

PROTEIN LATEKS *HEVEA BRASILIENSIS* SEBAGAI FUNGISIDA UNTUK PENGENDALIAN PENYAKIT TANAMAN

Potency of Hevea brasiliensis Latex Protein as Fungicide for Plant Disease Control

Radite TISTAMA^{1*}, Widya MINATI²,
Muhammad Rizki DAROJAT¹ dan Cici Indriani DALIMUNTHE¹

¹Balai Penelitian Sungei Putih, Pusat Penelitian Karet
PO Box 1415 Medan 20001 Sumatera Utara
*Email : raditetistama@gmail.com

² Universitas Pembangunan Panca Budi Medan
Jalan Jendral Gatot Subroto KM 4,5
Medan Sunggal, Medan 20122 Sumatera Utara

Diterima : 28 Maret 2017 / Disetujui : 15 April 2017

Abstract

Latex serum of rubber tree contains many kind of protein related to defense mechanism to pathogen. Latex protein utilization as product of controlling pathogen fungi was limited by expensive instruments and high cost. The objectives of the research were to establish the simpler method for latex protein isolation and observing the latex protein activity in growth inhibition to several pathogenic fungi of food and estate crops. The highest latex serum was obtained in latex coagulated with 37.5 ml 5% formic acid per liter of latex. Aceton, ammonium sulphate, and trichloric acid (TCA) were effective for latex protein presipitation. Serum treated with aceton and ammonium sulphate were obtained protein as much as 7.78 mg/ml and 9.2 mg/ml serum respectively, and higher than the protein that of presipitation with TCA, was 5,56 mg/ml serum. Superoxide dismutase (SOD) activity of protein presipited with aceton and ammonium sulphate were higher than activity that of protein presipited with TCA, although the spesific SOD activity all of protein were not significantlly different. In vitro test showed that, latex proteins had varied inhibition range to plant pathogenic fungi, from 13,70% to 33,18% againts control. Fusarium oxysporum, Collectrotichum capsici and Rigodoporus microporus were sensitive to latex protein activity.

Keywords: Antifungal; latex protein isolation; plant pathogenic fungi; rubber

Abstrak

Serum lateks tanaman karet mengandung berbagai jenis protein yang berkaitan dengan protein pertahanan terhadap patogen. Pemanfaatan protein-protein lateks tersebut sebagai produk pengendali jamur patogen masih terkendala oleh metode isolasi protein serum lateks yang memerlukan peralatan dan biaya yang mahal. Penelitian ini bertujuan untuk menetapkan metode isolasi protein lateks yang lebih sederhana dan menguji daya hambat protein-protein lateks tersebut terhadap pertumbuhan beberapa spesies jamur patogen pada tanaman pangan dan perkebunan. Pemisahan serum tertinggi diperoleh dari lateks yang dikoagulasikan dengan 37,5 mL asam format 5% tiap 1 liter lateks. Aseton, amonium sulfat dan *Trichloric Acid* (TCA) cukup efektif mempresipitasikan protein-protein di dalam serum lateks. Aseton dan amonium sulfat mempresipitasi protein masing-masing sebanyak 7,78 mg/mL dan 9,2 mg/mL serum, dan lebih tinggi dibandingkan TCA yaitu 5,56 mg/mL serum. Aktivitas enzimatik superoksida dismutase (SDO) protein hasil presipitasi dengan aseton dan amonium sulfat lebih tinggi dibandingkan protein hasil presipitasi dengan TCA, meskipun aktivitas SOD spesifik masing-masing perlakuan tidak berbeda nyata. Protein lateks memiliki daya hambat *in vitro* yang luas terhadap spesies jamur patogen yaitu 13,70% hingga 33,18% terhadap kontrol. *Fusarium oxysporum*,

Collectotrichum capsici dan *Rigidoporus microporus* merupakan jamur patogen yang peka terhadap aktivitas protein-protein lateks.

Kata kunci: Anti-fungi; isolasi protein lateks; jamur patogenik tanaman; karet

PENDAHULUAN

Pengendalian berbagai serangan penyakit baik pada tanaman pangan maupun perkebunan umumnya masih menggunakan pestisida kimia sintetik. Selain relatif mahal pengendalian penyakit menggunakan bahan kimia secara berlebihan tersebut dapat menyebabkan kerusakan ekosistem dan kemungkinan resistensi patogen sasaran. Di Indonesia, bahan-bahan produk hayati yang potensial untuk pestisida sangat melimpah, namun sebagian besar belum dimanfaatkan bahkan dianggap sebagai limbah. Salah satu limbah perkebunan yang melimpah adalah serum lateks hasil pengolahan lateks pekat dari lateks kebun tanaman karet *Hevea brasiliensis* Muell Arg. Serum lateks banyak mengandung protein yang berguna sebagai pertahanan terhadap penyakit (Tistama, 2009).

