

PATOGENESIS HAWAR DAUN BIBIT *PINUS MERKUSII* YANG DISEBABKAN OLEH *PESTALOTIA THEAE* DI PESEMAIAN

Sutarman¹, Soetrisno Hadi², Ani Suryani², Achmad², Asep Saefuddin²

ABSTRACT

Pathogenesis of Needle Blight of Pinus merkusii Seedlings Incited by Pestalotia theae in The Nursery. The objectives of the study were to clarify the mechanism by which *Pestalotia theae* incites the disease and the defense mechanism of the pine seedling against the attack by the pathogen. The germination tube, 2.9 μ m in diameter, produced by the germinating conidiospore penetrated the leaf cells via the stomata, which were wider in diameter. The pathogen was able to produce pectinolytic and cellulolytic enzymes required for the degrading of the host cell wall components. The epidermis was covered by a thick cuticulae layer. The activity of the peroxidase reduced in the cotyledon, the primary leaf and in the secondary leaf decreased, when the seedlings were 1-2, 2-3, and >3 month old.

Key words: *Pinus merkusii*, needle blight, *Pestalotia theae*, symptom, pathogenesis, defense mechanism

PENDAHULUAN

Mekanisme serangan patogen *Pestalotia theae* dan mekanisme pertahanan bibit *Pinus merkusii* terhadap patogen penyebab penyakit Hawar Daun bibit *P. merkusii* tersebut di pesemaian di Indonesia relatif belum banyak terungkap, meskipun dampak penyakit tersebut sudah mulai dirasakan oleh pengelola pesemaian di wilayah kerja Perum Perhutani khususnya di Jawa Barat dan Jawa Tengah.

Pestalotia spp. yang menyerang kelapa, teh, dan beberapa jenis tanaman lainnya pada umumnya menginfeksi melalui luka atau lubang alami (Semangun, 2000). Proses infeksi yang terjadi pada daun bibit pinus, sebagaimana dikemukakan Agrios (1997), menunjukkan bahwa patogen ini mampu melakukan penetrasi ke dalam sel inang. Pada fase tersebut jamur harus mempenetrasi dinding sel yang mengandung senyawa selulosa dan pektin dalam rangka pengambilan nutrisi bagi kebutuhan hidupnya (Graffin, 1993). Untuk itu diperlukan enzim-enzim selulolitik dan pektinolitik yang dihasilkan jamur untuk mendegradasi selulosa dan pektin (Goodman dkk., 1986). Proses hidrolisis pektin di lamela tengah mengakibatkan degradasi jaringan pada tepi *lesio* (Barmore dkk., 1984). Menurut Bailey dan Pessa (1990) enzim yang bekerja pada bahan pektik sebagai polisakarida struktural di lamela tengah dan dinding sel primer tanaman tingkat tinggi ini dihasilkan oleh banyak jenis mikroorganisme.

Gejala penyakit pada bibit *P. merkusii* dimulai pada kotiledon pada bibit yang berumur

sekitar 2 bulan, diikuti oleh daun pertama pada umur 2-3 bulan, kemudian daun jarum pada umur 3-4 bulan (Sutarman dkk., 2001). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan perkembangan gejala di antara komponen tajuk bibit pinus pada umumnya yang sekaligus, sebagaimana dikemukakan Mirov (1967), sebagai akibat adanya perbedaan metabolit sejalan dengan perbedaan umur dan pertumbuhan daun bibit pinus. Pada pertumbuhan komponen tajuk yang berbeda, diduga adanya perbedaan dalam metabolisme lanjut senyawa fenolik yang berperan dalam mekanisme pertahanan bibit. Melalui peran aktivitas polifenoloksidase, senyawa-senyawa fenolik tersebut akan dioksidasi menjadi senyawa yang lebih berbahaya bagi patogen (Martyn dkk., 1979; Agrios, 1997). Peroksidase berperan dalam pengoksidasian senyawa fenolik dan metabolit lain dalam rangka penyusunan komponen dinding sel (Ebermann & Lickl, 1985). Hasil penelitian Achmad (1996) menunjukkan adanya kecenderungan perbedaan dan/atau penurunan aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase bibit pinus dari umur 1 bulan sampai umur 2 bulan. Di lain pihak hasil penelitiannya juga menunjukkan adanya peningkatan ketahanan bibit terhadap serangan patogen lodoh dari umur 0 sampai 8 minggu setelah penaburan benih sejalan dengan peningkatan kandungan lignin jaringan hipokotil.

Penelitian ini bertujuan untuk: (a) mengetahui mekanisme serangan patogen melalui pengamatan perkecambahan konidiospora dan pengujian aktivitas enzim-enzim selulolitik dan pektinolitik yang dihasilkan oleh patogen, serta (b) mengetahui mekanisme pertahanan oleh bibit *P. merkusii* terhadap serangan patogen melalui pengamatan struktur anatomi jaringan daun, percobaan respons bibit umur rawan (periode penyerangan) dan pengujian aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase.

¹ Dosen Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Malang, Jl. Soekarno-Hatta, Malang

² Dosen Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga Bogor

METODE PENELITIAN

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Hutan dan Rumah Kaca Pusat Penelitian dan Pengembangan dan Konservasi Alam Bogor, Laboratorium Rekayasa Bioproses PAU Bioteknologi IPB, dan Laboratorium Mikoriza dan Sitologi Museum Etnobotani LIPI Bogor, mulai September 2001 sampai Juli 2002. Hubungan antara beberapa jenis percobaan yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 1.

