

ISOLASI DAN KARAKTERISASI ENZIM β -1,3-ENDOGLUKANASE DARI TANAMAN KUBIS (*Brassica oleracea* CV. *Capitata* L.)

Y. Sri Wulan Manuhara

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga
Kampus C Unair, Jl Mulyorejo Surabaya 60115
e-mail: wulanmanuhara@unair.ac.id

ABSTRACT

*Isolation and characterization of β -1,3-endoglucanase from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) have been done. It showed 40° C of optimum temperature, and optimum pH is 7. After the purification with hydrophobic interaction chromatography and ion exchange chromatography, its activity was increased. Based on SDS-PAGE analysis, β -1,3-endoglucanase have molecular weight around 48 kD. Antifungal activity of β -1,3-endoglucanase show that it has best inhibition zone on *Fusarium solanii* at extract from ion exchange chromatography.*

Key words: isolation, characterization, β -1,3-endoglucanase, *Brassica oleracea* var. *capitata*

PENGANTAR

Tanaman kubis (*Brassica oleracea* cv. *capitata*) banyak ditanam di Indonesia sebagai tanaman hortikultura. Dalam pembudidayaannya, diketahui bahwa tanaman kubis lebih tahan terhadap serangan penyakit daripada serangan hama. Ketahanan tanaman kubis terhadap penyakit, terutama penyakit akibat jamur diduga akibat ekspresi enzim β -1,3-endoglukanase. Menurut Selittrennikoff (2001) aktivitas antifungi β -1,3-glukanase pada tumbuhan terjadi oleh adanya kemampuan untuk menghidrolisis struktur β -glukan yang ada pada dinding sel jamur, terutama pada bagian ujung hifa di mana glukan paling banyak dijumpai sehingga dinding sel menjadi lemah, kemudian sel lisis dan mati. Selain itu aktivitas antifungi β -1,3-glukanase pada dinding sel jamur akan menyebabkan dilepaskannya elisitor yang berupa oligosakarida yang akan menginduksi terbentuknya fitoaleksin antijamur (Yoshikawa *et al.*, 1983).

Induksi terbentuknya fitoaleksin disebabkan oleh adanya suatu substansi yang dihasilkan oleh patogen yang disebut elisitor. Sistem ketahanan kedelai terhadap *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* digunakan oleh Keen dan Yoshikawa (1983) untuk menjelaskan bahwa molekul-molekul elisitor yang dilepas dari dinding sel jamur patogen disebabkan oleh adanya β -1,3-endoglukanase. Berdasarkan mekanisme hidrolisisnya, β -1,3-endoglukanase dibedakan menjadi dua yaitu endo- β -1,3- glukanase (EC 3.2.1.39) yang memecah rantai glukan secara random dan exo- β -1,3-glukanase yang melepaskan monomer glukosa dari sisi non reduktif rantai glukan (Giczey *et al.*, 2001).

Berbagai macam β -1,3-glukanase telah berhasil diisolasi dari tumbuhan. Sharma *et al.* (1993) mengisolasi β -1,3-

glukanase dari akar *Picea abies* (L.) Karst yang diinfeksi dengan *Pythium* sp. Hwang *et al.* (1997) mendapatkan β -1,3-glukanase dengan berat molekul 20 kD yang diisolasi dari tanaman *Capsicum annuum* L. yang disemprot dengan DL-amino-n-butyric acid (BABA). Salzer *et al.* (1997) mendapatkan β -1,3-glukanase dengan berat molekul 35 kD pada kultur sel *Picea abies* (L.) untuk mempelajari pengaruhnya pada jamur pembentuk mikoriza ekto. Peumans *et al.* (2000) memurnikan β -1,3-glukanase dengan berat molekul 30 kD dari buah pisang.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mencirikan (karakterisasi) enzim β -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis sebagai upaya untuk mencari sumber gen ketahanan tanaman terhadap penyakit akibat jamur.

BAHAN DAN CARA KERJA

Bahan Tanaman

Enam hibrida tanaman kubis digunakan dalam penelitian ini, untuk mengetahui kadar protein tertingginya. Enam hibrida tersebut adalah K-K Cross, Ishito, Sinjuku, Gloria Osen, Rotan osena, dan Investor, yang diperoleh dari petani di Kabupaten Batu, Malang dan Kabupaten Probolinggo. Daun tanaman kubis yang berumur dua bulan digunakan sebagai bahan untuk isolasi protein total.