Komponen lateks menggunakan ultrasentrifus pada kecepatan 40.000 gravitasi (*g*) dan diperoleh tiga lapisan utama. Bagian paling atas dari lateks tersebut berupa partikel karet, lapisan tengah berupa cairan berwarna bening-kuning jingga (serum C), dan lapisan paling bawah berupa endapan organel yang disebut lutoid (Wititsuwannakul, Rukseree, Kanokwiroon, & Wititsuwannakul 2008). Lutoid juga mempunyai serum yang disebut serum B. Partikel karet yang terkandung di dalam lateks berkisar 30-45% dan selebihnya berupa serum (C dan B) (Jacob *et al.*, 1989). Lateks diketahui mengandung protein kurang lebih 5-10 g/L yang memiliki peran sebagai enzim glukonase (Konno 2011), kitininase (Parijs *et al.*, 1991; Martin, 1991) dan lisozim (Subroto, 1999).

Penelitian-penelitian mengenai aktivitas protein serum lateks, umumnya menggunakan protein yang diisolasi dengan cara dipisahkan dengan ultrasentrifugasi kemudian dilewatkan ke dalam kolom *Sphadex* G-100 (Soedjanaatamadja &

Subroto, 1995; Kanokwiroon *et al.*, 2008). Metode ini selain mahal, jumlah protein lateks yang diperoleh relatif sedikit. Pengembangan protein lateks sebagai fungisida dan bakterisida dalam skala komersial memerlukan metode isolasi protein lateks yang lebih sederhana dan ekonomis. Metode isolasi protein tersebut selain memperhatikan aspek kuantitas, juga harus diperoleh protein berkualitas tinggi.

Daya hambat protein serum lateks terhadap penyakit tanaman pangan dan perkebunan belum banyak diteliti. Protein hasil isolasi perlu diuji aktivitasnya terhadap berbagai spesies jamur patogen. Pengujian daya hambat ini dimaksudkan untuk mengetahui salah satu peranan dari protein lateks.

Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan metode isolasi protein yang sederhana dengan kuantitas dan kualitas yang baik dan mengetahui kemampuan menghambat protein serum tersebut terhadap beberapa jamur patogen tanaman.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan adalah lateks segar dari klon PB 260 dari Kebun Percobaan Balai Penelitian Sungei Putih. Lateks dikumpulkan di dalam tabung plastik dan disimpan dalam termos berisi es. Jamur penyebab penyakit pada tanaman pangan dan perkebunan diperoleh dengan cara mengisolasi dari tanaman yang menunjukkan gejala oleh patogen tersebut. Jamur-jamur patogen yang digunakan untuk menguji aktivitas penghambatan protein lateks adalah *Cercospora oryzae*, *Colletotrichum capsici*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Cercospora personatum* yang mewakili jamur patogen tanaman pangan, sedangkan isolat *Rigidoporus microporus* dan *Corynespora cassiicola* mewakili jamur patogen tanaman perkebunan.

Isolasi Protein

Sebanyak 80 mL lateks kebun digumpalkan dengan 1 mL, 2 mL dan 3 mL larutan asam format 5%. Serum diekstrak dari dalam karet dengan menekan gumpalan karet hingga pipih. Serum lateks

dipindahkan ke dalam tabung yang baru. Presipitasi protein dilakukan dengan menggunakan tiga jenis bahan yang biasa digunakan untuk presipitasi protein yaitu aseton 1 kali volume serum lateks, 4M amonium sulfat, dan 35% TCA sebanyak 4,5 kali volume serum. Campuran serum dengan 4 M amonium sulfat digojok di atas *rotary shaker* pada kecepatan 100 rpm selama 12 jam. Presipitat protein dikumpulkan dengan cara sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 10 menit dan suhu 25°C. Setelah supernatan dibuang, protein dikering-anginkan dan ditimbang. Protein yang diperoleh kemudian dilarutkan kembali dengan 4 ml 0,1 M NaOH.

Aktivitas superoksida dismutase (SOD) protein yang diperoleh diuji dengan metode yang dikembangkan oleh Aydin, Kant, dan Turan (2011). Larutan protein sebanyak 100 µl ditambah dengan bufer reaksi (50 mM bufer fosfat pH 7,8, 13 mM metionin, 75 µM NBT, 0,1 mM EDTA) dan terakhir ditambahkan 2 µM riboflavin. Larutan disinari dengan dua lampu *fluorescen* 15 W selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan cara mematikan lampu. Larutan yang tidak disinari lampu *fluorescen* digunakan sebagai blangko. Absorbansi larutan dibaca pada panjang gelombang 560 nm.

Pengujian Antagonis

Masing-masing biakan murni jamur patogen ditumbuhkan pada media *potato dextrose agar* (PDA) pada suhu kamar. Setelah berumur 6 hari, potongan biakan jamur dengan diameter 1 cm ditumbuhkan pada media PDA yang baru. Potongan kertas Whatman berdiameter 1 cm ditetesi dengan 25 µL protein lateks (konsentrasi 200 µg/mL) kemudian diletakkan pada jarak 5 cm dari biakan jamur patogen. Percobaan menggunakan Rancangan Acak Lengkap dengan lima ulangan. Biakan disimpan pada suhu kamar selama 8 hari dan pengamatan dilakukan sebanyak empat kali yakni 2, 4, 6 dan 8 hari setelah inokulasi (hsi). Pengamatan daya penghambatan protein dilakukan dengan cara mengukur luas pertumbuhan hifa jamur patogen menggunakan planimeter. Persentase penghambatan dihitung dengan membagi selisih luas miselium tanpa perlakuan dengan luas miselium perlakuan dibagi luas miselium tanpa perlakuan dikali

100% (Suryanto, Wibowo, Siregar, & Munir, 2012). Data dianalisis keragamannya (ANOVA) dengan menggunakan perangkat lunak GENSTAT.

