



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**INDUKSI RESPONS PERTAHANAN TANAMAN TEMBAKAU  
(*Nicotiana tabacum*) OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI  
*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* DAN *Pseudomonas syringae* pv.  
*glycinea***

**TESIS**

**PIPIT MARIANINGSIH**

**0906650975**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JULI 2012**



**UNIVERSITAS INDONESIA**

**INDUKSI RESPONS PERTAHANAN TANAMAN TEMBAKAU  
(*Nicotiana tabacum*) OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI  
*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* DAN *Pseudomonas syringae* pv.  
*glycinea***

**TESIS**

**Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains**

**PIPIT MARIANINGSIH**

**0906650975**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
PROGRAM PASCASARJANA  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
DEPOK  
JULI 2012**

## HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Tesis ini adalah hasil karya saya sendiri,  
dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk  
telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Pipit Marianingsih

NPM : 0906650975

Tanda Tangan : 

Tanggal : 26 Juni 2012

JUDUL : INDUKSI RESPONS PERTAHANAN TANAMAN  
TEBBAKAU (*Nicotiana tabacum*) OLEH  
LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI *Pseudomonas syringae*  
pv. *tabaci* DAN *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Nama : PIPIT MARIANINGSIH

NPM : 0906650975

**MENYETUJUI:**

**1. Komisi Pembimbing**



Dr. Andi Salamah  
Pembimbing I

**2. Penguji**



Dr. Wibowo Mangunwardoyo  
Penguji I



Dra. Lestari Rahayu F.K., M.Sc.  
Penguji II

**3. Ketua Program Studi Biologi  
Program Pascasarjana FMIPA UI**



Dr. Luthfirda Sjahfirdi, M. Biomed.

**4. Ketua Program Pascasarjana  
FMIPA-Universitas Indonesia**



Dr. Adi Basukriadi, M.Sc.

Tanggal Lulus: 02 Juli 2012

## HALAMAN PENGESAHAN

Tesis ini diajukan oleh :

Nama : Pipit Marianingsih  
NPM : 0906650975  
Program Studi : Biologi  
Judul Tesis : Induksi respons pertahanan tanaman tembakau  
(*Nicotiana tabacum*) oleh lipopolisakarida  
bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan  
*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Telah berhasil saya pertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Magister Sains pada Program Studi Biologi, Program Pascasarjana, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

### DEWAN PENGUJI

Pembimbing : Dr. Andi Salamah (.....)

Penguji : Dr. Wibowo Mangunwardoyo (.....)

Penguji : Dra. Lestari Rahayu F.K., M.Sc. (.....)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 02 Juli 2012

**HALAMAN PERNYATAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS  
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

---

Sebagai sivitas akademik Universitas Indonesia, saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Pipit Marianingsih  
NPM : 0906650975  
Program Studi : Biologi  
Departemen : Biologi  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jenis Karya : Tesis

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hal Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty Free Right*)** atas karya ilmiah saya yang berjudul:

**Induksi respons pertahanan tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) oleh lipopolisakarida bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea***

Beserta perangkat yang ada jika diperlukan. Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Indonesia berhak menyimpan, mengalihmedia/format-kan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (database), merawat, dan memublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di: Depok  
Pada tanggal: 02 Juli 2012  
Yang Menyatakan



(Pipit Marianingsih)

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil 'alamin, penulis panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT, atas segala kasih sayang dan kuasa-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan tesis ini dengan upaya yang terbaik. Shalawat serta salam penulis haturkan kepada teladan kita Nabi Muhammad SAW beserta keluarga, sahabat dan para pengikutnya dalam cahaya islam.

Terimakasih yang tidak terhingga penulis haturkan kepada Dr. Andi Salamah selaku pembimbing atas segala kesabaran dan pengertiannya dalam membimbing selama penelitian, penulisan tesis maupun semasa perkuliahan. Terlebih atas kesempatan dan kepercayaan yang diberikan sehingga penulis bisa merasakan menimba ilmu di negeri Sakura. Terimakasih pula penulis ucapkan kepada Dr. Wibowo Mangunwardoyo dan Dra. Lestari Rahayu selaku penguji atas segala arahan dan masukan untuk perbaikan tesis ini. Terimakasih sebanyak-banyaknya penulis haturkan kepada Dr. Luthfiralda S., M. Biomed. selaku Ketua Program Studi Biologi Program Pascasarjana FMIPA-UI, Dr. Nisyawati selaku Sekretaris Program Pascasarjana Biologi FMIPA UI sekaligus pembimbing akademik, atas segala bantuan dan arahnya selama ini. Tidak lupa penulis ucapkan terimakasih kepada Dr. Susiani Purbaningsih, Mega Atria, M.Si serta segenap dosen-dosen Biologi UI atas segala ilmu, bantuan serta inspirasinya selama masa perkuliahan di kampus.

Terimakasih untuk Mba ku (Evi Setiawati Sulardi), sahabat-sahabat seperjuanganku (Ka Windri, Afi, Pak Dian, Mba Winda, Angga, Irul, Bu yus, Merka, Ike, Flo, Wahyu, Sephy, pak Eris) atas bantuan, semangat dan warnawarni persahabatan yang tidak ternilai harganya. Terimakasih pada Dian dan Subhan atas ilmu-ilmu yang diberikan demi kelancaran penyelesaian tesis ini. Serta kepada rekan-rekan Program Pascasarjana Universitas Indonesia 2008-2012 yang tidak akan cukup disebutkan satu persatu terimakasih atas dukungan dan segala keceriaan yang diberikan. Saudara-saudaraku penghuni Kosan (Kholifah "Ipeh", Yomi, ka tuti, Maryam), GOTIGERS (Saifudin "Ipul", Annisa "Emon", Putri, dan Bio UI '03 lainnya), terimakasih atas perhatian dan dukungannya

selama ini. Selanjutnya, kepada rekan-rekan seprofesi di Program Studi Biologi FKIP Universitas Sultan Ageng Tirtayasa, terimakasih atas dukungannya.

Ucapan terimakasih juga penulis sampaikan kepada pihak-pihak yang telah membantu kelancaran studi dan penelitian, DIKTI atas BPPS yang diberikan, program JENESYS (*Japan-East Asia Network of Exchange for Students and Youths*) atas beasiswa dan kesempatan emas yang diberikan. Tak lupa terimakasih sebesar-besarnya disampaikan pada dosen dan teman-teman di Laboratorium Penyakit Tanaman dan Rekayasa Genetik Fakultas Pertanian, Universitas Okayama (Yuki Ichinose sensei, Taguchi-san, Chi-san, dan Watanabe-san) atas bantuan dan arahan selama penulis melakukan penelitian disana.