Perkecambahan konidiospora

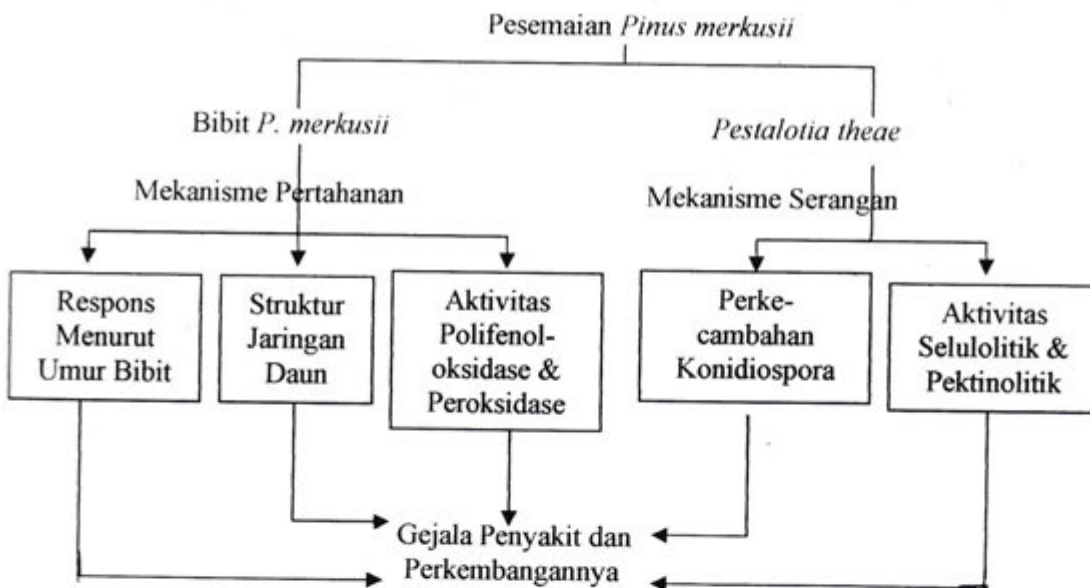
Waktu perkecambahan konidiospora dipelajari dengan mengamati konidiospora yang ditempatkan pada gelas obyek cekung yang sudah diberi media Pachlewsky cair (tanpa agar) yang kemudian diinkubasi pada suhu kamar. Pengamatan perkecambahan dilakukan tiap jam selama 12 jam.

Aktivitas enzim penghidrolisis komponen dinding sel daun

Pada penelitian ini dianalisis aktivitas enzim-enzim selulolitik dan pektinolitik yang masing-masing

diwakili oleh aktivitas FP-ase ("Filter Paper"-ase) dan aktivitas galakturonase. Penentuan aktivitas kedua macam enzim tersebut masing-masing didasarkan pada banyaknya hasil hidrolisis selulosa dan pectin, yaitu masing-masing adalah glukosa dan asam galakturonat dengan prosedur yang digunakan Atlas (1993). Enzim diekstrak dari media tempat isolat patogen dibiakkan. Tiga macam media yang digunakan adalah Pachlewsky, CMS, serta CMS yang diberi potongan daun ($\pm 0,5$ cm). Sebelum digunakan media disterilkan dalam otoklaf (121°C , 1 atmosfer) selama 30 menit, sedang sterilisasi permukaan daun bibit *P. merkusii* dilakukan dengan cara merendam daun dalam alkohol 90% selama 3 detik dan kemudian membilasnya dengan air steril tiga kali.

Isolat patogen dibiakkan pada ketiga macam media yang disediakan untuk percobaan ini; untuk kontrol digunakan ketiga macam media yang sama, tanpa pertumbuhan patogen. Dengan demikian diperoleh 6 macam perlakuan. Selanjutnya keenam perlakuan tersebut disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan dua ulangan.



Gambar 1. Bagan alir tahap-tahap kegiatan penelitian Patogen dan Gejala Penyakit serta Patogenesis

- : penelitian rumah kaca dan/atau laboratorium
 → : pengaruh langsung dan/atau hasil/keluaran

Tabel 1. Umur bibit dan macam daun bibit *P. merkusii* yang diuji aktivitas enzim selulolitik dan pektinolitiknya

Umur bibit (BSP)	Macam daun yang diuji aktivitas enzimnya	
	Kedaaan Bibit Sehat	Kedaaan Bibit Sakit
0 ¹⁾	Kotiledon	----
1	Kotiledon dan epikotil ²⁾	Kotiledon
2	Kotiledon, daun tunggal, daun jarum	Kotiledon
3	Kotiledon, daun tunggal, daun jarum	Kotiledon dan daun tunggal
4	Kotiledon, daun tunggal, daun jarum	Kotiledon, daun tunggal, daun jarum
5	Daun tunggal dan daun jarum	Kotiledon, daun tunggal, daun jarum

¹⁾ Umur 0 bulan setelah penyapihan (BSP) adalah saat bibit akan dilakukan penyapihan atau bibit berumur 2 minggu setelah penaburan

²⁾ Merupakan campuran bakal daun tunggal dan bakal daun jarum.

Respons bibit terhadap serangan patogen

Percobaan dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemungkinan adanya perbedaan respons bibit pada berbagai umur, yaitu 1 sampai 4 bulan sesudah penyapihan (BSP), terhadap infeksi oleh patogen. Respons yang diamati adalah gejala penyakit dan perkembangannya. Bibit yang sehat diinkubasi di rumah plastik selama 2 minggu dan dilindungi dengan fungisida Dithane M-45 dari gangguan patogen. Bibit yang berumur 1, 2, 3, dan 4 bulan diinokulasi dengan kondiospora patogen yang kemudian diinkubasi selama 4 minggu. Percobaan faktor tunggal dengan 4 taraf umur bibit ini disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 ulangan. Satu satuan percobaan terdiri atas 20 bibit *P. merkusii*. Untuk menunjukkan perbedaan respons dalam bentuk gejala, maka Indeks Penyakit ditentukan tiap minggu selama 4 minggu.