Pengamatan mikroskopis miselium dipilih pada ujung hifa di daerah zona hambat jamur patogen. Ujung hifa jamur patogen pada media PDA dipotong berbentuk kotak kemudian diletakkan pada gelas objek. Abnormalitas pertumbuhan hifa patogen yang diamati, berupa pembengkokan ujung hifa, hifa pecah dan mengalami lisis serta hifa tumbuh kerdil.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Protein

Dari proses penggumpalan 85 mL lateks segar dengan berbagai tingkat volume asam format 5% diperoleh serum sebanyak kurang lebih 40-45 mL atau sekitar 50% dari lateks segar. Serum yang diinginkan adalah serum jernih yang mengindikasikan semua partikel karet telah mengalami koagulasi dengan sempurna. Koagulasi lateks yang sempurna untuk 85 mL lateks dibutuhkan 3 mL asam format 5%. Kejernihan serum diperlukan agar pada saat proses pengendapan, protein tidak terkontaminasi oleh sisa partikel-partikel karet.

Pada percobaan pendahuluan, koagulasi lateks dengan berbagai konsentrasi asam asetat diperoleh 20-25 mL serum dari 85 mL lateks segar. Penggunaan asam asetat sebagai koagulan menyebabkan gumpalan karet menjadi lebih keras sehingga sulit diekstrak. Selain itu serum yang diperoleh lebih keruh dan protein yang dipresipitaskan juga sangat rendah.

Protein serum yang dipresipitaskan dengan aseton, amonium sulfat dan TCA masing-masing menghasilkan jumlah presipitat yang bervariasi. Jumlah presipitat protein tertinggi diperoleh dari perlakuan 4M amonium sulfat, kemudian diikuti aseton dan TCA, berturut-turut 9,20 mg/mL, 7,78 mg/mL, dan 5,56 mg/mL serum (Tabel 1).

Analisis aktivitas SOD pada penelitian ini dimaksudkan untuk memastikan protein-protein yang diendapkan tidak mengalami proses denaturasi selama proses isolasi yang

Tabel 1. Isolasi protein lateks dan uji kualitas protein berdasarkan aktivitas enzim SOD
 Table 1. Isolation of latex protein and protein quality test based on SOD activity

Parameter Parameter	Bahan-bahan untuk presipitasi protein Materials for protein precipitation		
	Aseton	Amonium Sulfat	TCA
Berat presipitat protein (mg/mL serum)	7,78 ^a	9,20 ^a	5,56 ^b
Aktivitas SOD total (unit/menit)	14,7 ^a	16,25 ^a	11,45 ^b
Aktivitas SOD spesifik (unit/mg /menit)	1,89	1,77	2,06

Angka dengan huruf yang sama pada baris yang sama tidak berbeda nyata pada $P = 0,05$
 Number followed by the same letter in the same row were not significantly different at $P = 0,05$

berarti bahwa enzim-enzim lain di dalam serum lateks masih pada struktur yang normal dan aktif. Jumlah protein yang diperoleh pada presipitasi menggunakan TCA relatif lebih sedikit dibandingkan presipitasi menggunakan aseton dan amonium sulfat, tetapi aktivitas SOD yang spesifik justru paling tinggi (Tabel 1).

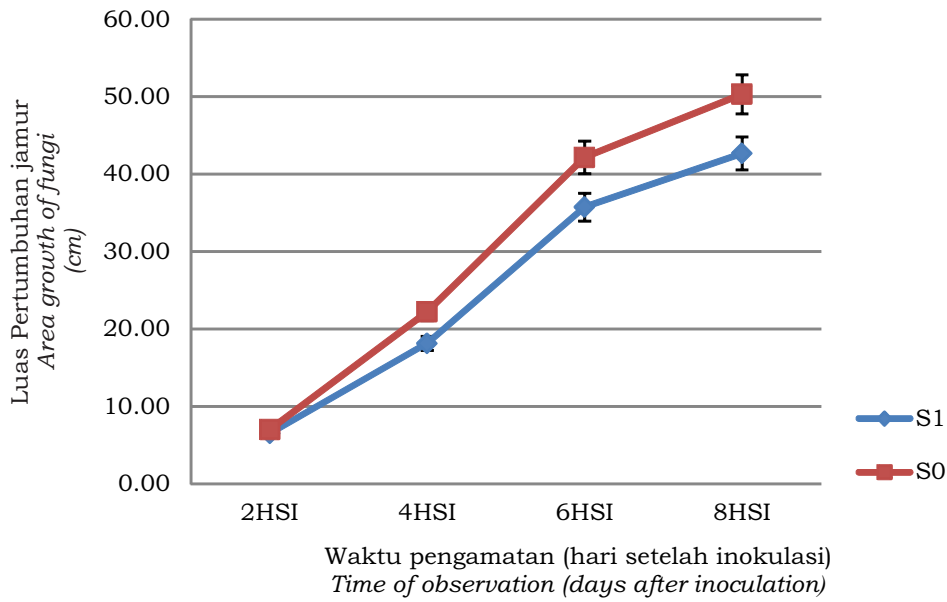
Pengendapan dengan amonium sulfat membutuhkan jumlah yang cukup tinggi yaitu sebanyak 4M dan ini dikhawatirkan menimbulkan masalah baru dengan limbah yang dihasilkannya. Sejauh ini belum ada teknologi yang sederhana untuk memurnikan amonium sulfat dari limbah. Sementara itu presipitasi dengan TCA dibutuhkan jumlah yang lebih rendah, tetapi pemakaian TCA menyisakan limbah asam. Aseton yang mudah menguap memiliki kelebihan karena limbahnya dapat didaur ulang dengan cara destilasi.