Hormat dan bakti penulis persembahkan kepada Bapak Madsupi (Alm.) dan Mama Rohimah yang telah merawat dan mendidik penulis dengan penuh kasih sayang, kesabaran dan limpahan doa yang tidak pernah putus. AA Rosyadi, AA Lyus, dede Dea, teteh-tetehku dan keponakan-keponakanku terima kasih tak terkira atas dukungan, pengertian serta doa yang tulus.

Penulis menyadari bahwa penyusunan tesis ini masih jauh dari sempurna, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga tesis ini dapat bermanfaat bagi para Pembaca.

Penulis

2012



## ABSTRAK

Nama : Pipit Marianingsih  
Program studi : Pascasarjana Biologi  
Judul : Induksi Respons Pertahanan Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*) oleh Lipopolisakarida Bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Telah dilakukan penelitian yang bertujuan untuk menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau oleh lipopolisakarida (LPS). LPS diekstraksi dari bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl). Respons pertahanan tanaman yang diamati adalah deposisi *callose* dan ekspresi gen terkait pertahanan (*PAL*, *HIN 1* dan *HSR 203J*). Untuk pengamatan deposisi *callose*, daun tembakau diinfiltrasi dengan LPS Pta dan Pgl (400 µg/ml dan 800 µg/ml) serta diinkubasi selama 24 dan 48 jam. Selanjutnya, klorofil daun diluruhkan menggunakan larutan laktofenol dan diwarnai dengan *aniline blue*. Deposisi *callose* diamati dibawah mikroskop fluoresensi. Hasil pengamatan menunjukkan LPS bakteri Pgl menginduksi deposisi *callose* lebih banyak dibandingkan LPS bakteri Pta. Pengamatan ekspresi gen-gen terkait pertahanan dilakukan pada daun tembakau yang diinfiltrasi dengan 400 µg/ml LPS bakteri Pta and Pgl, serta diinkubasi selama 6 jam. Hasil RT-PCR terhadap daun tembakau menunjukkan LPS bakteri Pta dan Pgl mampu menginduksi ekspresi gen *HIN 1*, tetapi tidak mampu menginduksi ekspresi gen *PAL* dan *HSR 203J*. Gen *HIN 1* terekspresi lebih kuat pada daun tembakau yang diinduksi oleh LPS bakteri Pgl daripada LPS Pta. Hasil penelitian mengindikasikan bahwa LPS bakteri Pgl menginduksi respons pertahanan daun tembakau lebih baik daripada LPS bakteri Pta.

Kata Kunci: deposisi *callose*; gen terkait pertahanan; tembakau; lipopolisakarida, *Pseudomonas syringae*.

## ABSTRACT

Nama : Pipit Marianingsih  
Program studi : Pascasarjana Biologi  
Judul : Induction of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

The aim of this study is to know the induction of tobacco defense responses by using lipopolysaccharides (LPS) which extracted from two phytopathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) and *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl). The plant defense responses that observed are callose deposition and expression of defense-related genes (*PAL*, *HIN 1* and *HSR 203J*). To detect callose deposition, tobacco leaves were infiltrated with 400 µg/ml and 800 µg/ml LPS Pta and Pgl, then incubated for 24 or 48 hr. Tobacco leaves were cleared in lactophenol solution, stained with aniline blue, then visualized by fluorescence microscopy. The result showed that LPS from Pgl induced more callose deposition than that from Pta in tobacco leaves. To investigate defense-related genes expression, tobacco leaves were infiltrated with 400 µg/ml LPS extracted from Pta and Pgl, then incubated for 6 hr. Analysis of defense-related genes expression were conducted by RT-PCR and visualized by electrophoresis on a 1.8% agarose gel. The result showed LPS Pta and Pgl can induce expression of *HIN 1* gene in tobacco leaves, but can not induce the *PAL* and *HSR 203J* genes. The *HIN 1* gene was highly expressed in tobacco leaves induced by LPS Pgl. The result indicates that tobacco could effectively recognize LPS of nonhost pathogen Pgl but not in host pathogen Pta.

Keywords: callose deposition; defense-related gene; lipopolysaccharide; *Pseudomonas syringae*; tobacco.

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS .....	iii
HALAMAN PENGESAHAN .....	v
HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
ABSTRAK .....	ix
ABSTRACT .....	x
DAFTAR ISI .....	xi
DAFTAR GAMBAR .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN .....	xvi
SUMMARY .....	xvii
PENGANTAR PARIPURNA .....	1
MAKALAH I: INDUKSI DEPOSISI <i>CALLOSE</i> PADA TANAMAN TEMBAKAU ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI <i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv. tabaci</i> DAN <i>Pseudomonas syringae pv. glycinea</i> .....	9
Abstract .....	9
Pendahuluan .....	10
Metode Penelitian .....	12
Hasil dan Pembahasan .....	16
Kesimpulan .....	34
Saran .....	34
Daftar Acuan .....	35
Lampiran .....	39
MAKALAH II: EKSPRESI GEN <i>PAL</i> , <i>HIN 1</i> DAN <i>HSR 203J</i> PADA TANAMAN TEMBAKAU ( <i>Nicotiana tabacum</i> ) YANG DIINDUKSI OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI <i>Pseudomonas syringae pv. tabaci</i> DAN <i>Pseudomonas</i> <i>syringae pv. glycinea</i> .....	43
Abstract .....	43
Pendahuluan .....	44
Metode Penelitian .....	46
Hasil dan Pembahasan .....	51
Kesimpulan .....	59
Saran .....	60
Daftar Acuan .....	60

DISKUSI PARIPURNA .....	65
RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN.....	71
DAFTAR ACUAN .....	72