Isolasi Protein Total

Tiga sampai enam gram daun tanaman kubis dibekukan (-20° C) selama beberapa jam, kemudian dihancurkan menggunakan mortar sampai menjadi serbuk. Serbuk diekstrak menggunakan 50 mM Tris HCl pH 8,2, kemudian divorteks lalu dibekukan pada suhu -20° C selama 1

jam. Ekstrak disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 5000 rpm pada suhu 4° C. Supernatan diambil, kemudian protein yang ada dalam supernatan diendapkan menggunakan ammonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40% dengan cara menggoyang larutan selama 30 menit pada suhu 4° C. Protein terjenuhkan dipisahkan dari supernatan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm selama 30 menit pada suhu 4° C. Supernatan dibuang dan pelet yang mengendap dilarutkan menggunakan akuades steril.

Penentuan kadar protein total dilakukan mengikuti prosedur *BioRad Protein Assay*. Sebanyak 2 μ L sampel protein dimasukkan ke dalam 789 akuades steril kemudian ditambahkan reagen *BioRad Protein Assay* sebanyak 200 μ L dan campuran divorteks agar homogen. Pengukuran kadar protein didasarkan pada OD₅₉₅ sampel menggunakan spektrofotometer dengan kurva standar protein BSA (*bovine serum albumin*). Profil protein dari keenam hibrida tanaman kubis diidentifikasi menggunakan SDS-PAGE. SDS-PAGE yang digunakan berdasarkan metode Laemmli (1970) menggunakan *marker* berat molekul medium range tertentu. Protein divisualisasikan dengan pewarnaan *Coomassie brilliant blue*.

Uji aktivitas β -1,3-endoglukanase

Aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase ditentukan dengan cara mengukur banyaknya gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis substrat laminarin (SIGMA). Sebanyak 100 μ L substrat laminarin 1% ditambah dengan 100 μ L enzim sampel (3%) kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 1 jam. Hasil inkubasi ditambah 600 μ L pereaksi DNS (*3,5-dinitrosalisilic acid*) kemudian dimasukkan dalam penangas air mendidih dan dipanaskan selama 15 menit. Setelah itu segera didinginkan dalam air es selama 20 menit. Aktivitas enzim diukur dengan spektrofotometer pada OD₅₅₀. Kontrol yang digunakan adalah 100 μ L enzim sampel, ditambah 100 μ L substrat dan 600 μ L pereaksi DNS, kemudian diperlakukan sama dengan kondisi sebelumnya tetapi tanpa diinkubasi.

Karakterisasi enzim β -1,3-endoglukanase

Karakterisasi enzim β -1,3-endoglukanase dilakukan terhadap enzim hasil pengendapan dengan ammonium sulfat. Karakterisasi meliputi penentuan pH optimum, suhu optimum, penentuan aktivitas spesifik enzim hasil pemurnian dengan metode kromatografi hidrofobitas dan kromatografi penukar ion, penentuan massa molekul relatif dengan SDS-PAGE.

Penentuan pH optimum enzim β -1,3-endoglukanase dilakukan pada kisaran pH 4–10 pada suhu 37° C. Larutan

buffer yang digunakan adalah 50 mM buffer fosfat-sitrat (pH 4, 5 dan 6), buffer fosfat (pH 6, 7 dan 8), dan buffer glisin-NaOH (pH 8, 9 dan 10). Aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase diukur seperti pada prosedur uji aktivitas enzim. Data yang diperoleh di rata-rata dan dibuat grafik hubungan antara tingkat pH dengan aktivitas enzim.

Penentuan suhu optimum enzim β -1,3-endoglukanase dilakukan dengan menginkubasi enzim dan substrat laminarin 1 mg/L pada berbagai tingkat suhu dengan kisaran antara 10–60° C dengan interval 10° C. Data yang diperoleh di rata-rata dan dibuat grafik hubungan antara suhu dengan aktivitas enzim.