Yeang, Yusof, dan Abdullah (1995) memisahkan serum C dan serum B dengan cara mensentrifugasi lateks segar sebelum dilakukan presipitasi. Presipitasi serum C menggunakan 5% TCA dikombinasikan dengan *phosphotungstic acid* (PTA) diperoleh protein 0,7 mg/mL, sedangkan serum B diperoleh protein 0,3 mg/mL atau jika digabung diperoleh jumlah total protein sekitar 1 mg/mL. Pada penelitian ini lateks segar langsung digumpalkan dengan asam format, sehingga protein serum C dan serum B bergabung pada saat presipitasi. Meskipun metode ini lebih sederhana tetapi jumlah protein yang diperoleh mendekati perolehan protein total dengan metode sentrifugasi. Selain protein serum, kemungkinan protein penyusun membran partikel karet juga terikut dalam proses presipitasi. Protein-protein tersebut relatif sulit dilarutkan kembali dibandingkan protein-protein sitosol. Parijs *et al.* (1991) menyebutkan

bahwa ekstraksi 5 gravitasi liofilisat serum B menggunakan 150 mL 0,05 mM asam asetat dalam 0,2 M NaCl diperoleh 56 mg protein mirip kitinase yaitu *hevein*. Kandungan *hevein* di dalam serum B kurang lebih 10% dari total protein di dalam lateks (Gidrol, Chresting, Tan, & Khus, 1994). Dengan demikian dapat diperkirakan bahwa metode penggumpalan lateks dengan asam format diikuti dengan pengendapan protein diperoleh 0,056 mg/mL – 0,1 mg/mL *hevein* tergantung jenis bahan presipitasi proteinnya. Protein lateks sebagian tidak rusak dengan perlakuan amoniak maupun beberapa bahan kimia lainnya dalam proses pembuatan sarung tangan. Lateks yang diberi amoniak (pH 12) masih dapat diperoleh *hevein* sebanyak 0,7 g/L lateks (Soedjanaatmadja & Subroto, 1995). Meskipun sudah dalam bentuk sarung tangan, protein masih dapat diekstrak dengan 0,1 M bufer fosfat yang mengandung 0,2% bovine serum albumin dan 0,01% sodium azida, serta 20 µg/g protein sarung tangan (Beezhold, Swanson, Zehr, & Kostyal, 1996).

Penghambatan Jamur Patogen Tanaman oleh Protein Serum

Protein serum lateks *H. brasiliensis* menunjukkan daya hambat yang bervariasi terhadap pertumbuhan beberapa spesies jamur patogen tanaman. Pengamatan pada 2 hari setelah inokulasi (HSI), luas pertumbuhan miselium jamur-jamur yang diuji masih belum berbeda antara perlakuan protein serum (S1) dibandingkan dengan kontrol (S0). Diameter miselium jamur pada 2 HSI baru sekitar 10 mm sehingga belum mencapai jangkauan infiltrasi protein di dalam media PDA. Penghambatan protein serum terhadap pertumbuhan jamur mulai terlihat pada 4 HSI, dan terus meningkat pada 6 HSI dan 8 HSI (Gambar 1). Miselium



Gambar 1. Rataan luas pertumbuhan miselium beberapa spesies jamur patogen pada PDA tanpa protein lateks (S0) dan dengan pemberian protein lateks (S1).

Figure 1. Average mycelium growth of several pathogen fungi species on PDA without protein adding (S0) and with adding of latex protein (S1).

yang kontak dengan protein mengalami penurunan pertumbuhan bila dibandingkan dengan kontrol.

Respon pertumbuhan miselia bervariasi untuk tiap-tiap spesies jamur patogen yang diuji terhadap protein serum (Gambar 2). Pertumbuhan jamur yang diaplikasikan dengan protein serum dalam kertas cakram terlihat sedikit terhambat bila dibandingkan dengan kontrol (tanpa aplikasi protein serum).