Indeks Penyakit terhadap bibit yang diuji tiap minggu dilakukan dengan menggunakan rumus dan penetapan skor dengan kriteria gejala seperti yang digunakan Sutarman dkk. (2003).

Struktur anatomi daun *P. merkusii*

Pengamatan dilakukan terhadap struktur anatomi daun dengan titik berat pada bagian tempat masuk patogen ke dalam jaringan daun seperti stomata dan komponen struktural daun lainnya yang dapat berfungsi untuk pertahanan mekanik. Untuk mengamati struktur anatomi daun, terlebih dahulu dibuat irisan melintang daun bibit pada umur sekitar 2-3 bulan dengan prosedur Sass (1958).

Aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase

Berdasarkan penelitian pendahuluan selama 1-4 BSP, bibit berada dalam kondisi yang rentan terhadap penyakit. Oleh karena itu pengujian terhadap aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase dilakukan untuk bibit sejak saat penyapihan sampai 5 BSP, yaitu masa kotiledon sehat relatif sudah tidak dijumpai lagi. Pengujian dilakukan terhadap aktivitas kedua macam enzim tersebut (Srivastava, 1987) yang diperoleh dari kotiledon, daun tunggal, dan dari daun jarum bibit *P. merkusii* baik yang sehat maupun yang sakit. Secara keseluruhan diperoleh tiga komponen tajuk (kotiledon, daun pertama, dan daun jarum) dengan keadaan yang berbeda yaitu: umur bibit dan komponen tajuk bibit serta keadaan daun yaitu yang sehat dan sakit yang aktivitas kedua macam enzimnya diuji, seperti tertera pada Tabel 1.

Adapun untuk penentuan sampel yang diuji, mula-mula dipilih secara acak kelompok bibit (dalam rak) untuk tiap kelompok umur (0, 1, 2, 3, 4, dan 5 bulan) dan dari tiap kelompok umur bibit dipisahkan antara bibit sakit (skor 0) dan yang sehat (skor 1) berdasarkan kriteria penentuan gejala seperti yang digunakan Sutarman dkk. (2003).

Seperti tertera pada Tabel 1, maka diperoleh 24 macam perlakuan. Selanjutnya perlakuan tersebut disusun dalam suatu percobaan faktor tunggal dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang diulang sebanyak dua kali.

Tabel 2. Kadar glukosa dan aktivitas poligalakturonase yang dihasilkan dalam filtrat biakan *P. theae* pada beberapa macam media

Media	Kadar Glukosa (mg/l)	Aktivitas poligalakturonase ($\mu\text{mol/g}$)
Pachlewsky	0,5306 \pm 0,0030	0,8687 \pm 0,1695
<i>Pestalotia</i> -Pachlewsky	0,4200 \pm 0,0030	0,8863 \pm 0,0847
CMS	0,4519 \pm 0,0060	1,5914 \pm 0,0648
<i>Pestalotia</i> -CMS	0,4530 \pm 0,0045	1,6055 \pm 0,4936
CMS- <i>P. merkusii</i>	0,5668 \pm 0,1565	1,3834 \pm 0,3690
<i>Pestalotia</i> -CMS- <i>P. merkusii</i>	0,6466 \pm 0,0196	1,5209 \pm 0,4238

HASIL DAN PEMBAHASAN

Perkecambahan konidiospora

Dari inkubasi pada media Pachlewsky cair selama 12 jam pada suhu kamar, dapat diketahui tahap-tahap proses perkecambahan konidiospora, dengan rata-rata diameter tabung kecambahnya sebesar 2,88 μm (\pm 0,59 μm), sebagai berikut:

- Persiapan perkecambahan selama 4 jam masa inkubasi (JMI) pertama; sesudah 4 JMI sel keempat (atau 2 sel sesudah pedisel) agak menggelembung dan menjadi makin transparan;
- Permulaan terbentuknya tabung kecambah yang terjadi selama 4-5 JMI yaitu berupa tonjolan pada salah satu atau kedua sisi sel keempat tersebut dengan panjang tabung kecambah 5,95 μm \pm 1,36 μm pada 5 JMI;
- Pertumbuhan dan percabangan tabung kecambah yang dimulai sekitar 6 JMI dengan panjang tabung kecambah pada 6, 8, 10, dan 12 JMI masing-masing adalah 8,43 μm \pm 2,22 μm ; 12,40 μm \pm 4,64 μm ; 32,74 μm \pm 16,02 μm ; dan 56,11 μm \pm 21,66 μm . Setelah 12 JMI, percabangan tabung kecambah membentuk anyaman hifa yang setelah 24 JMI menjadi kompleks jalinannya.