Pemurnian β -1,3-endoglukanase dengan kromatografi interaksi hidrofobik ini dilakukan dengan cara memasukkan kapas secukupnya ke dalam kolom. Sebanyak 1–2 ml bubuk *Butil toyopearl* dalam etanol 96% dituangkan ke dalam kolom. Etanol dibiarkan turun hingga batas bubuk, kemudian membilasnya dengan 5 ml akuades. Setelah itu menuangkan NaOH 1 N sebanyak 1 ml ke dalamnya dan membilasnya kembali dengan akuades. Proses berikutnya yaitu menjenuhkan kolom menggunakan 10 ml amonium sulfat jenuh dalam buffer Tris HCl pH 7 ke dalam matriks. Sebanyak 3 ml enzim β -1,3-endoglukanase hasil dialisis dipekatkan kemudian dimasukkan ke dalam kolom dan dialiri eluen amonium sulfat dengan kejenuhan 40% dalam buffer Tris HCl pH 7 (bergradien konsentrasi tinggi ke rendah). Fraksi enzim sebanyak 1 ml ditampung dalam tabung Eppendorf.

Kromatografi penukar ion memisahkan protein enzim berdasarkan muatannya, di mana tergantung pada komposisi fasa gerak. Fasa gerak yang digunakan di sini, yaitu NaCl [0–0,5] M dalam buffer Tris HCl dengan matriks *DEAE-toyopearl* dalam kolom yang berukuran sama dengan kolom pada kromatografi interaksi hidrofobik. Dengan membuat variasi pH dan fasa gerak bergradien, maka molekul-molekul protein enzim dapat dipisahkan. Variasi pH fasa gerak tersebut dibuat pada pH 5, 6, dan 7, dengan eluen NaCl [0–0,5 M] dalam buffer Tris HCl yang dibuat bergradien dari konsentrasi rendah ke tinggi. Cara yang dilakukan, yaitu memasukkan kapas secukupnya ke dalam kolom. Sebanyak 1–2 ml bubuk *DEAE-toyopearl* dalam etanol dituangkan ke dalam kolom. Selanjutnya ke dalam matriks ditambahkan 10 mL larutan jenuh buffer Tris HCl. Sebanyak 1–2 ml enzim 1,3-endoglukanase hasil kromatografi interaksi hidrofobik dimasukkan ke dalam kolom. Fraksi enzim dipisahkan dengan mengalirkan eluen NaCl [0–0,5] M dalam buffer Tris HCl dibuat bergradien dari konsentrasi rendah ke tinggi ke dalam kolom. Selanjutnya setiap fraksi diukur kadar protein dan aktivitasnya. Untuk menentukan kondisi optimum, aktivitas yang diukur adalah

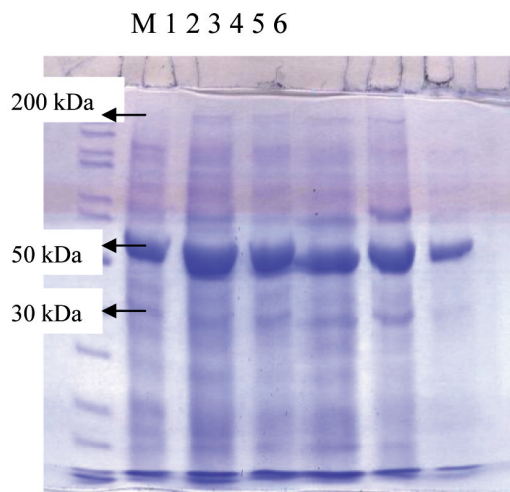
pada tiap fraksi dan tiap kondisi dalam kromatografi penukar ion.

Penentuan massa molekul relatif dengan SDS-PAGE. Enzim yang telah dimurnikan, dianalisis dengan elektroforesis SDS-PAGE. SDS-PAGE yang digunakan adalah berdasarkan Laemmli (1970) menggunakan marker berat molekul medium range tertentu. Protein enzim divisualisasikan dengan pewarnaan *Coomassie brilliant blue*.