Penghambatan terbesar terjadi pada spesies *Fusarium oxysporum* dan terendah pada *Alternaria solani*. Protein serum dengan konsentrasi 200 µg/mL sebanyak 25 µL memiliki daya penghambatan berkisar antara 13,70% hingga 33,18% (Tabel 2). Hal ini menunjukkan bahwa protein serum memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen namun konsentrasi yang digunakan masih belum optimum. Peningkatan konsentrasi protein menjadi 3 kali lipat (600-800 µg/mL) diduga



Gambar 2. Pertumbuhan jamur *Cercospora oryzae* (A) dan *Rigidoporus microporus* (B) yang diaplikasi dengan protein serum (atas) dan tidak aplikasi protein serum (bawah) pada pengamatan 6 hari setelah inokulasi (HSI)

Figure 2. Growth of *Cercospora oryzae* fungi (A) and *Rigidoporus microporus* (B) which were applied by serum protein (upper) and without serum protein (bellow) at 6 days after inoculation (DAI)

Tabel 2. Daya hambat protein serum lateks terhadap pertumbuhan jamur patogen pada 6 hari setelah inokulasi (HSI)

Table 2. Inhibition activity of serum protein of latex to growth of some plant pathogenic fungi at 6 days after inoculation (DAI)

Spesies <i>Species</i>	Persentase penghambatan <i>Inhibition percentage</i> (%)
<i>Alternaria solani</i>	13,70 ^a
<i>Colletotrichum capsici</i>	27,12 ^d
<i>Cercospora oryzae</i>	20,90 ^b
<i>Fusarium oxysporum</i>	33,18 ^d
<i>Cercosora personatum</i>	17,66 ^b
<i>Rigidoporus microporus</i>	21,12 ^c
<i>Corynespora cassicola</i>	18,00 ^b

Nilai yang diikuti oleh huruf yang sama pada kolom yang sama berbeda tidak nyata pada taraf 5%
Number followed by the same letter in the same row were not significantly different at $P=0,05$

mampu meningkatkan daya hambat protein hingga mencapai >50% sehingga dapat dianggap efektif dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen. Ketujuh patogen yang diuji tergolong ke dalam famili yang jauh kekerabatannya. Dengan demikian protein serum memiliki daya penghambatan yang cukup luas terhadap jamur patogen.

Perbedaan respon pertumbuhan antar spesies jamur diduga karena jenis senyawa penyusun dinding sel-sel miselium jamur bervariasi terutama pada komposisi kitinnya. *Hevein* dan *pseudohevein* di dalam lateks merupakan protein-protein yang memiliki afinitas pengikatan terhadap kitin yang tinggi dan mampu menguraikan kitin menjadi bentuk yang lebih sederhana (Ukun, 2009). Meskipun aktivitas *hevein* mirip dengan kitinase tetapi struktur kimianya berbeda dan aktivitasnya tidak dapat diganggu dengan antibodi antikitinase (Parijs *et al.*, 1991). Hal ini menunjukkan sisi aktif dari *hevein* dan *pseudohevein* berbeda dengan kitinase pada umumnya.

Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa penghambatan pertumbuhan 50% beberapa penyakit tanaman dibutuhkan konsentrasi *hevein* 300 - 1250 µg/mL (Parijs *et al.*, 1991). Kandungan *hevein* adalah 20% dari total protein lateks, dengan demikian untuk menghambat miselium jamur patogen dibutuhkan 1200 - 6000 µg/mL protein total serum lateks. Aktivitas protein total diduga lebih tinggi dibandingkan aktivitas *hevein* murni karena serum lateks

juga mengandung beberapa protein lain seperti hevamin yang mempunyai aktivitas kitinase dan lisozim (Subroto, 1999) dan glukonase (Konno, 2011).

Secara visual, miselium yang kontak dengan protein mengalami beberapa perubahan seperti ketebalan hifa, tekstur miselium yang tipis dan arah perkembangan hifa. Miselium *Cercospora oryzae* yang ujungnya mendekati protein serum memiliki dinding miselium yang relatif lebih tipis. Sedangkan ciri khas untuk miselium *C. capsici*, hifanya menjadi lebih tipis dan terlihat lisis. Miselium *C. personatum* tumbuh ke atas permukaan media menjauhi daerah infiltrasi protein serum pada 4 HSI, tetapi pada 6 HSI miselium tersebut mampu melewati daerah tersebut. Beberapa jamur menghasilkan konidia lebih cepat dibandingkan kondisi normal, yang merupakan salah satu ciri jamur mengalami cekaman. Pertumbuhan *A. solani* pada media yang mengandung protein serum terlihat hampir sama dibandingkan dengan media tanpa serum. Pemberian protein serum tidak menyebabkan terbentuk zona hambat jamur *A. solani*, tetapi miselium di dekat protein lateks cenderung menipis dan lebih cepat membentuk konidia.

Pengaruh Protein Serum Lateks Terhadap Struktur Miselium Jamur Patogen

Pengamatan mikroskopis terhadap miselium di zona hambat diketahui bahwa penghambatan pertumbuhan dikarenakan adanya struktur miselium dan konidia yang

abnormal. Perlakuan protein menyebabkan miselium *C. capsici* menjadi tidak rapat dan sudah membentuk konidia pada 6 HSI. Sedangkan pada perlakuan tanpa protein serum, miselium lebih rapat dan belum terbentuk konidia pada 6 HSI. *A. solani* pada kontrol juga menunjukkan konidia yang rapat dan tebal (Gambar 3), sedangkan pada aplikasi protein serum jumlah konidia lebih sedikit dan dindingnya lebih tipis dibandingkan kontrol. Bentuk konidia pada kontrol lebih padat dibandingkan konidia yang mendapat perlakuan protein serum. Hasil pengamatan mikroskopis, makrokonidia dan hifa *C. oryzae* lebih rapuh pada perlakuan protein. Demikian halnya dengan miselium *F. oxysporum* menjadi lebih mudah lisis.