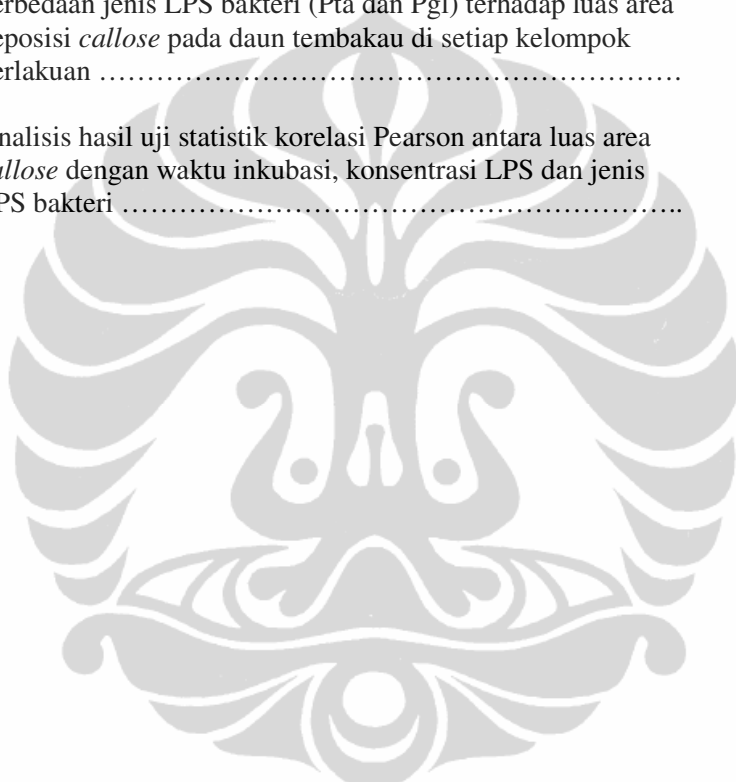
## DAFTAR GAMBAR

Gambar		Halaman
1	Skema pembagian tiga kelompok bentuk respons pertahanan tanaman berdasarkan waktu relatif dan tempat penginduksian .....	2
2	Jenis PRRs yang mengenali PAMP/MAMP .....	4
3a	Struktur umum bakteri Gram negatif .....	5
3b	Struktur selubung sel bakteri Gram negatif .....	5
4	Struktur umum lipopolisakarida (LPS) bakteri Gram negatif .....	6
I.1	Visualisasi hasil elektroforesis LPS bakteri <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) .....	17
I.2	Daun tembakau .....	18
I.3	Pengamatan mikroskopik deposisi <i>callose</i> pada daun tembakau .....	19
I.4	Trikom dengan kepala berglandular pada <i>Nicotiana</i> .....	20
I.5	Pengamatan mikroskopik intensitas deposisi <i>callose</i> dalam satu daun tembakau, yang diinduksi oleh LPS <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) dengan masa inkubasi selama 48 jam .....	21
I.6	Pengamatan mikroskopik kecenderungan penampakan deposisi <i>callose</i> pada daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) dengan masa inkubasi 24 jam .....	22
I.7	Pengamatan mikroskopik kecenderungan penampakan deposisi <i>callose</i> pada daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) dengan masa inkubasi 48 jam .....	23

I.8	Grafik hasil uji statistik Duncan mengenai pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri ( <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl)) dengan luas area deposisi <i>callose</i> pada daun tembakau di setiap kelompok perlakuan .....	26
I.9	Pengamatan visual terhadap kondisi kesegaran ( <i>fitness</i> ) daun tembakau yang diinfiltrasi oleh LPS bakteri an diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam .....	31
II.1	Visualisasi hasil elektroforesis LPS bakteri <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) .....	52
II.2	Ekspresi RNA dan gen <i>EF-1<math>\alpha</math></i> pada daun tembakau yang diinjeksi oleh LPS 400 $\mu$ g/ml LPS bakteri <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i> (Pta) dan <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i> (Pgl) dan diinkubasi selama 6 jam .....	53
II.3	Ekspresi gen <i>EF-1<math>\alpha</math></i> dari sampel kontrol positif dan negatif cDNA daun tembakau yang diinfiltrasi LPS bakteri Pta dan Pgl serta diinkubasi selama 6 jam .....	54
II.4	Ekspresi RNA, gen <i>EF-1<math>\alpha</math></i> , <i>PAL</i> dan <i>HIN 1</i> pada daun tembakau yang diinfiltrasi H <sub>2</sub> O dan LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta diinkubasi selama 6 jam .....	57
II.5	Ekspresi RNA, gen <i>EF-1<math>\alpha</math></i> , dan gen <i>HSR 203J</i> pada daun tembakau yang diinfiltrasi H <sub>2</sub> O dan LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta diinkubasi selama 6 jam .....	59
5	Skema tahapan pengenalan LPS pada Vertebrata oleh kompleks “ <i>pattern recognition receptors</i> ” ekstraselular dan mekanisme sinyaling yang terlibat didalamnya .....	67
6	Interaksi tanaman-patogen berdasarkan hipotesis “ <i>gene-for-gene</i> ” .....	70

## DAFTAR TABEL

Tabel		Halaman
1	Molekul yang dapat berperan sebagai PAMP/MAMP .....	3
I.1	Total luas area deposisi <i>callose</i> ( $\mu\text{m}^2$ ) dalam satu daun tembakau di setiap perlakuan .....	24
I.2	Hasil perhitungan statistik uji Duncan mengenai pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri (Pta dan Pgl) terhadap luas area deposisi <i>callose</i> pada daun tembakau di setiap kelompok perlakuan .....	32
I.3	Analisis hasil uji statistik korelasi Pearson antara luas area <i>callose</i> dengan waktu inkubasi, konsentrasi LPS dan jenis LPS bakteri .....	33



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1 Kuantifikasi area deposisi <i>callose</i> menggunakan <i>software photoshop CS 5</i> .....	39
2 Tabel total luas area deposisi <i>callose</i> pada setiap sampel daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri .....	40
3 Tabel hasil uji normalitas data .....	42
4 Tabel hasil uji homogenitas data menggunakan uji ANOVA ...	42





Title: INDUCTION OF TOBACCO (*Nicotiana tabacum*) DEFENSE RESPONSES BY BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* AND *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Thesis Supervisor: Dr. Andi Salamah

---

## SUMMARY

Plants has a variety of defense responses to protect themselves against pathogens. In general, the defense consist of two kinds mechanisme, passive and active defense mechanisme. The induction of active defense responses of plants can be an effort to control pathogen. These defenses can be induced when plants recognize pathogens. Plants recognition of pathogen or pathogen molecules, known as Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns (PAMP/MAMP), by Pattern-Recognition Receptors (PRRs) on plant cells surface. One of significant MAMP molecules is lipopolysaccharide (LPS), a major component of outer membrane Gram negative bacteria.