Aktivitas antifungi ekstrak enzim β -1,3-endoglukanase terhadap kapang uji (*Fusarium solanii*) dilakukan dengan metode cakram kertas (*disc diffusion method*) menggunakan *Mueller Hinton Agar* (MHA). Suspensi mikroba uji dibuat sesuai dengan standar 0,5 Mc Farland yaitu dengan menentukan OD = 0,1 pada $\lambda_{600\text{ nm}}$. Selanjutnya 1 ml suspensi mikroba uji dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan 15 ml media MHA, dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Pada permukaan agar diletakkan tiga kertas cakram steril (berdiameter 6 mm) yang telah ditetesi 90 μ L ekstrak kasar enzim β -1,3-endoglukanase, ekstrak enzim hasil pemurnian kromatografi hidrofobik, ekstrak enzim hasil pemurnian kromatografi penukar ion dengan konsentrasi 0%, 25%, 50% dan 100% (v/v) dalam pelarut ddH₂O, yang masing-masing memiliki aktivitas sebesar 0 U/mg; 0,0085 U/mg; 0,020 U/mg; 0,058 U/mg untuk ekstrak kasar, 0 U/mg; 101,25 U/mg; 173,5 U/mg; 341,65 U/mg untuk ekstrak enzim hasil kromatografi interaksi hidrofobik, dan 0 U/mg; 34,03 U/mg; 76,19 U/mg; 120,86 U/mg untuk ekstrak enzim hasil kromatografi penukar ion. Kemudian kultur diinkubasi selama 72 jam pada suhu kamar. Terbentuknya halo (daerah hambatan) jernih di sekitar kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antifungi (Bailey dan Scoot, 1998). Diameter daerah hambatan diukur menggunakan jangka sorong.

HASIL

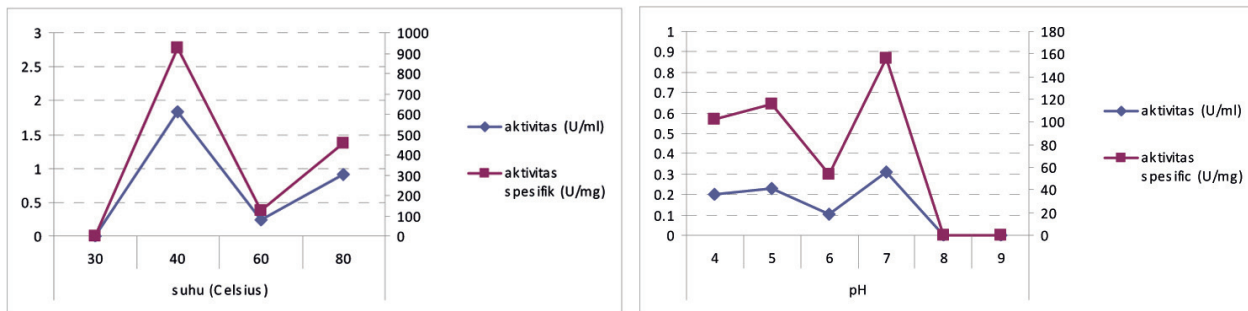
Hasil isolasi protein total dari 6 hibrida tanaman kubis dapat dilihat pada Gambar 1. Dari gambar tersebut diperoleh profil protein yang sama, tetapi dari hasil uji aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase diperoleh data aktivitas tertinggi terdapat pada hibrida Gloria Osena (data tidak ditunjukkan). Oleh karena itu untuk penentuan karakterisasi enzim β -1,3-endoglukanase digunakan tanaman kubis hibrida Gloria Osena.



Gambar 1. Profil protein dari 6 hibrida tanaman kubis (*Brassica oleracea* cv. capitata L.), (M) marker protein, (1) hibrida K-K Cross, (2) Gloria Osena, (3) Ishito, (4) Sinjuku, (5) Rotan osena, (6) Investor

Hasil optimasi suhu dan pH optimum untuk bekerjanya enzim β -1,3-endoglukanase dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil pemurnian enzim β -1,3-endoglukanase dengan metode kromatografi hidrofobik diperoleh 6 fraksi dengan



Gambar 2. Optimasi kerja enzim β -1,3-endoglukanase pada berbagai suhu (kiri) dan pH (kanan)