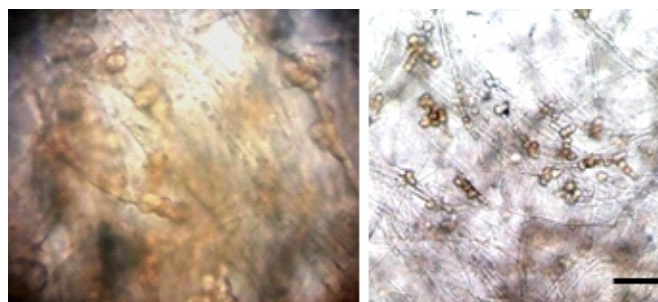
Soenartiningih, Talanca, Juniarsih, dan Yasin (2008) menyebutkan bahwa jamur yang ditumbuhkan pada media yang diberikan zat penghambatan, maka tingkat virulensinya akan menurun, sehingga memperlambat infeksi dan sporulasi. Pada *C. capsici* dalam kondisi terhambat, struktur miseliumnya tipis dan tidak membentuk konidia. Kerusakan sebagian komponen penyusun dinding sel jamur yang didominasi oleh kitin dan glukukan menyebabkan tipisnya dinding hifa jamur. Ketidaktersempurnaan struktur miselium ini diduga akan mengurangi virulensi inokulum jamur yang dihasilkan.

Secara spesifik tiap-tiap protein di dalam serum lateks mengganggu pembentukan dinding sel dan spora. *Hevein* mempunyai karakter sebagai kitinase/lisozim yang berperan dalam

penghambatan pertumbuhan miselium. Ukuran molekul kitinase lateks relatif kecil berkisar antara 25,5-27,5 kDa (Martin, 1991) dan lebih kecil dari pada kitinase yang dihasilkan oleh *Trichoderma harzianum* yaitu 33 kDa (Limon, Pintor-Toro, & Benitez, 1999). Aktivitas kitinase *hevein* lebih kuat dibandingkan dengan aktivitas kitinase yang diisolasi dari tanaman tembakau (Parijs *et al.*, 1991). Selain *hevein* masih terdapat protein lain yang mirip kitinase dan lisozim yaitu hevamin (Rozeboom, Budiani, Baintema, & Djiktra, 1990). Protein ini mempunyai berat molekul sebesar 29 kDa. Sampai saat ini telah diketahui tiga jenis hevamin yaitu hevamin A, hevamin B dan hevamin X (Subroto, 1999).

Tanaman mempunyai enzim pertahanan terhadap serangan jamur yang dikenal dengan glukukanase (Chye & Cheung, 1995). Churngchow, Suntaro, dan Wititsuwannakul (1995) telah berhasil mengidentifikasi dua jenis glukukanase di dalam lateks *Hevea brasiliensis* yaitu GI dan GII. Breton, Coupe, Sanier, dan d'Auzac (1995) telah melaporkan enzim ini di dalam lateks yang terdiri dari lima isoenzim yaitu tiga isoenzim basa dan dua isoenzim asam yang memiliki profil protein utama berukuran 38,9 kDa; 36,4 kDa dan 30,1 kDa. Secara umum enzim ini dapat menghidrolisis kitin dan polimer β -1,3-glukan yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel jamur.

Selain itu protein serum juga mengandung *lipid acyl hydrolase* yang dapat merusak membran plasma hifa jamur (Nazhirah & Faridah, 2013). Penggabungan



Gambar 3. Structure miselium *A. solani* pada perbesaran 40x, (a) miselium yang ditumbuhkan pada media tanpa protein, (b) miselium ditumbuhkan pada perlakuan protein serum. Bar menunjukkan ukuran pada 100 μ m.

Figure 3. Structur of mycelium of *A. solani* at 40x magnification, (a) mycelium grown on medium without protein, (b) mycelium grown on medium treated with serum protein. Bar showed size at 100 μ m.

aktivitas beberapa enzim antijamur tersebut memberikan daya hambat yang luas terhadap beberapa jamur dengan kekerabatan yang berbeda jauh. Parijs *et al.* (1991) melaporkan spektrum penghambatan *hevein* sangat luas. Setidaknya tujuh spesies patogen dapat dihambat oleh *hevein* diantaranya *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Phycomyces blakesleeianus*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Pyricularia oryzae*, *Septoria nodorum*, dan *Trichoderma hamatum*. Jika ditambah dengan spesies jamur yang diuji dalam penelitian ini maka dua belas spesies jamur patogen dapat dihambat. Martin (1991) melaporkan bahwa kitinase/lisozim *Hevea brasiliensis* mampu mendegradasi dinding sel bakteri *Micrococcus lysodeikticus*. Selain itu aktivitas kitinase yang dimiliki hevamin diketahui dapat menghambat pertumbuhan fungi *Cunninghamella* (Subroto, 1999). Protein serum lateks juga dapat menghambat beberapa jenis khamir (Giordani, Regli, & Buc, 2002), *Candida* sp. (Kanokwiroon *et al.* 2008; Daruliza *et al.*, 2011). Dengan demikian potensi protein serum lateks cukup tinggi dijadikan sebagai fungsida hayati untuk jamur patogen tanaman pangan dan perkebunan.