Lipopolysaccharides (LPS) are ubiquitous components of the outer membrane in Gram-negative bacteria. LPS may play a number of important roles in the interactions of bacterial pathogens with eukariotic host. General structures of LPS consists of three parts, lipid A, core oligosaccharide, and a chain of oligosaccharide repeating units called O-chain or O-antigen. As a MAMP, LPS can be recognized by the pattern recognition receptors (PRRs), and induce plant defense responses. It was reported that O-antigen oligosaccharides as well as core oligosaccharide and lipid A moieties have activity to induce plant defense response. However the mechanisms of LPS perception by plants are still obscure.

In this study was analyzed LPS-induced defense responses in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. LPS was extracted from tobacco pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) and soybean pathogen *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl). The structure of O-antigen repeating units of these pathovars are

recently identified. The O-antigen repeating units of Pta LPS is  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-}(1\rightarrow)]_n$ , whereas that of Pgl LPS comprises only D-rhamnan and is  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-}(1\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-}(1\rightarrow)]_n$ .

Studies on *callose* deposition and expression of defense-related genes were done to determine tobacco defense responses. Callose is  $\beta$ -(1,3)-glucan polymer that serves as an effective barriers that are induced at the sites of pathogen attack. In the callose deposition study, tobacco leaves were infiltrated with 400  $\mu\text{g/ml}$  and 800  $\mu\text{g/ml}$  Pta LPS or Pgl LPS, and incubated for 24 hr or 48 hr. For detection of callose deposition, leaves were cleared in lactophenol solution, stained with aniline blue, then visualized by fluorescence microscopy. The result showed LPS from Pgl induced more callose deposition than that from Pta in tobacco leaves. In the gene expression study, three defense-related genes were observed, those are *PAL* (*Phenylalanine Ammonia Lyase*) gene, *HIN 1* (*Harpin-induced 1*) gene and *HSR 203J* (*Hypersensitive Response*) gene. For that, tobacco leaves were infiltrated with 400  $\mu\text{g/ml}$  LPS extracted from Pta and Pgl bacteria, then incubated for 6 hr. Analysis of defense-related genes expression were conducted by RT-PCR and visualized by electrophoresis on a 1.8% agarose gel. The result showed LPS extracted from Pta and Pgl bacteria can induce expression of *HIN 1* gene in tobacco leaves, but can not induce the *PAL* and *HSR 203J* gene. The result indicates that tobacco could effectively recognize LPS of nonhost pathogen Pgl but not that of host pathogen Pta. Plant tobacco showed different response against LPS Pta and Pgl due to different structure on the O-antigen repeating units in both bacteria, that lead to the different recognition by the receptors of tobacco plants.

**xviii + 76 pp.; 21 plates; 4 tables; 4 appendixes**

**Bib.: 73 (1977-2011).**

## PENGANTAR PARIPURNA

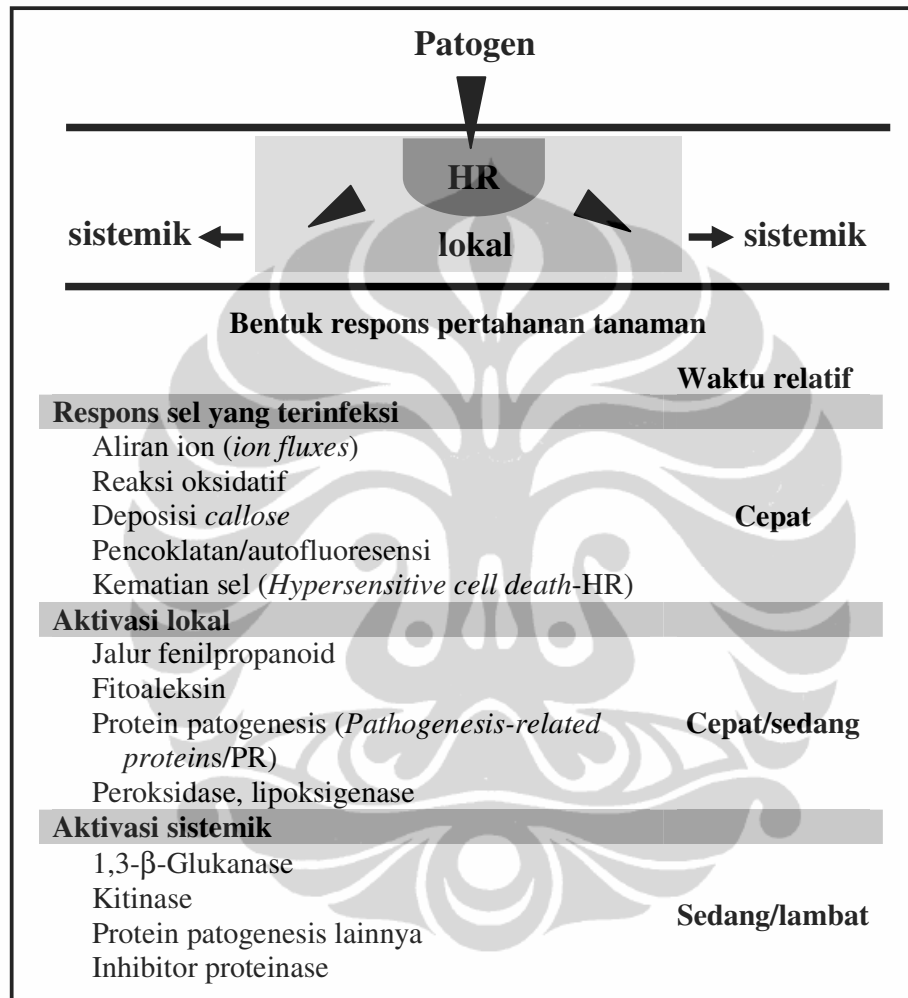
### A. Respons Pertahanan Tanaman

Tanaman merupakan organisme yang rentan terhadap paparan patogen (Chakravarthy *et al.* 2010). Menurut Zipfel (2008), setidaknya terdapat dua faktor yang menyebabkan kondisi demikian. Pertama, tanaman merupakan organisme yang tidak melakukan gerak secara aktif, sehingga sulit menghindari serangan patogen. Kedua, tanaman tidak memiliki sel-sel khusus yang terspesialisasi untuk mengenali dan mengatasi patogen, seperti sel makrofag pada hewan. Kondisi-kondisi tersebut mengharuskan tanaman memiliki sistem pertahanan yang sangat baik untuk mengatasi patogen.