Tabel 1. Hasil pemurnian enzim β -1,3-endoglukanase dari berbagai tahap pemurnian

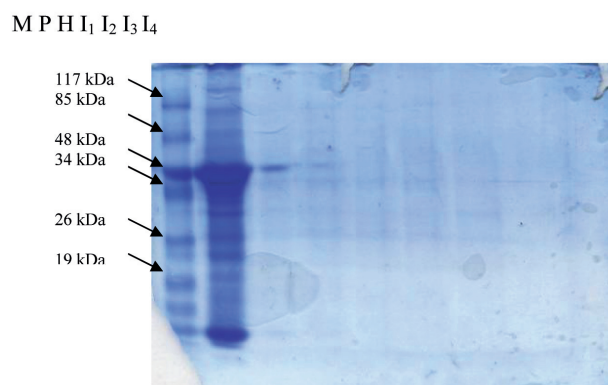
Tahap Pemurnian	Volume (mL)	Aktivitas Total (Unit)	Protein Total (mg)	Aktivitas Spesifik (U/mg)	Hasil (%)	Kemurnian
Ekstrak Kasar	100	68,2	1979,0	0,034	100	1
Pengendapan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	0,63	1,825	0,345	0,924	10,147
Dialisis	12	2,808	0,044	63,818	4,117	1,877
Kromatografi Interaksi Hidrofobik	9	6,071	0,013	467	8,902	13.735,3
Kromatografi Penukar Ion	6	2,283	0,019	120,158	3,347	3.534,1

aktivitas spesifik enzim masing-masing adalah 405, 349 U/mg; 347,831 U/mg; 341,658 U/mg; 444,219 U/mg, 305,182 U/mg, dan 338,463 U/mg. Selanjutnya keenam fraksi enzim tersebut dijadikan satu, kemudian didialisis dan dimurnikan lebih lanjut dengan metode kromatografi penukar ion (Manuhara *et al.*, 2009).

Hasil pemurnian enzim β -1,3-endoglukanase dengan metode kromatografi ion diperoleh 4 fraksi yang menunjukkan aktivitas spesifik tinggi, yaitu fraksi ke-1 (152,38 U/mg), fraksi ke-2 (136,13 U/mg), fraksi ke-3 (120,47 U/mg), dan fraksi ke-4 (120,86 U/mg) (Manuhara *et al.*, 2009). Dari semua tahapan pemurnian enzim β -1,3-endoglukanase diperoleh hasil tingkat kemurnian dari masing-masing tahapan (Tabel 1).

Pada Tabel 1 di atas, hasil (%) diperoleh dari aktivitas total masing-masing tahap pemurnian dibagi dengan aktivitas total ekstrak kasar kali 100%, sedangkan kemurnian diperoleh dari aktivitas spesifik masing-masing tahap pemurnian dibagi dengan aktivitas spesifik ekstrak kasar.

Hasil analisis SDS-PAGE untuk mengetahui kemurnian molekul enzim β -1,3-endoglukanase berdasarkan ukuran dan muatan listrik serta menentukan berat molekulnya dapat dilihat pada Gambar 4. Pada penelitian ini dilakukan SDS-PAGE untuk gabungan fraksi yang mempunyai aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase tinggi pada kromatografi interaksi hidrofobik, 4 fraksi yang mempunyai aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase pada kromatografi penukar ion dan perolehan protein total.