Protein lateks lain yang menarik untuk dipelajari adalah penghambat protease. Protein ini juga tergolong protein yang terkait dengan sistem pertahanan pada tanaman (Musor, Chotigeat, & Phongdara, 2008). Bunyatang, Chirapongsatongkul, dan Chungchow (2013) melaporkan penghambat protease menghambat pertumbuhan *Phytophthora palmivora*.

Kandungan protein lateks ternyata bervariasi antar klon karet. Klon GT1 memiliki aktivitas protein tinggi dibandingkan klon PR 261 dan LCB 1320. Aktivitas enzim-enzim ini juga berkorelasi dengan ketahanan klon karet tersebut terhadap penyakit-penyakit daun. Protein-protein lateks disintesis lebih tinggi pada *Hevea brasiliensis* pada tanaman yang terinfeksi oleh penyakit dibandingkan dengan yang sehat (Subroto, 1999). Yang menarik adalah ekspresi enzim-enzim ini lebih tinggi terjadi di dalam lateks dibandingkan organ lain seperti di daun dan akar (Chye & Cheung, 1995) dan karena induksi oleh pelukaan dan etilen (Breton *et al.*, 1995). Hal tersebut menguatkan bukti bahwa lateks merupakan bagian dari sistem

pertahanan pada tanaman karet dan tanaman yang menghasilkan lateks lainnya. Jumlah protein yang diisolasi dengan menggunakan metode sederhana sudah mencapai 5-9,2 g/L lateks segar, sementara prosedur sebelumnya diperoleh 10 g/L (Parijs *et al.*, 1991). Protein hasil isolasi sulit dilarutkan dengan air yang diduga adanya kontaminan. Kontaminan protein lateks diduga berasal dari kompleks peptidoglikan dan lipoprotein yang merupakan komponen penyusun membran organel dan partikel karet. Soedjanaatmadja, Subroto, dan Baintema (1995) menyebutkan kandungan protein di dalam lateks berkisar 5-10 g/L lateks. Peningkatan skala yang lebih besar untuk isolasi protein lateks perlu dilakukan untuk mendapatkan informasi konsistensi jumlah protein yang diperoleh, menetapkan alur proses dan rekayasa peralatan untuk mendukung proses tersebut.

Prospek protein ini untuk dijadikan produk antijamur hayati cukup tinggi mengingat jumlah sumber protein yang dapat dipasok secara rutin dari perkebunan karet cukup besar. Kelebihan lain dari protein ini adalah relatif stabil dengan perlakuan panas pada suhu 95°C selama 10 menit dan aktivitas *hevein* masih 95% dari kemampuan hambatan semula (Parijs *et al.*, 1991). Kestabilan pada suhu tinggi mengindikasikan adanya peluang bahwa protein-protein tersebut tahan di kondisi lapangan. Pengujian lanjutan perlu dilakukan terhadap beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas protein-protein seperti perubahan pH, kelembaban, radiasi matahari dan pengaruhnya terhadap tanaman yang diperlakukan dengan protein serum ini serta optimasi konsentrasi yang efektif.

KESIMPULAN

Koagulasi lateks segar dengan asam format 5% diikuti presipitasi protein dengan aseton menghasilkan jumlah dan kualitas protein yang cukup baik dan prospektif untuk dikembangkan dalam skala isolasi protein dalam lebih besar. Secara umum protein serum lateks menghambat pertumbuhan miselia jamur patogen melalui gangguan kerusakan dinding sel hifa dan abnormalitas konidia. Pada masa mendatang diharapkan protein lateks dapat dimanfaatkan sebagai fungsida hayati

