawa lain hasil elisitasi *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* perlu untuk dilakukan sebagai pembandingan terhadap kandungan asam salisilat.
2. Uji bioaktivitas terhadap senyawa-senyawa yang dihasilkan.

3. Hasil penelitian ini dapat dibandingkan dengan penelitian terhadap jenis pisang yang lain sehingga didapatkan kesimpulan terhadap jenis pisang yang memberikan respon ketahanan yang lebih baik terhadap infeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*.



DAFTAR PUSTAKA

1. Depaertemen Riset dan Teknologi. 1990. *Pendayagunaan dan Pemanfaatan Teknologi Budidaya Tanaman*. Jakarta: Depristek
2. Dinas Tanaman Pangan dan Holtikultura Sumatera Barat. 2008. *Peluang Investasi Komoditas Pisang di Sumatera Barat*. Padang: Deptan Sumbar
3. Widono, Salim, Et al. 2003. *Pengimbasan ketahanan Pisang Terhadap Penyakit Layu Fusarium*. Agrosains: Volume 5 No. 2
4. Durrant, W.E and Dong, X. 2004. *Systemic Acquired Resistance*. USA: North Carolina University Annual Reviews
5. Eufrocino C. Marfori, et.al. 2002. *Trichosetin, a Novel Tetramic Acid Antibiotik Produced in Dual Culture of Trichoderma harzianum and Catharanthus Callus*. Osaka: Osaka University
6. Hendaryono, Daisy Sriyanti. Wijayani, Ari. 1994. *Teknik Kultur Jaringan: Pengenalan dan Petunjuk Perbanyakan Tanaman Secara Vegetatif-Modern*
7. Badan Standarisasi Nasional. 1998. *SNI 01-4481-98 Pisang Kepok*. Jakarta: BSN
8. Kristian, Riko. 2007. *Asam Salisilat Dari Fenol*. Cilegon: Universitas Sultan Ageng Tirtayasa
9. Fritz, Richard, et al. 1976. *Phenylalanine Ammonia-Lyase*. Texas: Uiversity of Texas Medical Branch.
10. Suswati. 2011. *Respon Fisiologis Tanaman Pisang Dengan Introduksi Fungi Mikoriza Arbiskular Indigenus Terhadap Penyakit Darah Bakteri*. Padang: Universitas Andalas.
11. Mukhtasar. 2002. *Physical and Morphological Performances of Banana in Bengkulu*. Bengkulu: UNIB
12. Direktorat Pengolahan dan Pemasaran Hasil Holtikultura. 2005. *Road Map Pisang: Pasca Panen, Pengolahan dan Pemasaran Hasil Pisang*. Jakarta; Departemen Pertanian
13. Riata, Rita. 2010. *Elisitasi dan Aplikasinya*. Bandung: ITB

14. <http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium.html>
15. Havar, E.A. and Hanson, K.R. 1970. *Methods in Enzymology*. USA: Sigma
16. Zellmer, David L, and Williams, Robert. 2000. *HPLC Determination of Phenolic Acid*. USA: Texas A&M University
17. Gati Lestari, Endang. 2009. *In Vitro Selection and Somaclonal Variation for Biotic and Abiotic Stress Tolerance*. Bogor: Indonesian Center for Agricultural Biotechnology and Genetic Resources Research and Development
18. Rhodes, David. 2010. *Metabolic Plant Physiology: Salicylic Acid synthesis and Conjugation*. USA: Purdue University
19. Dong, Xinian. 2007. *SA, JA, Ethylene, and Disease Resistance on Plants*. Durham: Duke University
20. Suhardiman, P. 1997. *Budi Daya Pisang Cavendish*. Yogyakarta: Kanisius



LAMPIRAN I
PERHITUNGAN KONSENTRASI *Fusarium oxysporum* DENGAN
MENGGUNAKAN HAEMOCYTOMETER