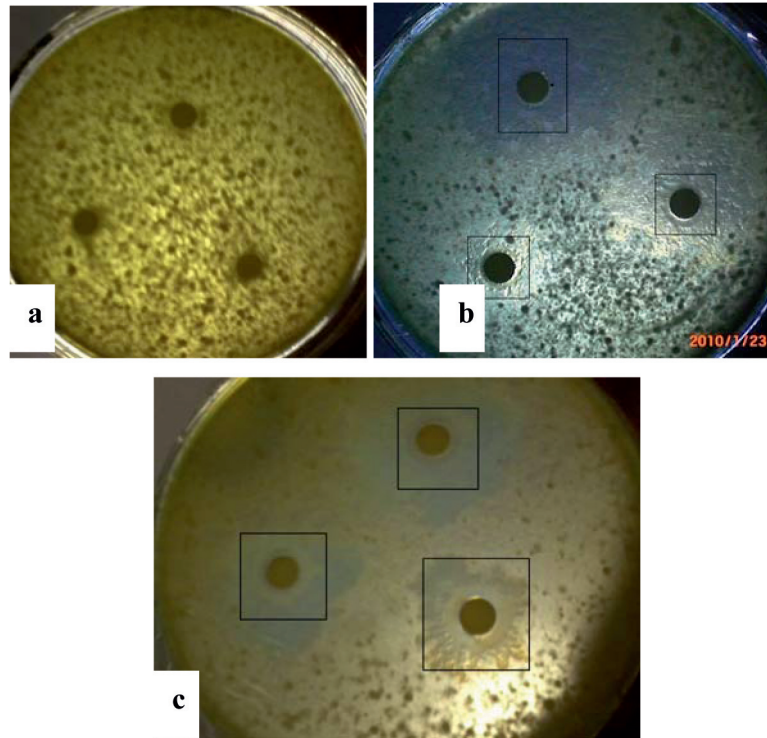


Gambar 3. Pita protein hasil analisis SDS-PAGE dari enzim β -1,3-endoglukanase tanaman kubis (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) setelah dilakukan pemurnian. M: marker protein, P: protein total, H: enzim hasil pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik, I₁, I₂, I₃, I₄: enzim hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion dari fraksi 1–4

Dari Gambar 3 diketahui terdapat 8 pita protein pada hasil isolasi protein total dari tanaman kubis, satu pita dari fraksi enzim hasil kromatografi interaksi hidrofobik, sedangkan 4 fraksi enzim (I₁–I₄) dari hasil kromatografi penukar ion tidak menunjukkan adanya pita protein. Hal ini diduga karena semakin murni, pita-pita enzim yang muncul juga semakin sedikit. Selain itu intensitas (ketebalan) pita juga semakin rendah. Berat molekul dari enzim β -1,3-endoglukanase hasil pemurnian dengan kromatografi hidrofobik adalah 48 kD.

Tabel 2. Rerata diameter zona hambat (mm) berbagai ekstrak enzim β -1,3-endoglukanase terhadap kapang *Fusarium solanii* selama 72 jam (N = 3)

Jenis ekstrak enzim β -1,3-endoglukanase	Konsentrasi (v/v)				
	0%	10%	25%	50%	100%
Ekstrak kasar	0	0	0	0	0
Ekstrak hasil pemurnian dengan kromatografi interaksi hidrofobik	0	8,08 ± 0,95	8,88 ± 1,06	5,79 ± 1,25	7,25 ± 1,64
Ekstrak hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion	0	8,46 ± 3,05	8,75 ± 1,31	10,34 ± 2,03	14,75 ± 4,67



Gambar 4. Zona hambat dari tiga macam ekstrak enzim β -1,3-endoglukanase terhadap *Fusarium solanii*, a. ekstrak kasar, b. ekstrak enzim hasil pemurnian dengan kromatografi hidrofobik, c. ekstrak enzim hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion. Tanda menunjukkan daerah zona hambat.

Hasil penentuan aktivitas antifungi enzim β -1,3-endoglukanase terhadap kapang *Fusarium solanii* menunjukkan bahwa zona hambat terbesar dijumpai pada ekstrak hasil pemurnian dengan kromatografi penukar ion, yaitu 14,75 mm dengan konsentrasi enzim 100% (v/v) (Tabel 2). Tetapi dari hasil tersebut juga diketahui bahwa pada konsentrasi 10% (v/v) baik pada ekstrak hasil pemurnian kromatografi hidrofobik maupun kromatografi penukar ion sudah dapat menghambat pertumbuhan kapang *Fusarium solanii*, sedangkan pada ekstrak kasar tidak mempunyai aktivitas antifungi. Zona hambat dari dari ekstrak ditunjukkan pada Gambar 3.