untuk pengendali penyakit tanaman pangan dan perkebunan yang ramah lingkungan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aydin, A., Kant, C., & Turan, M. (2011). Hydrogel substrate alleviates salt stress with increase antioxidant enzymes activity of bean (*Phaseolus vulgaris* L) under salinity stress. *Afr. J. of Agric. Res.* 6(3), 715 – 724.
- Beezhold, D., Swanson, M., Zehr, B. D., & Kostyal, D. (1996). Measurement of natural rubber proteins in latex glove extract: comparison of the methods. *Annals. of Allerg., Asthma & Immun.*, 76, 520-526.
- Breton, F., Coupe, M., Sanier, C., & d'Auzac, J. (1995). Demonstration β -1,3-glucanase activities in lutoid of *Hevea brasiliensis* latex. *J. Nat. Rubb. Res.*, 10(1), 37-45.
- Bunyatang O., Chirapongsatankul N., & Chungchow N. (2013). Purification of a protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and it's effect on the growth of *Phytophthora palmivora*. *J. Plant Biochem. Biothechnol.*, 22(2): 185-192. Doi: 10.1007/s13562-012-0137-y.
- Churngchow, N., Suntaro, A., & Wititsuwannakul, R. (1995). β -1,3-glucanase isozymes from the latex *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, 39(1), 505-509.
- Chye M. L., & Cheung, K. Y. (1995). β -1,3-Glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. *Plant Mol Biol*, 29, 397-402.
- Daruliza, R. M. A., Yang, K. L., Lam, K. L., Priscilla, J. T., Sunderasan, E., & Ong, M. T. (2011). Anti-*Candida albicans* activity and brine lethality test of *Hevea brasiliensis* B-serum. *Euro. for Med. and Pharm. Sci.*, 15, 1163-1171.
- Gidrol, X., Chresting, H., Tan, H. H. L., & Khus, T. A. (1994). Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (Rubber Tree) is involve in coagulation of latex. *The J. Biol & Biochem.*, 269(12), 9278-9283.
- Giordani, R., Regli, P., & Buc, J. (2002). Antifungal effect of *Hevea brasiliensis* latex with various fungi. Its synergistic action with amphotericin B against *Candida albicans*. *Mycoses*, 45, 476 - 481.
- Jacob, J. L., Prevot, J. C., & Kekwick, R. G. O. (1989). General of *Hevea brasiliensis* latex (*with the exception of latex anabolism*). In, J. d'Auzac, J. L. Jacob, & H. Chresti (eds). *Physiology of Rubber Tree Latex* (p. 101-144). Boca Raton, USA: CRC Press, Inc.
- Kanokwiroon, K., Teanpaisan, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A. B., & Wititsuwannakul, R. (2008). Anti-microbial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses*, 51, 301-307. Doi:10.1111/j.1439-0507.2008.01490.x.
- Konno K. (2011). Plant latex and other exudates as plant defenses systems: Role of various defense chemicals and protein contained therein. *Phytochemistry*, 72, 1510-1530. Doi:10.1016/j.phytochem.2011.02.016.
- Limon, M. C., Pintor-Toro, J. A. & Benitez, T. (1999). Increase antifungal activity of *Trichoderma harzianum* transformant that overexpress a 33 KDa chitinase. *Phytophatology*, 89, 254-261.
- Martin, M. N. (1991). The latex of *Hevea brasiliensis* contains high level both chitinases/lysosimes. *Plant Physiol.*, 95, 469-476.
- Musor, A., Chotigeat, W., & Phongdara, A. (2008). Cloning and characterization of protease inhibitor from latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *KKU. Res. J.*, 8(2), 12-17.

- Nazhirah, M., & Faridah, Z. (2013). *Screening and separation of industrially usefull hydrolases from wasteful skim latex serum of Hevea brasiliensis*. R. Poqaku, et al., (edt.) *Developments in sustainable chemical and bioprocess technology*. New York, USA : Springer Science Business.
- Parijs, J. V., Broekaert, W. F., Goldstein, I. J., & Peumans, W. J. (1991). Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*, 183, 258-264.
- Rozeboom, H., Budiani, A., Baintema & Djiktra, B.W. (1990). Crystallization of hevamin, an enzyme with lysozime/chitinase activity from Hevea brasiliensis. *J. Mol. Biol*, 441-450.
- Soedjanaatmadja, U., & Subroto, T. (1995). The effluent of natural rubber factories is enriched in the antifungal protein hevein. *Bioresource Technology*, 53, 39-41.
- Soedjanaatmadja, U., Subroto, T., & Baintema, J. J. (1995). Processed products of hevein precursor latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *FEBS Letters*, 363, 211-213.
- Soenartiningih, A., Talanca., Juniarsih., & Yasin, H. G. (2008). *Pengujian beberapa varietas jagung terhadap penyakit busuk pelepah dan bulai*. Maros, Indonesia: Balai Penelitian Tanaman Serealia.
- Subroto, T. (1999). *Protein yang terkait dengan pathogenesis dari Hevea brasiliensis Muell. Arg. (Isolasi, Struktur dan Fungsi)* [Disertasi], Institut Teknologi Bandung, Indonesia.
- Suryanto, D., Wibowo, R. H., Siregar, E. M. B., & Munir, E. (2012). A possibility of chitinolytic bacteria utilization to control basal steam disease by *Ganoderma boninense* in oil palm seedling. *Afr. J microbiol*, 6(9), 2053-2059.
- Tistama, R. (2009). Tanaman karet sebagai bioreaktor berbagai senyawa yang potensial untuk industri. *Warta Perkaretan*, 28(2), 19-30
- Ukun, R. (2009). *Karakterisasi dan fungsi protein-protein spesifik dari lateks karet serta peranannya dalam produksi karet* [Skripsi], Universitas Padjadjaran, Indonesia.
- Wititsuwannakul, R., Rukseree, K., Kanokwiroon, K., & Wititsuwannakul, D. (2008). A rubber particle protein specific for Hevea latex lectin binding involved in latex coagulation. *Phytochemistry*, 69, 1111-1118.
- Yeang, H. Y., Yusof, F., & Abdullah, L. (1995). Precipitation of *Hevea brasiliensis* latex proteins with trichloroacetic acid and phosphotungstic acid in preparation for the Lowry protein assay. *Anal. Biochem*, 226(1), 35-43.