Secara umum, sistem pertahanan tanaman dikelompokkan menjadi dua kategori, yaitu sistem pertahanan pasif (*preformed/constitutive defense*) dan pertahanan aktif (*inducible defense*) (Gwinn *et al.* 2006; Buonauro 2008). Sistem pertahanan pasif yaitu sistem pertahanan yang sudah ada pada tanaman, dapat berbentuk pertahanan fisik maupun kimia. Struktur dinding sel yang kaku dan lapisan lilin di permukaan daun merupakan contoh-contoh pertahanan fisik. Struktur fisik tersebut dapat menghambat penetrasi patogen ke dalam sel tanaman. Selain itu, tanaman juga menyintesis senyawa metabolit sekunder seperti fenol, saponin, terpenoid dan tannin, sebagai bentuk pertahanan kimia yang dapat menjadi racun atau menyebabkan kondisi lingkungan yang kurang baik bagi pertumbuhan patogen (Agrios 2005; Gwinn *et al.* 2006; Lancioni 2008).

Sistem pertahanan aktif dikenal juga sebagai sistem pertahanan yang terinduksi, karena sistem pertahanan tersebut akan terinduksi jika tanaman mengenali patogen. Bentuk sistem pertahanan terinduksi pada tanaman dapat berupa pembentukan deposisi *callose*, sintesis *nitric oxide* (NO), sintesis *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) atau *oxidative burst*, produksi senyawa antimikroba fitoaleksin, lignifikasi dinding sel, aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), aktivasi *pathogenesis-related protein* (PR), induksi *Hypersensitive Response* (HR), dan induksi gen-gen terkait pertahanan tanaman (Strange 2003; Agrios 2005; Buonauro 2008). Lebih lanjut, berdasarkan Kombrink & Somssich

(1995) respons pertahanan terinduksi dapat dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan waktu dan tempat penginduksian, yaitu respons pertahanan yang terinduksi cepat (*early defense responses*), respons pertahanan lokal, dan respons pertahanan sistemik (Gambar 1).



Gambar 1. Skema pembagian tiga kelompok bentuk respons pertahanan tanaman berdasarkan waktu relatif dan tempat penginduksian [Sumber: Kombrink & Somssich 1995].

Penginduksian respons pertahanan tanaman dapat menjadi upaya pengendalian patogen penyebab penyakit. Induksi respons pertahanan tanaman tersebut termasuk dalam mekanisme pengendalian patogen dengan memanfaatkan materi biologi (kontrol biologi). Kontrol biologi dianggap sebagai cara yang lebih baik dan lebih ramah lingkungan dibandingkan dengan kontrol kimia, yaitu

penggunaan senyawa kimia untuk mematikan patogen (Spencera *et al.* 2003). Dengan cara kontrol biologi, pengendalian patogen tidak terfokus pada upaya untuk mematikan patogen tetapi lebih pada upaya untuk meningkatkan sistem pertahanan yang ada pada tanaman dalam mengatasi patogen.

Induksi respons pertahanan tanaman diawali dengan tahap pengenalan patogen. Tanaman dapat mengenali patogen melalui pengenalan molekul yang terdapat pada patogen. Molekul patogen yang dapat dikenali oleh tanaman dikenal dengan istilah *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). Selain itu, terdapat istilah *Microbe Associated Molecular Pattern* (MAMPs), yaitu molekul yang dapat ditemukan pada semua mikroorganisme, baik mikroorganisme patogen ataupun non patogen (Zipfel 2008; Zipfel 2009). Molekul PAMP/MAMP memiliki karakteristik sebagai molekul penting dan selalu ada dalam tubuh patogen maupun mikroorganisme, tetapi tidak terkandung pada tubuh inang. Molekul tersebut sulit untuk termutasi atau terdeslesi (Kunze 2005; Zipfel 2008). Molekul yang dapat berperan sebagai PAMP/MAMP, diantaranya adalah flagelin, *Elongation factor-Tu* (EF-Tu), harpin, *cold-shock protein*, peptidoglikan dan lipopolisakarida (Tabel 1) (Livaja *et al.* 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010).

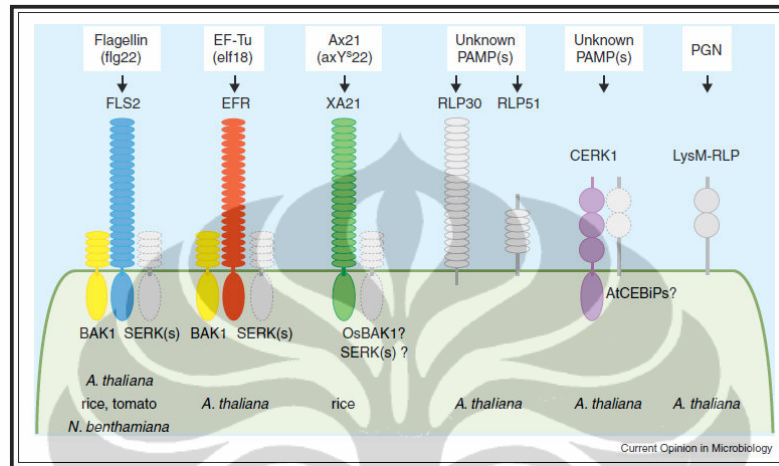
Tabel 1. Molekul yang dapat berperan sebagai PAMP/MAMP

Molekul PAMP/MAMP	Keterangan
Flagelin	Protein pada flagela bakteri
<i>Elongation factor-Tu</i> (EF-Tu)	Protein pengkatalis proses translasi
Harpin	Protein pada bakteri, terlibat dalam pertumbuhan pilli
Cold-shock protein	Protein pada bakteri
Peptidoglikan (PGN)	Komponen membran bakteri Gram positif
<b>Lipopolisakarida (LPS)</b>	Komponen membran bakteri Gram negatif

[Sumber: Livaja *et al.* 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010].

Molekul PAMP/MAMP akan dikenali oleh kompleks reseptor pengenalan pada membran sel tanaman, yang dikenal dengan istilah *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs) (Zipfel 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010). Berdasarkan hasil-hasil penelitian, saat ini telah diketahui macam-macam PRRs pada tanaman (Gambar 2). PRRs yang sudah diketahui pada tanaman *Arabidopsis thaliana*

diantaranya *leucine-rich repeat receptor kinase flagellin sensing 2* (LRR-RK FLS2) yang dapat mengenali flagelin bakteri dan LRR-RK *elongation factor* (LRR-RK EFR) yang dapat mengenali faktor elongasi Tu (Ef-Tu) bakteri (Zipfel 2008; Zipfel 2009).