Hubungan pertumbuhan panjang tabung kecambah konidiospora *P. theae* tersebut dengan waktu yaitu dari 5 sampai 12 jam lama inkubasi ini, dapat dinyatakan dalam persamaan regresi (1):

$$Y = 59,24 - 18,16X + 1,55X^2 \quad (R^2 = 99,7\%) \quad (1)$$

dengan Y = panjang tabung kecambah,

X = masa inkubasi (selama 5-12 jam)

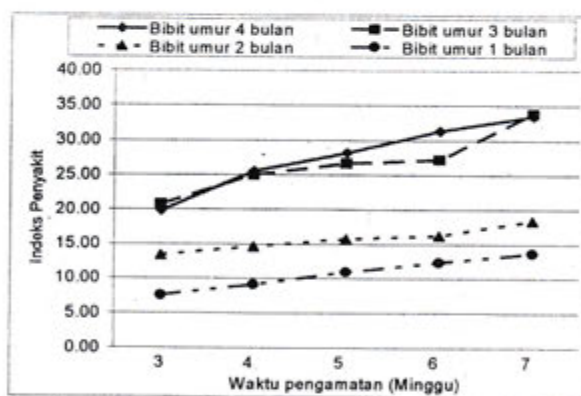
Aktivitas enzim penghidrolisis komponen dinding sel daun

Berdasarkan hasil analisis ragam (taraf 5 %) diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan baik dalam aktivitas "filter paper-ase" maupun aktivitas poligalakturonase yang dihasilkan oleh *P. theae* pada media tumbuh yang berbeda.

Rerata hasil pengujian aktivitas "filter paper-ase" dan poligalakturonase yang dihasilkan oleh *P. theae* tersebut disajikan pada Tabel 2.

Respons bibit umur awal terhadap serangan patogen

Perkembangan Indeks Penyakit pada berbagai umur bibit dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Indeks Penyakit bibit *P. merkusii* berumur 1, 2, 3, dan 4 bulan yang terserang *P. theae* 3 sampai 7 minggu setelah inokulasi (MSI)

Sejak awal pengamatan terdapat perbedaan yang nyata dalam Indeks Penyakit antara bibit berumur 3 dan 4 bulan dan bibit berumur 1 dan 2

Tabel 3. Ukuran lubang stomata kotiledon, daun pertama, dan daun jarum bibit *P. merkusii* berumur 2-3 bulan setelah penyapihan

Komponen tajuk	Panjang lubang stomata	Lebar lubang stomata
Kotiledon	21,70 $\mu\text{m} \pm 2,89 \mu\text{m}$	8,31 $\mu\text{m} \pm 1,21 \mu\text{m}$
Daun pertama	26,29 $\mu\text{m} \pm 1,36 \mu\text{m}$	10,18 $\mu\text{m} \pm 1,84 \mu\text{m}$
Daun jarum	23,81 $\mu\text{m} \pm 1,28 \mu\text{m}$	8,43 $\mu\text{m} \pm 1,28 \mu\text{m}$

bulan. Pada akhir pengamatan (7 MSI), Indeks Penyakit bibit berumur 3 dan 4 bulan masing-masing adalah 33,86 dan 33,48, yang menunjukkan bahwa bibit tersebut lebih rentan dibandingkan dengan bibit berumur 1 dan 2 bulan, yaitu dengan Indeks Penyakit berturut-turut sebesar 13,65 dan 18,42. Di lain pihak pada 3-7 MSI Indeks Penyakit bibit berumur 2 bulan sejak terdapat perbedaan nyata lebih besar dibandingkan dengan Indeks Penyakit bibit berumur 1 bulan. Hal ini menunjukkan bahwa bibit berumur 2 bulan lebih rentan dibandingkan dengan yang berumur 1 bulan.

Struktur anatomi daun bibit *P. merkusii*

Pada struktur anatomi kotiledon, daun pertama, dan daun jarum bibit *P. merkusii* umur 5 bulan setelah penyapihan, berdasarkan irisan melintang, terlihat bahwa dinding sel epidermis ketiga komponen tajuk tersebut tampak tebal. Di antara sel-sel mesofil daun dijumpai saluran resin, yang dikelilingi oleh sel-sel epitel. Jaringan pengangkut ganda yang masing-masing terdiri atas floem dan xylem, terletak di tengah-tengah. Potongan melintang kotiledon dan daun pertama membentuk bidang menyerupai segitiga, sedang daun jarum membulat. Pada ketiga macam komponen tajuk bibit *P. merkusii* ini tampak epidermis daun memiliki lapisan kutikula yang bervariasi ketebalannya pada ketiga komponen tajuk pada umur sekitar 3-5 bulan yaitu dari $2,8 \mu\text{m} \pm 0,27 \mu\text{m}$ sampai $5,4 \mu\text{m} \pm 0,55 \mu\text{m}$. Sel penutup stoma berada agak di bawah lapisan epidermis.

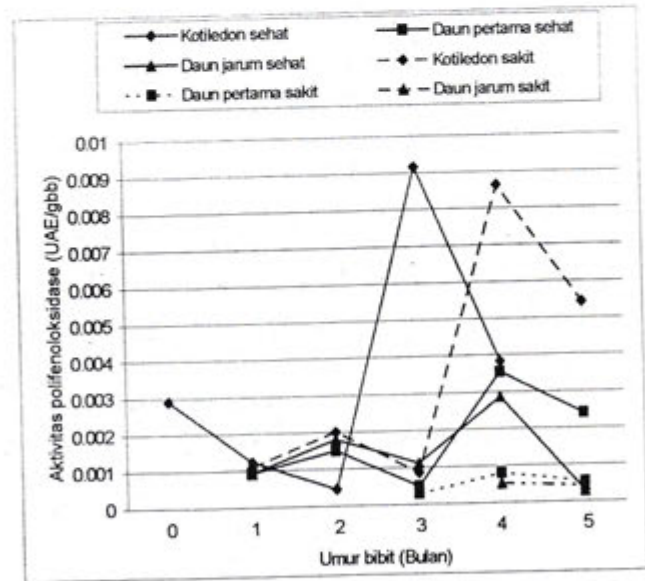
Adapun ukuran lubang stoma daun jarum, daun pertama, dan kotiledon bibit *P. merkusii* umur 2-3 bulan, yang merupakan umur rawan bagi bibit untuk mulai dapat terserang penyakit, dapat dilihat pada Tabel 3.

Aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase

Hasil analisis ragam menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan nyata antara aktivitas

polifenoloksidase dari berbagai macam daun, tetapi terdapat perbedaan yang nyata dalam aktivitas peroksidase antara daun dengan kondisi berbeda tersebut. Rerata aktivitas kedua macam enzim tersebut tertera pada Tabel 4, dan dengan pola aktivitas yang ditunjukkan pada Gambar 3 dan 4.

Aktivitas polifenoloksidase di antara ketiga macam daun dan di antara daun yang sehat dan yang sakit menunjukkan pola yang berbeda (Gambar 3). Hal serupa terjadi pada aktivitas peroksidase (Gambar 4). Terutama pada kotiledon, tampak adanya perbedaan respons bibit terhadap serangan patogen yang ditunjukkan oleh aktivitas peroksidase pada 1, 2, dan 4 BSP serta aktivitas polifenoloksidase pada 4 BSP yang relatif tinggi dibandingkan pada bibit sehat.



Gambar 3. Aktivitas polifenoloksidase dari kotiledon, daun pertama, dan daun jarum sehat dan sakit pada bibit *P. merkusii* berumur 0-5 bulan setelah penyapihan (BSP)

Tabel 4. Aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase dari berbagai komponen tajuk bibit *P. merkusii* pada umur 0-5 bulan setelah penyapihan (BSP)

Umur bibit (bulan)	Komponen tajuk	Aktivitas enzim (UAE/gbb)			
		Polifenoloksidase		Peroksidase ³⁾	
		Sehat	Sakit	Sehat	Sakit
0 ¹⁾	Kotiledon	0,002900	--- ²⁾	1,1600 abcde	---
1	Kotiledon	0,001225	0,001090	0,7300 bcdef	1,3267 abcd
	Epikotil	0,000925	---	0,5467 def	---
2	Kotiledon	0,000450	0,002000	1,4429 abc	1,7472 a
	Daun pertama	0,001490	---	0,7430 bcdef	---
	Daun jarum	0,001795	---	0,4489 def	---
3	Kotiledon	0,009155	0,000860	0,7940 bcdef	0,4667 def
	Daun pertama	0,000490	0,000285	0,3914 ef	0,4920 def
	Daun jarum	0,001115	---	0,5830 bcdef	---
4	Kotiledon	0,003830	0,008630	0,3720 ef	1,0530 abcdef
	Daun pertama	0,003550	0,000800	0,7424 cdef	0,4370 def
	Daun jarum	0,002860	0,000540	0,2660 ef	0,2500 f
5	Kotiledon	---	0,005435	---	1,5134 ab
	Daun pertama	0,002400	0,000515	0,9830 abcdef	0,7200 bcdef
	Daun jarum	0,000290	0,000420	0,9855 abcdef	0,2455 f

¹⁾ Umur pada saat penyapihan atau 2 minggu setelah penaburan

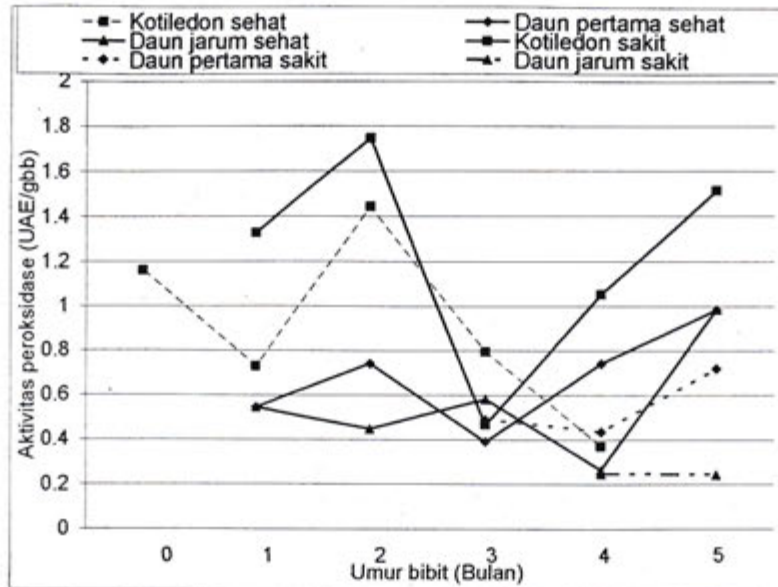
²⁾ --- = menunjukkan pengukuran aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase tidak dapat dilakukan

³⁾ Nilai yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda pada taraf 5 % berdasarkan uji jarak berganda Duncan

Secara umum gejala penyakit muncul pada bibit berumur sekitar 2 bulan setelah penyapihan (BSP). Menurut Mirov (1967) terdapat perbedaan macam dan kadar metabolit sejalan dengan perbedaan umur dan pertumbuhan daun bibit pinus. Sebagaimana hasil penelitian terhadap bibit berumur 1-4 bulan, diketahui bahwa umur 3 bulan merupakan umur bibit yang lebih rentan dibandingkan dengan umur 1 dan 2 bulan. Namun demikian bukan berarti umur 1-2 bulan tidak dapat terserang. Kenyataannya di lapang, bibit berumur sekitar 1 bulan dapat juga terserang oleh *P. theae* yaitu pada masa kotiledon terbentuk. Hal tersebut sejalan dengan fakta bahwa dari daun yang sehat aktivitas peroksidase kotiledon menurun pada 1 BSP (0,7300 UAE/gbb) dibandingkan dengan 0 BSP atau saat penyapihan

(1,1600 UAE/gbb), sedang aktivitas polifenoloksidase menurun sampai bibit berumur 2 BSP (0,00045 UAE/gbb), dari umur 1 BSP (0,001225 UAE/gbb), dan dari bibit saat penyapihan (0,0029 UAE/gbb). Oleh karenanya bibit berumur dari 2 sampai 3 BSP mulai menunjukkan gejala sakit. Setelah peningkatan perkembangan penyakit pada bibit berumur 3 BSP, aktivitas polifenoloksidase kembali menurun menjadi 0,00383 UAE/gbb pada umur 4 BSP, demikian juga aktivitas peroksidase turun dari 1,4429 UAE/gbb pada bibit berumur 2 BSP menjadi 0,7940 UAE/gbb waktu bibit berumur 3 BSP serta 0,3720 UAE/gbb ketika bibit berumur 4 BSP.