Tabel Data perhitungan koloni jamur *Fusarium oxysporum*

Kotak I	9
Kotak II	18
Kotak III	8
Kotak IV	19
Kotak V	10
Jumlah	64

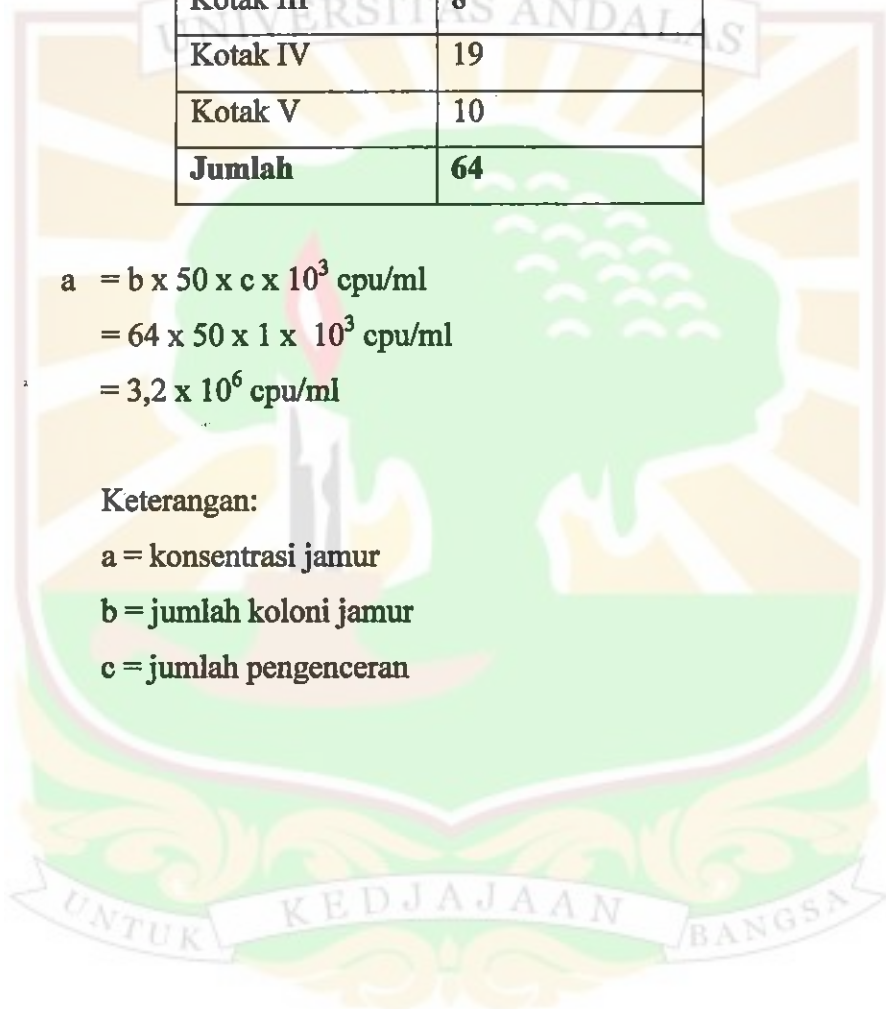
$$\begin{aligned} a &= b \times 50 \times c \times 10^3 \text{ cpu/ml} \\ &= 64 \times 50 \times 1 \times 10^3 \text{ cpu/ml} \\ &= 3,2 \times 10^6 \text{ cpu/ml} \end{aligned}$$

Keterangan:

a = konsentrasi jamur

b = jumlah koloni jamur

c = jumlah pengenceran



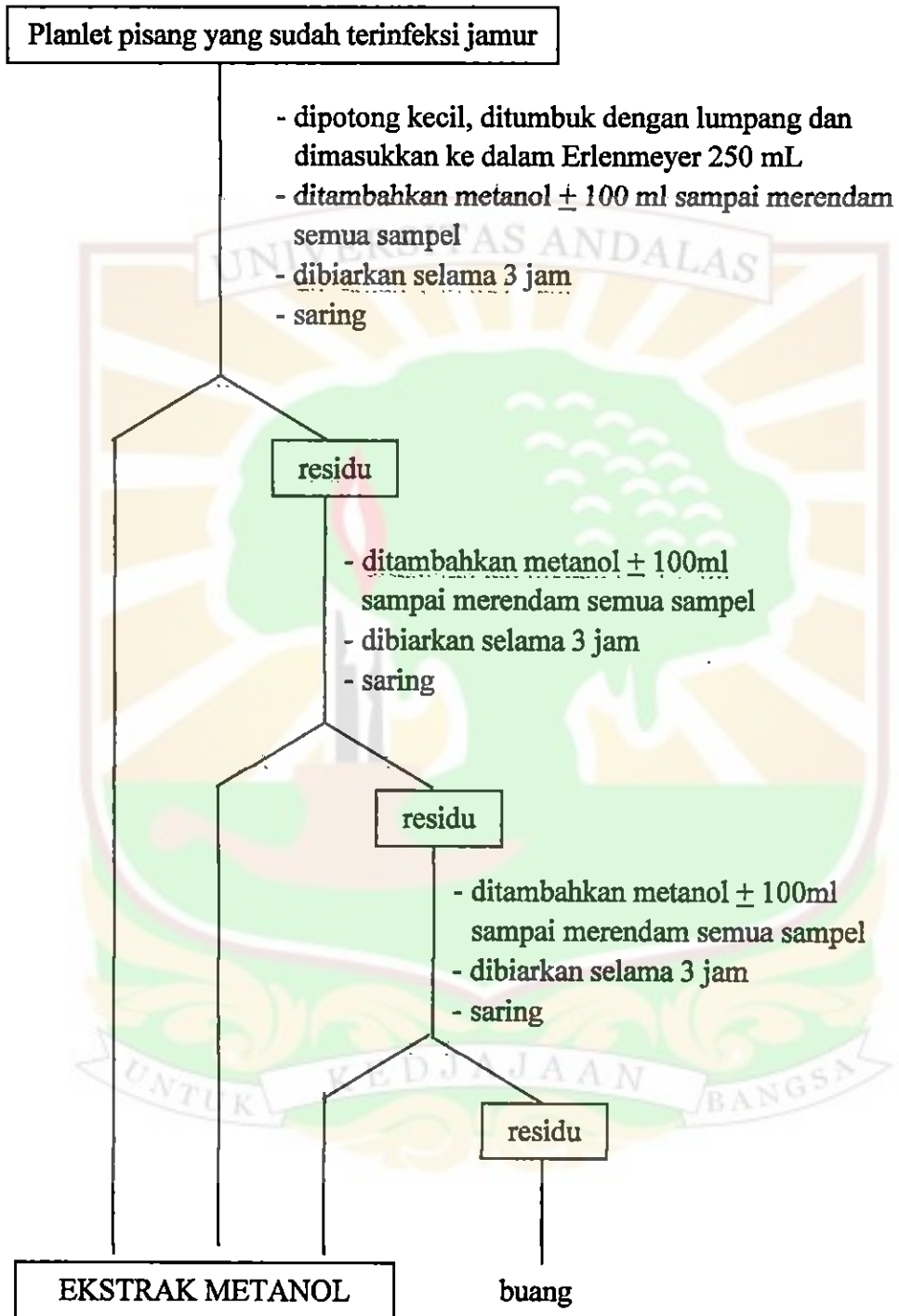
LAMPIRAN II
KOMPOSISI MEDIA MS

Tabel Data komposisi media MS

KODE	ZAT KIMIA	LARUTAN STOK (/1000 mL)	YANG DIPIPET (/mL)
A : 102	NH ₄ NO ₃	82	20
B	KNO ₃	95	20
C	H ₃ BO ₃	0,310	0,155
	KH ₂ PO ₄	8,5	9,25
	KI	0,092	0,021
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,013	0,065
	CaCl ₂ .6H ₂ O	0,002	0,001
	CaCl ₂ .2H ₂ O	1,115	5,5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	1,15	0,55
	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5	9,25
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,430	0,215
	D	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,00125
E	FeSO ₄ .7H ₂ O	1,3975	0,348
	Na ₂ EDTA	1,8625	0,466
	MYOINOSITOL	5	1,25
	TIAMIN HCl	0,005	0,001
F	NICOTINICACID	0,025	0,006
	PRIDOKSIN HCl	0,025	0,06
G	GLYCINE	0,10	0,025
H	SUKROSA	30	
	AGAR	4	
	NAA	0,032	
	BAP	0,016	