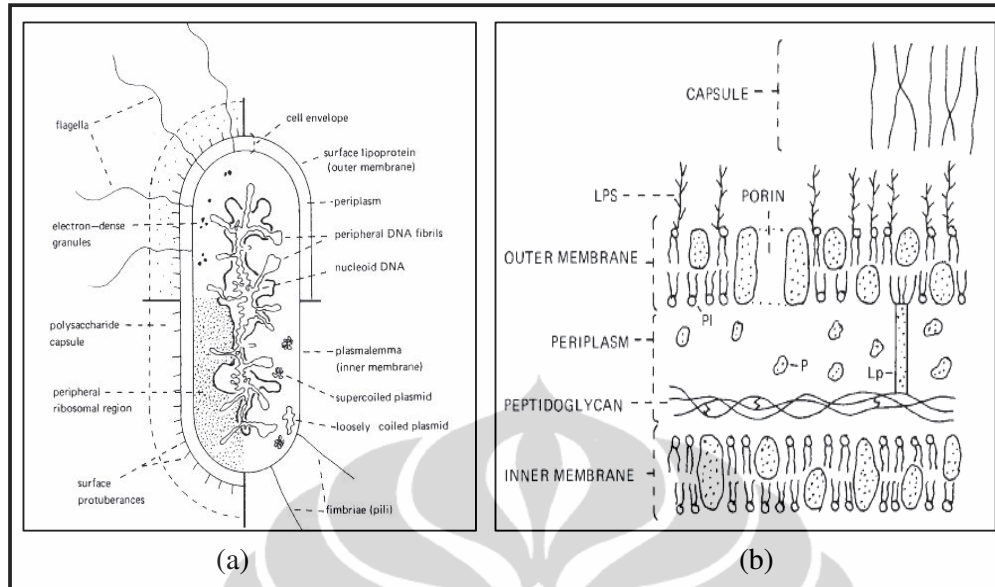


Gambar 2. Jenis PRRs yang mengenali PAMP/MAMP  
[Sumber: Segonzac & Zipfel 2011].

## B. Lipopolisakarida (LPS) bakteri

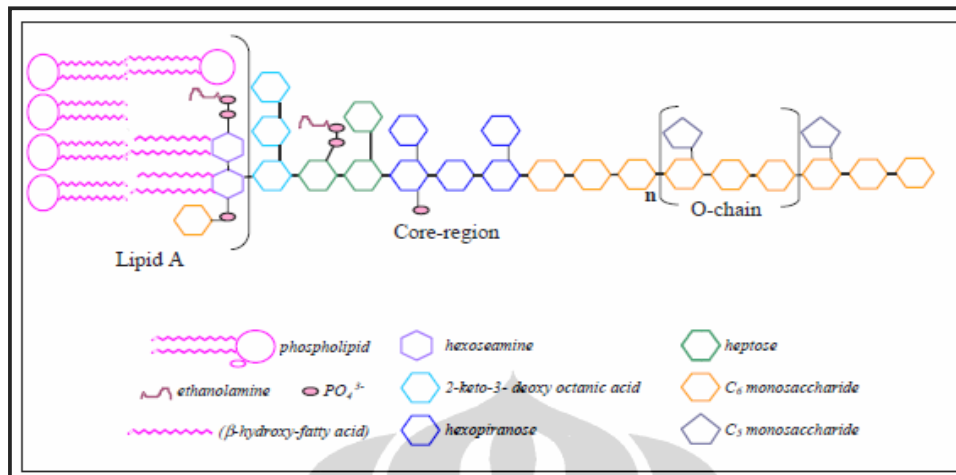
Molekul PAMP/MAMP yang cukup penting dalam menginduksi respons pertahanan tanaman adalah komponen penyusun permukaan sel bakteri, salah satunya Lipopolisakarida (LPS) (Zeidler *et al.* 2004). LPS merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif (Erbs & Newman 2003). Berdasarkan Sigeo (1993) sebagian besar fitopatogen merupakan kelompok bakteri Gram negatif. Oleh karena itu, kajian mengenai molekul bakteri Gram negatif yang terlibat dalam patogenisitas perlu dipelajari.

Lipopolisakarida (LPS) terletak pada bagian terluar dari membran luar selubung sel bakteri Gram negatif (Gambar 3) (Erbs & Newman 2003; Agrios 2005). LPS berfungsi sebagai pengatur permeabilitas membran, pelindung dan penghalang impermeabel bagi masuknya komponen berbahaya ke dalam sel bakteri serta terlibat dalam mekanisme pertahanan bakteri dari lingkungan yang kurang baik (Dow *et al.* 2000; Newman *et al.* 2001; Venkatesh 2002).



Gambar 3. (a) Struktur umum bakteri gram negatif; (b) struktur selubung sel bakteri gram negatif [Sumber: Sigeo 1993].

Struktur LPS terdiri dari tiga bagian utama, yaitu lipid A, inti oligosakarida, dan rantai polisakarida dengan unit berulang yang disebut rantai-O spesifik (O-antigen) (Gambar 4) (Erbs & Newman 2003; Agrios 2005). Lipid A merupakan bagian terdalam dari struktur LPS yang melekatkan LPS pada membran. Bagian lipid A tersusun atas fosfolipid dengan rantai panjang *hydroxyfatty acids*. Lipid A terhubung dengan bagian inti oligosakarida, yang dihubungkan oleh gula *3-deoxy-D-manno-2-octulosonate* (KDO). Bagian inti oligosakarida terdiri dari rangkaian gula yang pendek dan diakhiri oleh bagian O-antigen. O-antigen merupakan bagian bagian terluar LPS. O-antigen tersusun atas rantai oligosakarida dengan unit yang berulang. O-antigen merupakan komponen immunodominan (komponen antigenik) pada permukaan sel bakteri. Bagian terluar dari LPS tersebut juga berperan penting pada interaksi awal antara bakteri dan sel tanaman (Sigeo 1993; Dow *et al.* 2000; Newman *et al.* 2001; Erbs & Newman 2003).