Daun pertama mulai menunjukkan gejala setelah bibit berumur 2 BSP dan dapat dikatakan bahwa daun pertama terserang segera setelah



Gambar 4. Aktivitas peroksidase dari kotiledon, daun tinggal, dan daun jarum sehat dan sakit pada bibit *P. merkusii* berumur 0-5 bulan setelah penyapihan (BSP)

kotiledon terserang, dan jarang sekali daun pertama tersebut terserang lebih dahulu dari kotiledon. Aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase daun pertama menurun waktu bibit berumur 3 BSP. Pada bibit berumur 4 BSP aktivitas kedua enzim ini meningkat lagi.

Perkecambah merupakan proses penting yang menentukan keberhasilan patogen dalam melakukan serangan. Pada media Pachlewsky, tabung kecambah sudah mencapai 56,11 μm setelah 12 jam inkubasi. Bila diasumsikan inisiasi yang dirangsang oleh eksudat dan kelembaban yang mendukung di stoma pada ujung daun mendorong konidia untuk berkecambah dan tabung kecambah masuk ke dalam ruang stoma, maka langkah berikutnya adalah dikeluarkannya enzim-enzim yang diperlukan untuk menguraikan komponen dinding sel. Selulase dan pektinase yang dilepaskan konidia, seperti pada *Blumeria graminis* (Suzuki dkk. 1998), diduga berperan penting dalam penempelan tabung kecambah konidia jamur pada permukaan tanaman inang.

Epidermis daun *P. merkusii* yang relatif tebal dan keras diduga menyebabkan jamur patogen ini tidak mampu menginfeksi langsung melalui epidermis, kecuali adanya pelukaan. Berbagai hasil penelitian yang terangkum oleh Semangun (2000) menunjukkan bahwa *Pestalotia* sp. menginfeksi melalui luka atau lubang alami. Ukuran lubang stomata rupanya bukan menjadi hambatan bagi

tabung kecambah untuk masuk ke dalamnya. Ukuran lubang stoma kotiledon 21,7 μm x 8,31 μm , lubang stoma daun pertama 26,29 μm x 10,18 μm , dan lubang stoma daun jarum 23,81 μm x 8,34 μm semuanya adalah jauh lebih besar dibandingkan dengan diameter tabung kecambah yaitu $2,88 \pm 0,59$ μm ; sementara itu, seperti ditunjukkan oleh Hidayat (1996), sel penutup ada bagian dinding sel yang tidak terlineifikasi turut berfungsi dalam proses membuka dan menutupnya stoma, memungkinkan tabung kecambah dapat masuk ke ruang antarsel untuk memulai infeksinya. Dengan demikian maka peran enzim selulolitik dan pektinolitik atau salah satu di antaranya menjadi penting bagi aktivitas serangan patogen pada daun.

Gejala hawar yang tampak pada daun bibit pinus menunjukkan telah terjadi infeksi. Untuk melaksanakan aktivitas penetrasi dan infeksi, maka jamur harus menguraikan senyawa selulosa dan pektin sebagai komponen penyusun dinding sel-sel di bawah epidermis dengan bantuan enzim ekstraselular selulolitik dan pektinolitik yang dihasilkan jamur itu sendiri (Goodman dkk. 1986; Barmore dkk. 1984; Griffin 1993).

Meskipun secara statistik pada taraf 5 % tidak nyata, tetapi bukan berarti *P. theae* tidak memiliki kemampuan untuk menghasilkan kedua macam enzim tersebut. Menurut Achmad (1996) tidak terdeteksinya aktivitas poligalakturonase melalui teknik iodometri

adalah karena kuantitas bahan sumber pektatnya kurang memadai.

Dari pengujian aktivitas selulase filtrat biakan *P. theae*, diketahui bahwa kadar glukosa pada perlakuan media Pachlewsky ternyata lebih tinggi daripada perlakuan media Pachlewsky yang ditumbuhkan patogen. Hal ini menunjukkan bahwa patogen menggunakan gula sederhana yang tersedia pada media Pachlewsky tersebut untuk pertumbuhannya.

Pada daun jarum, aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase relatif lebih rendah daripada aktivitas enzim tersebut dari kotiledon dan daun pertama. Diduga hal ini berkaitan dengan adanya penekanan aktivitasnya oleh hormon pertumbuhan yang diproduksi bibit seperti auxin dalam rangka perpanjangan sel pada daun muda (Goodwin dan Erwee 1981; Woolhouse dan Jenkins 1983). Selama kurun waktu awal pertumbuhan tersebut aktivitas pemanjangan dan penambahan sel relatif tinggi pada daun jarum. Menurut Devlin (1975), auxin dapat menekan aktivitas kedua enzim tersebut. Diduga penekanan ini juga berlaku terhadap aktivitas enzim-enzim yang dihasilkan oleh jamur patogen.