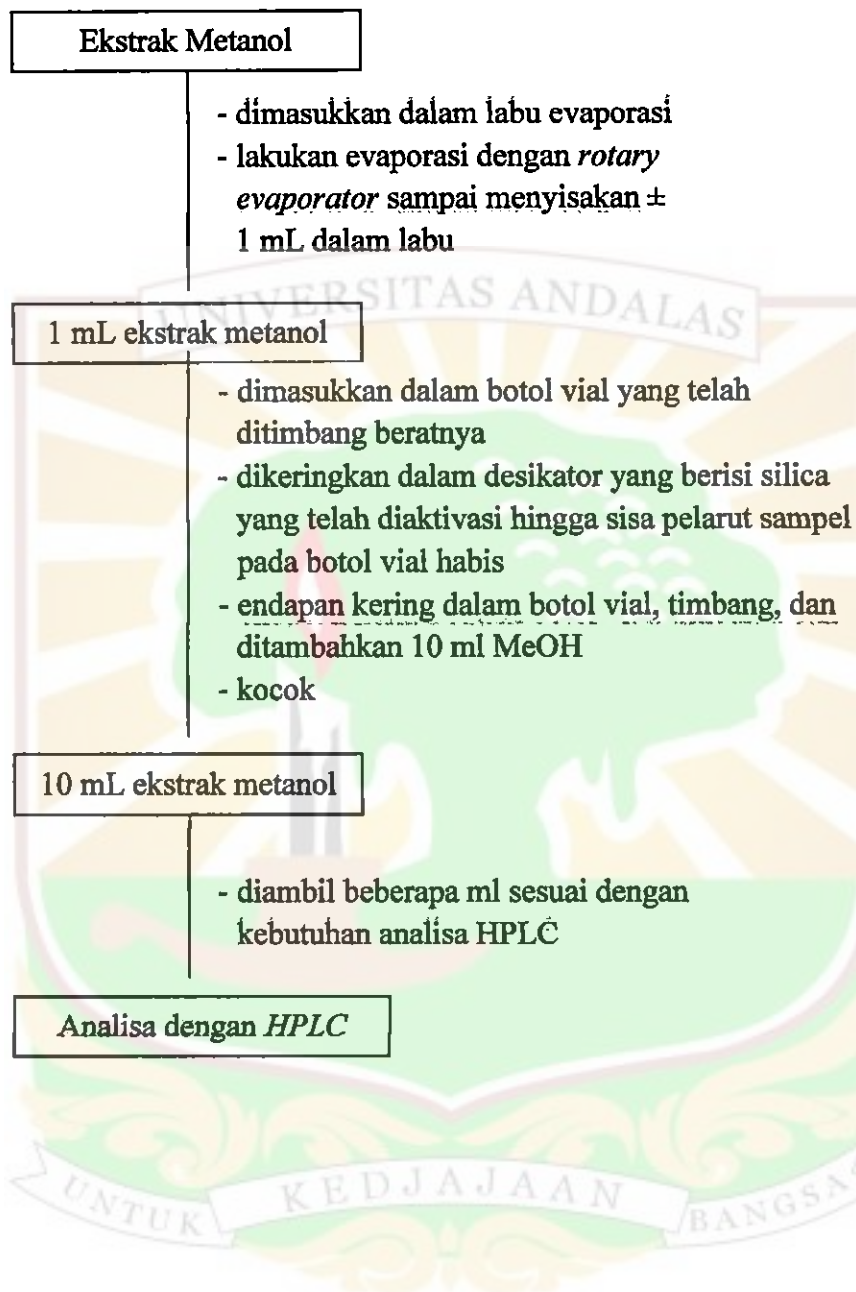
LAMPIRAN III

SKEMA KERJA EKSTRAKSI SAMPEL DENGAN METANOL



LAMPIRAN IV

SKEMA KERJA EVAPORASI PELARUT METANOL



LAMPIRAN V

DATA KALIBRASI STANDAR BOVINE SERUM ALBUMIN (BSA)

Tabel Data kalibrasi standar BSA untuk uji protein

Konsentrasi (X) mg/L	Absorban (Y)	XY	X ²
0	0.0	0	0
200	0.286	57.4	40000
400	0.510	204	160000
600	0.630	322.8	360000
800	0.903	722.4	640000
1000	1.079	1079	1000000
$\Sigma = 3000$	$\Sigma = 3.316$	$\Sigma = 2385.4$	$\Sigma = 22000000$

Persamaan Regresi

$$Y = A + BX$$

$$B = \frac{n \sum XY - (\sum X)(\sum Y)}{n \sum X^2 - (\sum X)^2}$$

$$= \frac{6 (2385.4) - (3000)(3.316)}{6 (2200000) - (9000000)^2}$$

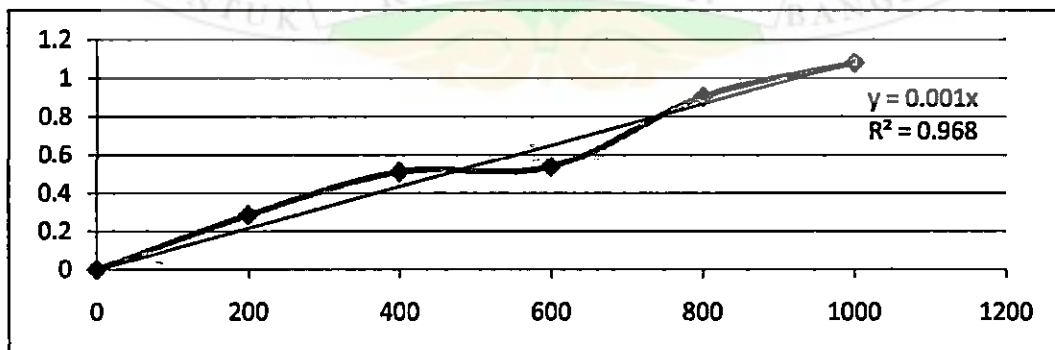
$$= 1,0 \times 10^{-3}$$

$$A = Y - BX$$

$$= 0.5527 - (1.0 \times 10^{-3})(500)$$

$$= 0.0527$$

Jadi persamaan regresinya adalah $Y = 0.0527 + 1.0 \times 10^{-3}X$



Gambar Kurva Standar Bovine Serume Albumin

LAMPIRAN VI
PERHITUNGAN KADAR PROTEIN

Tabel Data nilai kadar protein

Variabel	A1	A2	A rata-rata	Kadar protein (mg/mL)
0 jam Kontrol	1.422	1.422	1.422	1.369
12 jam	1.273	1.324	1.2985	1.246
24 jam	1.297	1.328	1.3125	1.259
36 jam	1.391	1.369	1.38	1.327
48 jam	1.392	1.35	1.371	1.318

Kadar protein enzim ditentukan dengan metoda Bradford. Kadar protein enzim diperoleh dengan menggunakan kurva kalibrasi standar BSA , $y = 0.0527 + 1.0 \times 10^{-3}x$ sebagai berikut :

$$y = A + Bx, y = \text{adsorban dan } x = \text{kadar protein}$$

a. Kadar protein 0 jam:

$$1.422 = 0.0527 + 1 \times 10^{-3} x$$

$$x = 1379 \text{ g/mL} = 1.369 \text{ mg/mL}$$

b. Kadar protein 12 jam:

$$1.299 = 0.0527 + 1 \times 10^{-3} x$$

$$x = 1246 \text{ g/mL} = 1.246 \text{ mg/mL}$$

c. Kadar protein 24 jam:

$$1.312 = 0.0527 + 1 \times 10^{-3} x$$

$$x = 1259 \text{ g/mL} = 1.259 \text{ mg/mL}$$

d. Kadar protein 36 jam:

$$1.380 = 0.0527 + 1 \times 10^{-3} x$$

$$x = 1327 \text{ g/mL} = 1.327 \text{ mg/mL}$$

e. Kadar protein 48 jam:

$$1.371 = 0.0527 + 1 \times 10^{-3} x$$

$$x = 1318 \text{ g/mL} = 1.318 \text{ mg/mL}$$

LAMPIRAN VII
PERHITUNGAN REAGEN UJI ENZIM PAL, AKTIVITAS ENZIM PAL
DAN AKTIVITAS SPESIFIK ENZIM PAL

Tabel Reagen-reagen pada reaksi enzimatis PAL dan substrat L-Phenylalanine ^[15]