Gambar 4. Struktur umum lipopolisakarida (LPS) bakteri gram negatif [Sumber: Venkatesh 2002].

Hasil-hasil penelitian terkait LPS menunjukkan LPS dari berbagai bakteri mampu menginduksi respons pertahanan tanaman. Penelitian yang dilakukan Zeidler *et al.* (2004) memperlihatkan bahwa LPS dari bakteri *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas plantarii*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, dan *P. syringae* dapat menginduksi respons pertahanan tanaman *Arabidopsis thaliana*, berupa produksi *nitric-oxide* (NO) dan ekspresi gen-gen yang mengkode PR protein (*Pathogenesis-Related proteins*).

### C. Bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

*Pseudomonas syringae* merupakan bakteri fitopatogen yang berbentuk batang, memiliki flagela polar, bersifat aerob dan termasuk kelompok Gram negatif (Agrios 2005; Griebel 2010). Bakteri *P. syringae* adalah fitopatogen yang cukup penting karena dapat menyebabkan penyakit pada banyak tanaman (Dickinson 2003; Nomura *et al.* 2005).

Spesies bakteri *P. syringae* terdiri dari banyak patovar, yang ditentukan berdasarkan kisaran tanaman inangnya (Nomura *et al.* 2005). Penamaan patovar (pv.) digunakan pada spesies bakteri patogen untuk membedakan bakteri-bakteri



yang memiliki kisaran tanaman inang berbeda (Griebel 2010). Berdasarkan sistem pengklasifikasian bakteri fitopatogen, yang ditentukan oleh International Society for Plant Pathology, patovar merupakan unit taksonomik dibawah tingkat subspecies (infra-subspecies) yang ditentukan berdasarkan patogenitas atau kemampuan patogen untuk menyebabkan penyakit pada inang tertentu (Sigeo 1993).

Young (2010) menyatakan spesies bakteri *P.syringae* terdiri dari 60 patovar, yang dapat memiliki satu atau lebih tanaman inang. Patovar bakteri *P.syringae* yang memiliki satu inang diantaranya ialah *P. syringae* pv. *tabaci* penyebab penyakit *wildfire* pada tanaman tembakau; *P. syringae* pv. *glycinea* penyebab penyakit *bacterial blight* pada tanaman kedelai; *P. syringae* pv. *lacrymans* penyebab penyakit *angular leaf spot* (bintik daun) pada tanaman mentimun; *P. syringae* pv. *phaseolicola* penyebab penyakit *halo blight* pada tanaman buncis; dan *P. syringae* pv. *tomato* penyebab penyakit *bacterial speck* (bintik bakteri) pada tomat. Sementara itu, contoh patovar bakteri yang memiliki kisaran tanaman inang lebih dari satu ialah *P. syringae* pv. *syringae* penyebab penyakit *blast* pada tanaman jeruk dan pir serta penyebab penyakit *leaf spot* (bintik daun) pada tanaman kacang-kacangan (Sigeo 1993; Agrios 2005).

#### **D. Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*)**

Tembakau (*Nicotiana tabacum*) merupakan salah satu anggota famili Solanaceae (Chase *et al.* 2003), yang memiliki peranan penting baik dalam bidang ekonomi maupun bidang penelitian. Tembakau dikenal sebagai tanaman model dalam bidang penelitian. Ganapathi *et al.* (2004) melaporkan bahwa sebagian besar penemuan-penemuan di bidang sel tanaman, kultur jaringan, dan biologi molekuler (rekayasa genetik) berasal dari eksperimen dengan menggunakan tanaman tembakau. Begitu pula pada penelitian bidang penyakit tanaman, Lancionin (2008) menyatakan tembakau banyak digunakan sebagai tanaman model untuk mempelajari interaksi antara tanaman dengan patogen, misalnya tembakau digunakan sebagai tanaman model untuk mempelajari reaksi hipersensitif yang diinduksi oleh bakteri *Erwinia amylovora* (Goodman & Plurad

1970), *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (Atkinson *et al.* 1985), dan *P. syringae* pv. *phaseolica* (Klement *et al.* 1999).

Tembakau merupakan tanaman yang menjadi inang bagi patogen, salah satunya sebagai inang bagi bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta). Bakteri Pta diketahui sebagai patogen penyebab penyakit *wildfire* pada tembakau. Lucas (1975 dalam Batchvarova *et al.* 1998) menyatakan penyakit *wildfire* merupakan salah satu penyakit yang cukup merusak dan menjadi masalah utama dalam perlindungan tanaman tembakau.

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan kemampuan lipopolisakarida (LPS) bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dalam menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau, berupa deposisi *callose* dan ekspresi gen-gen terkait pertahanan, *PAL*, *HSR 203 J* dan *HIN 1*. Nomura *et al.* (2005) menyatakan deposisi *callose* dan induksi gen-gen terkait pertahanan tanaman termasuk dalam respons pertahanan tingkat awal untuk mencegah perluasan infeksi patogen. Hasil penelitian dipaparkan dalam tesis yang terdiri dari dua makalah. Makalah pertama berjudul “Induksi deposisi *callose* pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) oleh lipopolisakarida bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*”. Sementara itu, makalah kedua berjudul “Ekspresi gen *PAL*, *HIN 1* dan *HSR 203 J* pada tanaman tembakau (*Nicotiana Tabacum*) yang diinduksi oleh lipopolisakarida bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*”.

## Makalah I

### INDUKSI DEPOSISI CALLOSE PADA TANAMAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* DAN *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Pipit Marianingsih

Program Studi Pascasarjana Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia  
Email: p\_marianingsih@yahoo.com

#### ABSTRACT

The lipopolysaccharide (LPS) is a major component of outer membrane Gram negative bacteria, and can act as Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) for perception of pathogens by plants. LPS can be recognized by plants to trigger some plant defense-related responses, including callose deposition. The study of induction callose deposition by bacterial LPS has been done in tobacco. Tobacco leaves were infiltrated with 400 µg/ml and 800 µg/ml LPS extracted from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) and *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl), and incubated for 24 hr or 48 hr. To detect callose deposition, tobacco leaves were cleared in lactophenol solution and stained with aniline blue. Samples were mounted in 50% glycerol, then visualized by fluorescence microscopy. The result showed that LPS from Pgl induced more callose deposition than that from Pta in tobacco leaves. Thus, Pgl LPS strongly induced tobacco defense response. In addition, Pearson correlation test revealed that incubation periode has the highest significant level to the callose deposition area, then the type of LPS bacteria. Whereas, the LPS concentration is not significantly different to the deposition callose area in tobacco leaves.