Pada daun yang pertumbuhannya optimal, senyawa fenolik sebagai hasil metabolit sekunder melalui jalur Asam Sikimik (Taiz dan Zeiger, 1991) akan mengalami oksidasi dengan melibatkan enzim polifenoloksidase yang menghasilkan senyawa toksik terhadap jamur patogen dan enzim peroksidase yang menghasilkan radikal-radikal bebas senyawa fenolik sederhana untuk pembentukan lignin (lignifikasi) yang berguna untuk pertahanan terhadap invasi patogen (Agrios 1997; Miyazawa dkk. 1998). Menurut Eisensmith dkk. (1982) kerentanan daun akan makin menurun dengan makin bertambahnya umur daun. Pada periode umur bibit *P. merkusii* 0-8 minggu, makin tua umur bibit, kadar lignin makin meningkat (Achmad 1996). Kondisi ini berlaku secara umum pada perkembangan tiap bagian tubuh bibit pinus.

Sementara itu kutikula pinus yang tebal, dengan ukuran berkisar 2,8-5,4 μm pada umur 3-5 bulan, sebagaimana dikemukakan Doster dan Schnathorst (1985), merupakan salah satu mekanisme fisik dalam pertahanan terhadap serangan patogen.

Baik aktivitas polifenoloksidase maupun peroksidase terutama dari kotiledon daun sakit, yang mencerminkan respons bibit dalam hal pertahanan secara aktif, lebih tinggi daripada aktivitas yang dari kotiledon sehat.

Berkaitan dengan hal tersebut, ada dua macam mekanisme pertahanan bibit pinus yaitu: (i) secara pasif dengan aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase komponen tajuk bibit dari umur 0-5 BSP yang dalam keadaan sehat, serta (ii) secara aktif dengan aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase komponen tajuk bibit dari umur 0-5 BSP yang dalam keadaan sakit.

Pada pertahanan pasif secara kimia ini, aktivitas kedua macam enzim tersebut menunjukkan pola khas bibit pinus. Pada kotiledon misalnya, peningkatan aktivitas polifenoloksidase secara drastis pada bibit berumur 3 BSP sebelum kembali turun pada bibit berumur 4 BSP (Gambar 3) dan peningkatan aktivitas peroksidase pada bibit berumur 2 BSP sebelum kembali turun pada bibit berumur 4 BSP (Gambar 4) menjadikan kotiledon yang belum terinfeksi pada bibit berumur 2-3 bulan menjadi lebih tahan. Itulah sebabnya sebagaimana ditunjukkan pada data distribusi nisbah kotiledon terinfeksi (Tabel 4), sampai pada 13-14 MSP masing-masing nisbah infeksi 5,70 dan 6,45 (dari total 8,00) yang berarti rata-rata nisbah kotiledon sehat 2,30-1,55. Kondisi serupa dapat terjadi pada daun pertama dengan penurunan aktivitas kedua macam enzim tersebut pada bibit berumur sekitar 3 BSP dan penurunan berikutnya terjadi setelah bibit berumur 4 BSP yang merupakan saat rentan bagi bibit terhadap serangan patogen.

Pada pertahanan bibit secara aktif, respons bibit terhadap serangan patogen ditunjukkan oleh peningkatan aktivitas kedua macam enzim tersebut. Pada kotiledon, aktivitas polifenoloksidase cenderung pada bibit sakit lebih tinggi di bandingkan dengan pada yang tidak terinfeksi pada bibit berumur 2 BSP (Gambar 3) dan secara nyata aktivitas peroksidase meningkat pada bibit berumur 1-2 BSP (Gambar 4). Adapun pada daun pertama, dengan umur yang relatif pendek dan akan gugur setelah bibit berumur lebih dari 5 bulan, pola aktivitas polifenoloksidase dan peroksidase pada bibit sakit tidak tampak perbedaannya dibandingkan dengan pada bibit yang sehat.

Sejalan dengan fakta yang menunjukkan adanya mekanisme pertahanan bibit secara aktif tersebut, terjadi peningkatan aktivitas kedua macam enzim tersebut lebih pada daun terinfeksi dan prekursor senyawa-senyawa fenolik menginduksi sintesis polifenoloksidase pada jaringan yang sakit (Jennings dkk. 1969 dan Grec, 1992). Senyawa-senyawa fenolik tersebut akan dioksidasi dengan bantuan aktivitas polifenoloksidase menjadi senyawa

yang lebih berbahaya bagi patogen (Martyn dkk. 1979). Di lain pihak senyawa fenolik akan dioksidasi dengan bantuan peroksidase yang menghasilkan produk bagi penyusunan komponen dinding sel (Ebermann dan Lickl 1985).

Aktivitas polifenoloksidase relatif kecil dan fluktuasinya tidak memiliki pola yang khas dari bibit berumur 0-5 BSP. Menurut Lewis (1975, diacu oleh Achmad 1996), fluktuasi aktivitas polifenoloksidase tidak memiliki hubungan dengan umur semai pinus Loblolly yang dipelajarinya. Keliszewska-Rokicka (1983, diacu oleh Achmad 1996) juga menunjukkan kecilnya aktivitas polifenoloksidase pada Pinaceae sebagaimana banyak dilaporkan pada tumbuhan berbiji terbuka.

SIMPULAN

Serangan *Pestalotia theae* dalam proses patogenesis dimulai dengan perkecambahan konidiospora. Tabung kecambah yang pada media Pachlewsky cair berdiameter $2,88 \mu\text{m} \pm 0,59 \mu\text{m}$, mungkin untuk masuk kedalam jaringan daun melalui stoma daun yang berukuran jauh lebih besar. Terhadap uji aktivitas enzim-enzim selulolitik dan pektinolitik yang diproduksi oleh patogen, ternyata tidak terdeteksi dengan menggunakan media Pachlewsky, CMS, dan CMS-daun pinus.