Reagen	Tes Sampel	Tes Blanko
Reagen B (Phenylalanine)	2.0 mL	2.0 mL
Aquabidest	0.9 mL	0.9 mL
Reagen C (Enzim PAL)	0.1 mL	
Reagen A (Buffer Tris-HCl)		0.1 mL
Total Reagen	3.0 mL	3.0 mL

Tabel Data uji aktivitas enzim menggunakan spektrofotometer UV (270 nm)

Variasi Waktu	Adsorban	Adsorban Rata-Rata
0 Jam (Standar)	0.693	0.7
	0.708	
12 Jam	0.283	0.279
	0.275	
24 Jam	0.325	0.325
	0.325	
36 Jam	0.408	0.407
	0.406	
48 Jam	0.405	0.4
	0.395	

Tabel Data nilai aktivitas dan aktivitas spesifik enzim PAL

Waktu Perlakuan	Aktevitas enzim PAL (u/mL)	Aktivitas spesifik enzim (u/mL)
0 (kontrol)	0.212	0.155
12 jam	0.084	0.067
24 jam	0.098	0.078
36 jam	0.124	0.093
48 jam	0.122	0.092

- **Pembuatan Buffer Tris-HCl (1 M) (reagen A)**

Pembuatan Buffer Tris-HCl 0.15 M, (7.57 g Buffer dalam 50 mL (1M))

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$x \cdot 1 \text{ M} = 0.15 \text{ M} \cdot 50 \text{ mL}$$

$$x = 7.57 \text{ mL}$$

Pembuatan HCl 1 M dari HCl 12 M untuk menaikkan pH buffer

$$M1 \cdot V1 = M2 \cdot V2$$

$$1 \text{ M} \cdot 50 \text{ mL} = 12 \text{ M} \cdot x$$

$$x = 4.167 \text{ mL HCl 12 M}$$

- **Pembuatan Larutan L-Phenylalanine 3 mM (reagen B)**

Penentuan Massa L-Phenylalanine

$$M = \frac{g}{Mr} \times \frac{1000 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$$

$$0.003 \text{ M} = \frac{x}{165.2 \text{ g/mol}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{100 \text{ mL}}$$

$$x = 0.049 \text{ gram dalam 100 mL}$$

Penentuan Volume L-Phenylalanine

$$M = \frac{\text{mol}}{L} = 0.003 \text{ M} = \frac{0.003 \text{ mol}}{L}$$

Volume = 1 mL (1 mL Reagen B dilarutkan di dalam 25 mL Reagen A)

Perhitungan aktivitas enzim:

$$\frac{\text{Unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{(\Delta A_{270 \text{ nm sampel}} - \Delta A_{270 \text{ nm blanko}})}{\text{menit reaksi}} \cdot \frac{(6)(df)}{(19.73)(0.1)}$$

Keterangan:

1. 6 = total Volume Reaksi
2. df = Faktor pengenceran (1)
3. 19.73 = Koefisien milimolar dari transsinamat

a. Aktivitas enzim 0 jam (kontrol)

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{\frac{0.700}{5} - \frac{0}{5} (3)(1)}{(19.73)(0.1)} = 0.212 \text{ unit/mL}$$

b. Aktivitas enzim 12 jam

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{\frac{0.279}{5} - \frac{0}{5} (3)(1)}{(19.73)(0.1)} = 0.084 \text{ unit/mL}$$

c. Aktivitas enzim 24 jam

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{\frac{0.325}{5} - \frac{0}{5} (3)(1)}{(19.73)(0.1)} = 0.098 \text{ unit/mL}$$

d. Aktivitas enzim 36 jam

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{\frac{0.407}{5} - \frac{0}{5} (3)(1)}{(19.73)(0.1)} = 0.124 \text{ unit/mL}$$

e. Aktivitas enzim 48 jam

$$\frac{\text{unit}}{\text{mL}} \text{ enzim} = \frac{\frac{0.400}{5} - \frac{0}{5} (3)(1)}{(19.73)(0.1)} = 0.122 \text{ unit/mL}$$

Perhitungan aktivitas spesifik enzim PAL:

$$\text{Aktivitas spesifik enzim} = \frac{\text{aktivitas enzim PAL}}{\text{kadar protein}}$$

a. Aktivitas spesifik kontrol

$$\frac{0.212}{1.369} = 0.155$$

b. Aktivitas spesifik setelah 12 jam

$$\frac{0.084}{1.246} = 0.067$$

c. Aktivitas spesifik setelah 24 jam

$$\frac{0.098}{1.259} = 0.078$$

d. Aktivitas spesifik setelah 36 jam

$$\frac{0.124}{1.327} = 0.093$$

e. Aktivitas spesifik setelah 48 jam

$$\frac{0.122}{1.138} = 0.092$$

LAMPIRAN VIII
PERHITUNGAN VOLUME EKSTRAK METANOL

Tabel Data massa ekstrak metanol kontrol dan sampel

Sampel	Massa
0 jam (kontrol)	0.047 g
12 jam	0.121 g
24 jam	0.097 g
36 jam	0.045 g
48 jam	0.088 g