PEMBAHASAN

Karakteristik enzim β -1,3-endoglukanase dari tanaman kubis (*B. Oleracea* var. *capitata*) kultivar Gloria Osena adalah enzim tersebut mempunyai aktivitas optimum pada suhu 40° C dan pH 7 dan mempunyai berat molekul 48 kD. Berat molekul enzim β -1,3-endoglukanase yang berhasil diisolasi dan dimurnikan dari tanaman kubis cukup besar dibanding β -1,3-endoglukanase lain yang diisolasi dari berbagai tanaman seperti *Capsicum anuum* L mempunyai berat molekul 20 kD (Hwang *et al.*, 1997), *Picea abies*

(L.) Karst mempunyai berat molekul 35 kD (Salzer *et al.*, 1997) dan dari buah pisang mempunyai berat molekul 30 kD (Peumans *et al.*, 2000).

Hasil pemurnian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan kemurnian enzim β -1,3-endoglukanase dari gabungan 9 fraksi pada kromatografi interaksi hidrofobik sebesar 13.735,3 kali dari ekstrak kasarnya, sedangkan kemurnian enzim β -1,3-endoglukanase dari 6 fraksi pada kromatografi penukar ion sebesar 3.534,1 kali dari ekstrak kasarnya. Dari data tersebut di atas juga diketahui bahwa terjadi penurunan tingkat kemurnian dari fraksi hasil kromatografi penukar ion. Penyebab penurunan kemurnian ini diduga seiring dengan menurunnya kandungan enzim. Selain itu penurunan tingkat kemurnian juga disebabkan masih terdapatnya kontaminan (protein lain selain protein target). Pemurnian yang baik dinilai dari tingkat kemurnian dan persentase hasil. Tingkat kemurnian yang tinggi dan persentase hasil yang rendah, berarti kandungan proteinnya sedikit (tidak banyak kontaminan). Persentase hasil yang tinggi dengan tingkat kemurnian yang rendah berarti masih terdapatnya banyak kontaminan (protein lain selain protein target) (Berg *et al.*, 2003).

Hasil uji aktivitas enzim β -1,3-endoglukanase terhadap kapang patogen tanaman *Fusarium solanii* didapatkan

bahwa pada hasil pemurnian dengan metode kromatografi hidrofobik dan kromatografi penukar ion enzim mempunyai daya hambat yang cukup besar dibanding pada ekstrak kasar (Gambar 4). Hal ini menunjukkan hubungan yang linier antara tingkat kemurnian enzim dengan aktivitas enzim dan kemampuan daya hambat enzim terhadap kapang patogen tanaman *Fusarium solanii*.

Telah diketahui bahwa sel tanaman dikelilingi oleh dinding sel yang tebal dan kuat yang tersusun atas kompleks polisakarida dan berbagai macam protein (Corpita dan Gibeaut, 1993; Retter, 2002; O'Neill dan York, 2003). Oleh karena itu, struktur dinding sel merupakan bagian penting dalam pertahanan tanaman melawan patogen. Patogen tanaman, terutama mikroba patogen merusak dan mengambil makanan dari dinding sel tanaman dengan cara mensekresi enzim pendegradasi polisakarida, yaitu jenis ekso- dan endopolygalacturonase yaitu selulase, pektinase, rhamnogalacturonase dan xylanase (Walton, 1994; de Vries dan Visser, 2001; Lev dan Horwitz, 2003). Tetapi, tanaman mempertahankan diri dari serangan mikroba patogen (bakteri, fungi dan oomycetes) melalui glikanhidrolitik yang ada di dalam dinding selnya. Jenis glikanhidrolitik yang telah diketahui paling baik dalam menghidrolisis dinding sel mikroba adalah jenis glukanhidrolase, yaitu chitinase dan β -1,3-endoglukanase. Beberapa di antaranya telah diketahui mempunyai respons terhadap patogen tertentu (Broglie *et al.*, 1991; Grison *et al.*, 1996; Jin *et al.*, 1999; Laubner-Metzger dan Meins, 1999).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa β -1,3-endoglukanase yang berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari tanaman kubis kultivar Gloria Osen mempunyai daya hambat yang cukup tinggi terhadap kapang *Fusarium solanii*. Ganiger *et al.*, 2009 mendapatkan β -1,6-endoglukanase dari *Trichoderma harzianum* dan *Trichoderma virens* yang dapat menghambat pertumbuhan *Sclerotium rolfsii*. Selain itu Yoshikawa *et al.*, 1993 juga memperoleh tanaman tembakau transgenik yang resisten terhadap kapang patogen *Botrytis cinerea*, akibat ekspresi β -1,3-endoglukanase dari kedelai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada DP2M DIKTI atas pendanaan penelitian ini melalui HIBAH BERSAING dengan Nomor kontrak: 016/SP2H/PP/DP2M/III/2007. Selain itu penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ni Nyoman Tri Puspaningsih dan Dra. Sri Puji Astuti, M.Si atas bantuannya dalam penelitian ini.