Pertahanan bibit *P. merkusii* terhadap serangan *P. theae* adalah dengan adanya epidermis dengan lapisan kutikula yang tebal yang mencegah penetrasi langsung permukaan daun, dan produksi peroksidase yang besar aktivitasnya tergantung pada umur dan macam daun komponen tajuk.

Interaksi inang-patogen dalam proses patogenesis mempengaruhi waktu timbulnya gejala, yaitu pada kotiledon bibit berumur sekitar 1-2 bulan, pada daun pertama sekitar 2 bulan, dan umur lebih dari 3 bulan pada daun jarum. Timbul dan perkembangan gejala sejalan dengan kerentanan bibit *P. merkusii* yang dipengaruhi oleh penurunan aktivitas peroksidase yang diproduksi dalam beberapa macam daun komponen tajuk bibit.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad. 1996. Mekanisme serangan patogen dan pertahanan inang serta pengendalian hayati penyakit lodoh pada *Pinus merkusii* (disertasi). Bogor: Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
- Agrios G.N. 1997. *Plant pathology*. Edisi ke-4. San Diego: Academic Press.
- Atlas RM. 1993. *Handbook of microbiological media*. London: CRC Press.
- Bailey MJ, Pessa E. 1990. Strain and process for production of polygalacturonase. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 266-271
- Barmore CR, Snowden SE, Brown, GE. 1984. Endopolygalacturonase from Valencia orange infected with *Diplodia natalensis*. *Phytopathology* 74: 735-737
- Devlin RM. 1975. *Plant physiology*. Edisi ke-3. New York: D. van Nostrand Co.
- Doster MA, Schnathorst WC. 1985. Effects of leaf maturity and cultivar resistance on development of the powdery mildew fungus on grapevines. *Phytopathology* 74: 572-577
- Ebermann R, Lickl E. 1985. The possible rate of peroxidase isozymes in the infection of English oak by *Loranthus europaeus*. *Phytopathology* 75: 1102-1104
- Eisensmith SP, Sjulim TM, Jones AL, Cress CE. 1982. Effect of leaf age and inoculum concentration on infection of sour cherry by *Coccomyces hiemalis*. *Phytopathology* 72: 574-577
- Goodman NR, Kiraly Z, Zaitlin M. 1986. *The biochemistry and physiology of infectious plant disease*. Bagian wall composition and metabolism. New Jersey: D. Van Nostrand Co. hlm. 107-150.
- Goodwin PB, Erwee MG. 1981. Hormonal influences on leaf growth. Di dalam Dale JE, Milthorpe FI, editor. *The growth and functioning of leaves. Proceedings of a symposium held prior to the Thirteenth International Botanical Congress at The University of Sydney; Sydney; 18-20 August 1981*. London: Cambridge University Press, hlm. 207-232.
- Grec L. 1992. Physiology of the diseased plant. Di dalam: Sebanek J., editor. *Plant physiology*.

- Amsterdam: Elsevier Science Publishing Co. hlm. 422-432
- Griffin DH. 1993. *Fungal physiology*. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: J. Wiley.
- Hidayat EB. 1996. *Anatomi tumbuhan berbiji*. Bandung: Penerbit ITB.
- Jennings PH, Brannaman BL, Zscheile FP. 1969. Peroxidase and polyphenol oxidase activity associated with *Helminthosporium* leaf spot of maize. *Phytopathology* 59: 963-967.
- Kieliszewska-Rokicka B. 1983. Polymorphism and function of some oxidizing enzymes of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Arboretum Kornickie* 28: 237-259
- Martyn RD, Samuelson DA, Freeman TE. 1979. Ultrastructural localization of polyphenoloxidase activity in leaves of healthy and diseased waterhyacinth. *Phytopathology* 69: 1278-1287
- Mirov T. 1967. *Pinus*. New York: The Ronald Press.
- Miyazawa J, Abe K, Hasegawa H. 1998. Allosteric regulation of cell wall-bound peroxidase and induction of acquired resistance to tomato wilt disease by 4-hydroxybenzoic hydrazide. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 64: 16-23.
- Sass JE. 1958. *Botanical microtechnique*. Ames-Iowa: Iowa State College Press.
- Semangun H. 2000. *Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjahmada Univ. Press.
- Srivastava SK. 1987. Peroxidase and polyphenoloxidase in *Brassica juncea* plants infected with *Machrophomina phaseolina* in disease resistance. *Phytopathology* 120: 249-254.
- Suzuki S, Komiya Y, Mitsui T, Tsuyumu S, Kunoh H, Carver TLW, dan Nicholson RL. 1998. Release of cell wall degrading enzymes from conidia of *Blumeria graminis* on artificial substrate. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* 64: 160-167.
- Sutarman, Achmad, Hadi S. 2001. Penyakit hawar daun bibit *pinus merkusii* di pesemaian. *Agritek* 9: 1419-1427.
- Sutarman, Achmad, Hadi S, Suryani A, Saefuddin A. 2003. Analisis kerugian penyakit hawar daun bibit *Pinus merkusii* di pesemaian (dalam penerbitan)
- Taiz L, Zeiger E. 1991. *Plant physiology*. New York: The Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Woolhouse HW, Jenkins GI. 1983. Physiological responses, metabolic changes, and regulation during leaf senescence. Di dalam: Dale JE, Milthorpe FI, editor. The growth and functioning of leaves. *Proceedings of a symposium held prior to the Thirteenth International Botanical Congress at The University of Sydney*. Sydney; 18-20 August 1981. London: Cambridge University Press. hlm. 449-488.