a. Konsentrasi kontrol (0 jam):

$$\frac{47 \text{ mg}}{0.01 \text{ L}} = 4700 \text{ ppm}$$

Volume ekstrak yang diambil:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$4700 \text{ ppm} \cdot x = 150 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$x = 0.32 \text{ mL}$$

b. Konsentrasi sampel 12 jam:

$$\frac{121 \text{ mg}}{0.01 \text{ L}} = 12100 \text{ ppm}$$

Volume ekstrak yang diambil:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$12100 \text{ ppm} \cdot x = 150 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$x = 0.124 \text{ mL}$$

c. Konsentrasi sampel 24 jam:

$$\frac{97 \text{ mg}}{0.01 \text{ L}} = 9700 \text{ ppm}$$

Volume ekstrak yang diambil:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$9700 \text{ ppm} \cdot x = 150 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$x = 0.155 \text{ mL}$$

d. Konsentrasi sampel 36 jam:

$$\frac{45 \text{ mg}}{0.01 \text{ L}} = 4500 \text{ ppm}$$

Volume ekstrak yang diambil:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$4500 \text{ ppm} \cdot x = 150 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

$$x = 0.33 \text{ mL}$$

e. Konsentrasi sampel 48 jam:

$$\frac{88 \text{ mg}}{0.01 \text{ L}} = 8800 \text{ ppm}$$

Volume ekstrak yang diambil:

$$M1.V1 = M2.V2$$

$$8800 \text{ ppm} \cdot x = 150 \text{ ppm} \cdot 10 \text{ mL}$$

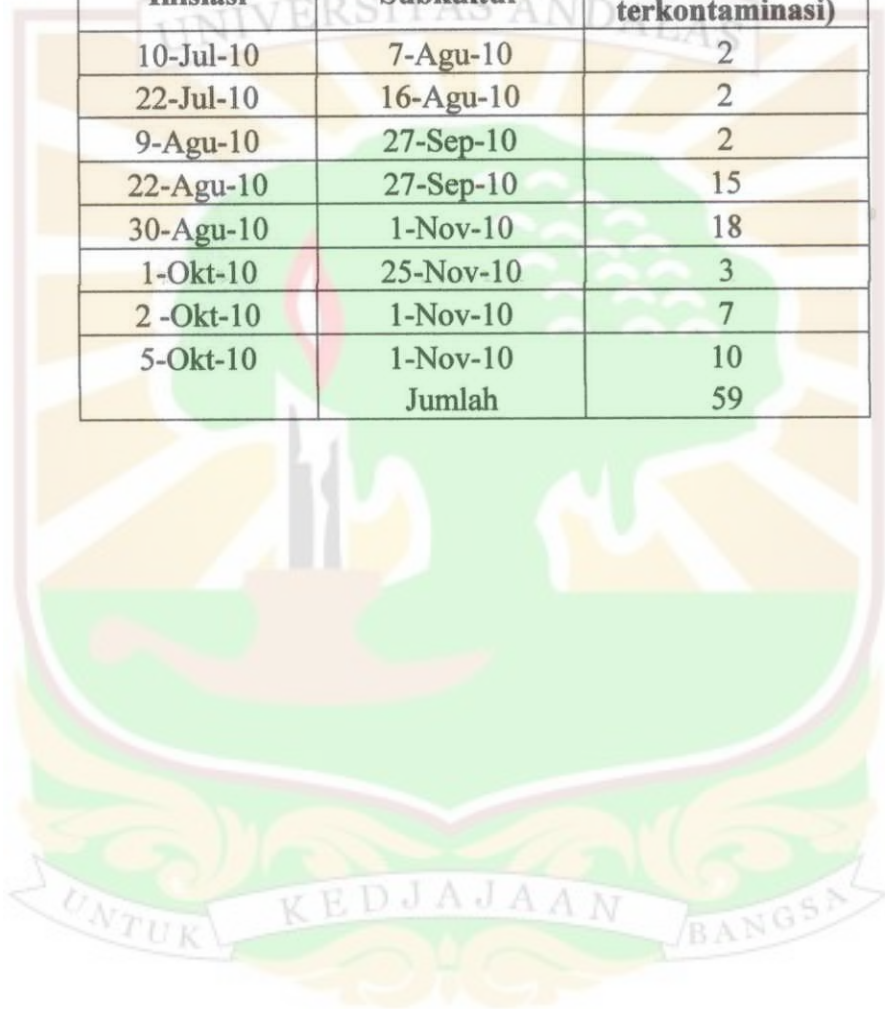
$$x = 0.17 \text{ mL}$$



LAMPIRAN IX
DATA DAN HASIL KULTUR JARINGAN PISANG KEPOK

Tabel 4.1 Data hasil kultur jaringan pisang kepok

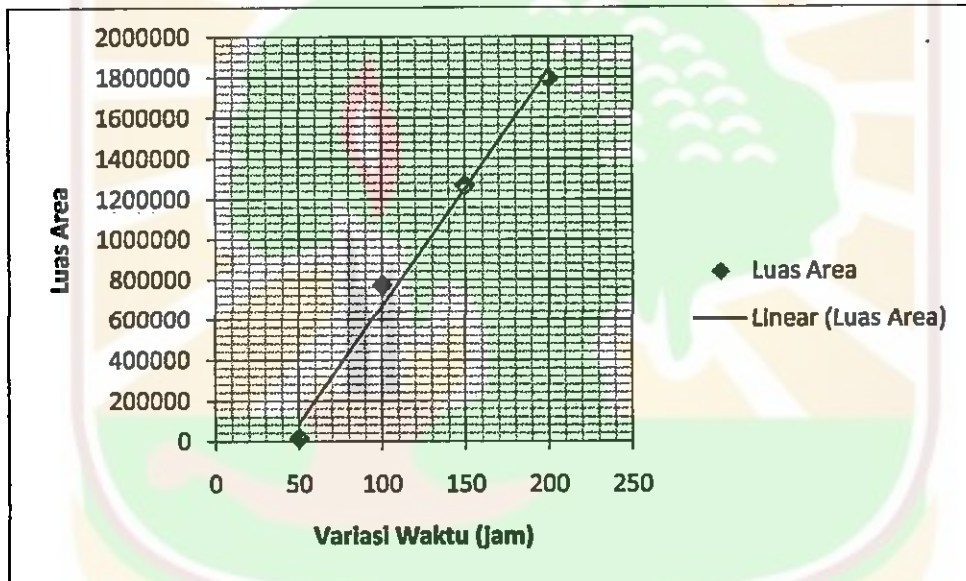
Tanggal Inisiasi	Tanggal Subkultur	Jumlah Eksplan (yang tidak terkontaminasi)
10-Jul-10	7-Agu-10	2
22-Jul-10	16-Agu-10	2
9-Agu-10	27-Sep-10	2
22-Agu-10	27-Sep-10	15
30-Agu-10	1-Nov-10	18
1-Okt-10	25-Nov-10	3
2 -Okt-10	1-Nov-10	7
5-Okt-10	1-Nov-10	10
	Jumlah	59



LAMPIRAN X
DATA HASIL KROMATOGRAM UJI HPLC

Tabel Data konsentrasi dan luas area standar asam salisilat pada uji HPLC

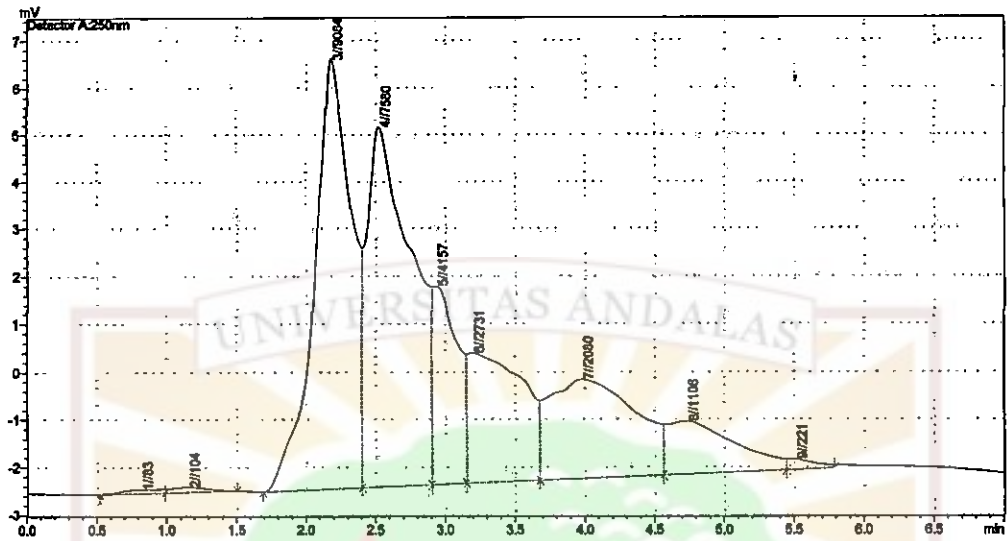
Konsentrasi	Luas Area
50 ppm	14804
100 ppm	773322
150 ppm	1268101
200 ppm	1793822



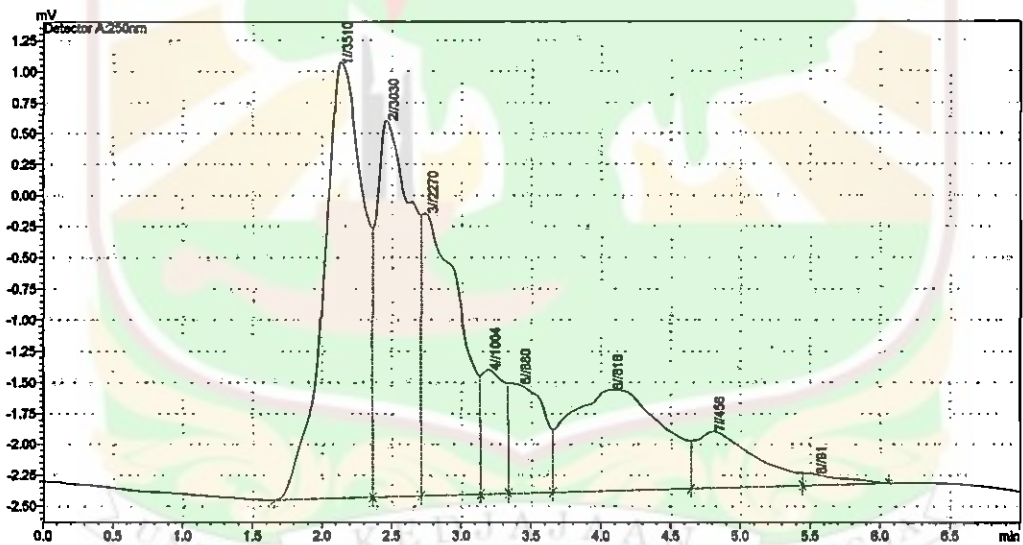
Gambar Kurva Kalibrasi standar asam salisilat pada uji HPLC