KEPUSTAKAAN

- Bailey WR dan EG Scoot, 1998. *Diagnostic Microbiology* 7th ed. Mosby Inc. Saint Louis.
- Berg JM, Tymoczko JL, Strayer L, 2003. *Biochemistry*, Fifth Edition, United State of America.
- Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, 1991. Transgenic plant with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194–7.
- Corpita NC dan Gibeaut DM, 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: concistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1–30.
- De Vries RP dan Visser J, 2001. Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65: 497–522.
- Ganiger MC, Bhat S, Chettri P, Kuruvinashetti MS, 2009. Production of endoglukanase by *Trichoderma* for control of phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *J.App.Sci. Res* 5(7): 870–5.
- Giczey G, Kerényi Z, Fulop L, dan Hornok L, 2001. Expressing of *cmg1*, an exo- β -1,3-glucanases gene from *Coniothyrium minitans*, increase during sclerotial parasitism, *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 865–71.
- Grison RB, Grezes-Besset B, Schneider M, Lucante N, Olsen L, 1996. Field tolerance to fungal pathogens of *Brassica napus* constitutively expressing chimeric chitinase gene. *Nat. Biotechnol.* 14: 643–56.
- Jin W, Horner HT, Palmer RG, dan Shoemaker RC, 1999. Analysis and mapping of gene families encoding beta 1,3-glucanases of soybean. *Genetics* 153: 445–52.
- Keen NT dan Yoshikawa N, 1983. β -1,3-endoglukanase from soybean release elicitor-active carbohydrate from fungus cell wall. *Plant Physiol.* 7: 460–5.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–5.
- Leubner-Metzger G, dan Meins F Jr, 1999. Function and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2), pp. 49–76 in *Pathogenesis Related Protein in Plants*, edited by SK Datta and S. Muthukrisnan. CRC Press LLC, Boca Raton, FL.
- Lev S dan Horwitz BA, 2003. A mitogen-activated protein kinase pathway modulates the expression of two cellulose genes in *Cochliobolus heterostrophus* during plant infection. *Plant Cell* 15: 835–44.
- Manuhara YSW, Astuti SP, Puspaningsih NNT, 2009. Purification of β -1,3-glucanase isolated from cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata L.) by ion exchange chromatography. Proceeding Second International Conference and Workshop on Basic and Applied Sciences. Johor Bahru, Malaysia.
- O'Neill MA dan York WS, 2003. The composition and structure of plant primary wall, pp. 1–54 in *The Plant Cell Wall*, edited by J Rose, Blackwell Publishing, Oxford.

- Peumans WJ, Barre A, Derycke V, Rouge P, Zhang W, May GD, delcour JA, van Leuven F, dan van Damme JM, 2000. Purification, characterization and structural analysis of an abundant β -1,3-glucanase from banana fruit. *Eur. J. Biochem*, 267: 1188–95.
- Retter WD, 2002. Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 536–42.
- Salzer P, Hubner B, Sirrenberg A, dan Hager A, 1997. Differential effect of purified in spruce roots infected with a pathogenic *Phytium* sp. Isolate include chitinases and β -1,3-glucanase. *Phys. Mol. Plant Pathology*, 43: 57–67.
- Selitennikoff CP, 2001. Antifungal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2883–94.
- Walton JD, 1994. Deconstructig the cell wall. *Plant Physiol.* 104: 1113–8.
- Yoshikawa M, Tsuda M, dan Takeuchi Y, 1993. Resistance to fungal disease in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean. *Naturwissenschaften* 80: 417–20.

Reviewer: **Fatchiyah, Ph.D**