Tabel Data luas area puncak kontrol dan sampel pisang kepok

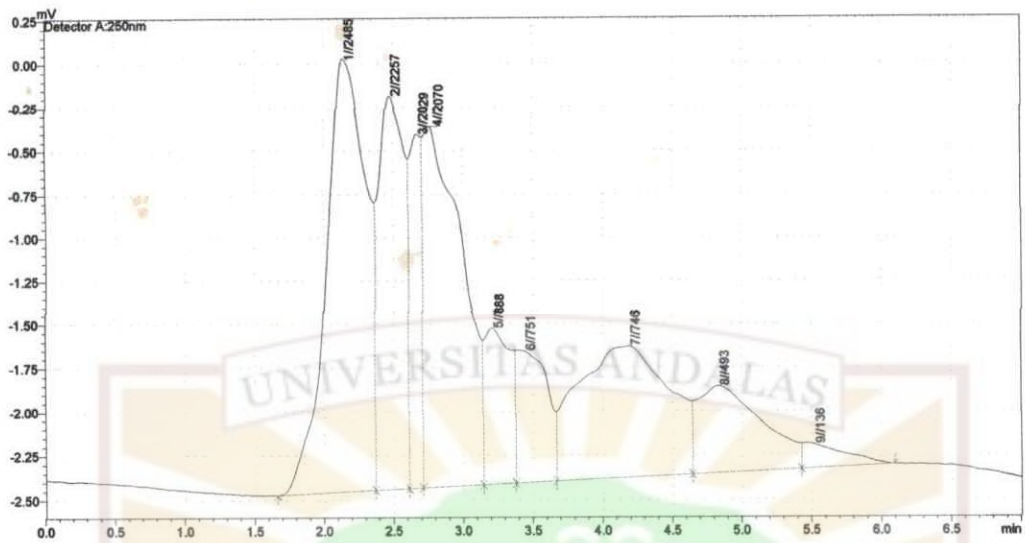
Waktu Perlakuan	Luas Area
0 jam	77266
12 jam	169056
24 jam	70406
36 jam	50288
48 jam	43469



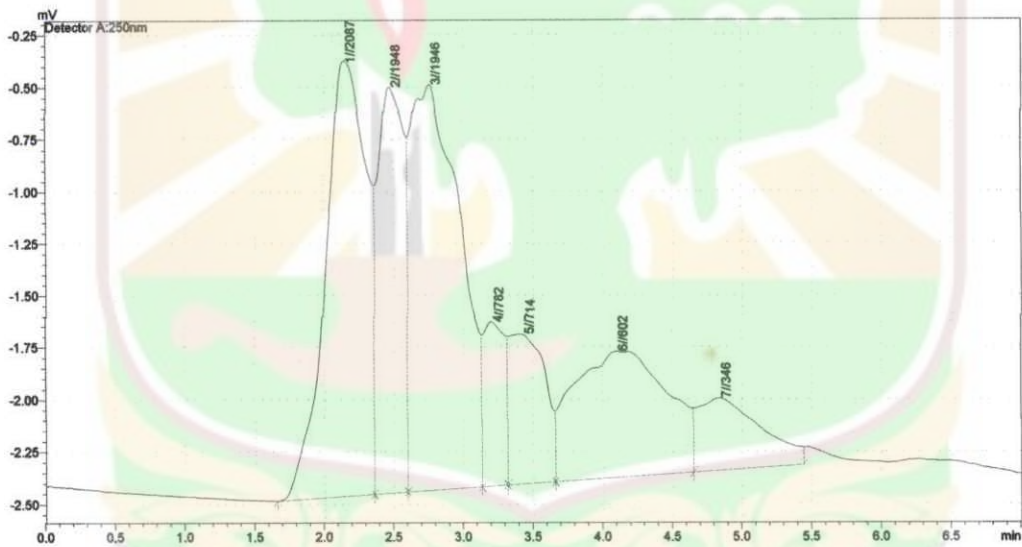
Gambar kromatogram HPLC sampel 12 jam setelah infeksi



Gambar kromatogram HPLC sampel 24 jam setelah infeksi



Gambar kromatogram HPLC sampel 36 jam setelah infeksi



Gambar kromatogram HPLC sampel 48 jam setelah infeksi