Keywords: callose deposition, lipopolysaccharide, *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*; tobacco.

## 1. PENDAHULUAN

Tanaman berinteraksi dengan mikroorganisme di alam, dan sebagian mikroorganisme tersebut dapat bersifat sebagai fitopatogen atau penyebab penyakit pada tanaman (Agrios 2005), salah satunya adalah *Pseudomonas syringae*. Bakteri *P. syringae* merupakan bakteri Gram negatif penyebab penyakit pada banyak tanaman (Dickinson 2003; Nomura *et al.* 2005). *Pseudomonas syringae* memiliki banyak patovar (pv.) yang dibedakan berdasarkan kisaran tanaman inangnya (Young 2010). Bakteri *P. syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl) merupakan dua fitopatogen yang cukup menjadi masalah pada tanaman perkebunan. Bakteri Pta merupakan penghasil *tabtoxin* yang menyebabkan penyakit *wildfire* pada tembakau, dicirikan dengan terjadinya nekrosis sampai kematian pada sel tanaman yang diserang (Batchvarova *et al.* 1998). Sementara itu, bakteri Pgl merupakan penghasil fitotoksin *coronatine* yang menyebabkan penyakit *bacterial blight* dengan gejala klorosis sampai nekrosis pada daun tanaman kedelai (Sigeo 1993).

Upaya pengendalian fitopatogen umumnya dilakukan melalui kontrol kimia yaitu penggunaan zat-zat kimia yang bersifat racun untuk mematikan patogen. Akan tetapi, cara tersebut dirasa kurang efektif karena menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan dan pengeluaran biaya yang tidak sedikit (Batchvarova *et al.* 1998; Agrios 2005). Kontrol biologi dianggap sebagai bentuk alternatif yang lebih potensial dan ramah lingkungan melalui pemanfaatan materi biologi untuk mengendalikan patogen. Kontrol biologi dapat dilakukan melalui penginduksian respons pertahanan tanaman (Bahsan 1997; Spencera *et al.* 2003), yaitu upaya peningkatan sistem pertahanan yang ada pada tanaman untuk mengatasi patogen.

Bentuk-bentuk respons pertahanan terinduksi pada tanaman dapat berupa sintesis *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI) atau *oxidative burst*, sintesis *nitric oxide* (NO), induksi *Hypersensitive Response* (HR), produksi senyawa antimikroba fitoaleksin, aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK),

aktivasi *pathogenesis-related* protein (PR), induksi gen-gen terkait pertahanan tanaman, dan juga deposisi *callose* (Strange 2003; Agrios 2005; Buonauro 2008).

Induksi deposisi *callose* merupakan salah satu respons pertahanan yang efektif karena dapat terinduksi dalam waktu relatif cepat pada sel-sel yang terserang patogen. Deposisi *callose* tersebut berfungsi menghambat penetrasi patogen pada sel tanaman (Nishimura *et al.* 2003) dan dapat pula menjadi matriks atau tempat terdepositnya berbagai senyawa antimikroba, sebelum disalurkan pada sel-sel yang terinfeksi. *Callose* adalah senyawa homopolimer linear polisakarida yang terbangun atas rantai  $\beta$ -1,3-glukan dan secara alami dapat ditemukan di berbagai tempat pada tanaman tingkat tinggi, contohnya pada pembuluh floem, polen dan plasmodesmata (Flors *et al.* 2005; Chen & Kim 2009; Luna *et al.* 2011). *Callose* merupakan komponen penting pada tanaman, karena ikut berperan dalam berbagai proses pertumbuhan dan perkembangan serta terkait dengan respons terhadap tekanan biotik dan abiotik (Chen & Kim 2009).

Penginduksian respons pertahanan tanaman diawali dengan tahap pengenalan patogen atau molekul patogen, yang disebut dengan *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs/MAMPs), oleh reseptor pada sel tanaman (Zipfel 2008; Zipfel 2009). Molekul PAMP/MAMP yang sudah diketahui antara lain flagelin, *Elongation factor-Tu* (EF-Tu), harpin, peptidoglikan dan lipopolisakarida (Livaja *et al.* 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010). Molekul PAMP/MAMP yang dilaporkan dapat menginduksi deposisi *callose* adalah flagelin pada tanaman *Arabidopsis thaliana* (Millet *et al.* 2010; Luna *et al.* 2011) dan tanaman *Nicotiana benthamiana* (Hann & Rathzen 2007). Selain itu, deposisi *callose* dapat terinduksi oleh kitin, peptidoglikan (Millet *et al.* 2010), dan *chitosan* (Luna *et al.* 2011) pada tanaman *Arabidopsis thaliana*. Akan tetapi, belum ada data mengenai kemampuan molekul lipopolisakarida (LPS) dalam menginduksi deposisi *callose* pada tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*). Tembakau merupakan tanaman yang banyak digunakan sebagai tanaman model dalam penelitian interaksi tanaman dengan patogen, selain *Arabidopsis thaliana* (Lancioni 2008).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif yang dapat menjadi target pengenalan oleh sel-sel tanaman (Erbs & Newman 2003). Struktur LPS terdiri atas tiga bagian utama, yaitu lipid A, inti oligosakarida dan rantai polisakarida dengan unit berulang oligosakarida yang disebut rantai-O spesifik (O-antigen). Lipid A merupakan bagian terdalam dari struktur LPS yang melekatkan LPS pada membran. Lipid A terhubung dengan bagian inti oligosakarida, yang dihubungkan oleh gula *3-deoxy-D-manno-2-octulosonate* (KDO). Bagian inti oligosakarida terdiri dari rangkaian gula yang pendek dan diakhiri oleh bagian terluar LPS, yaitu O-antigen. O-antigen pada LPS berperan penting pada interaksi awal antara bakteri dan sel tanaman (Sigeo 1993; Dow *et al.* 2000; Newman *et al.* 2001; Erbs & Newman 2003). LPS berfungsi sebagai pelindung dan penghalang impermeabel bagi masuknya komponen berbahaya ke dalam sel bakteri (Newman *et al.* 2001).

Hasil-hasil penelitian menunjukkan LPS mampu menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau berupa *oxidative burst* (peningkatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Meyer *et al.* 2001; Gerber *et al.* 2004), influx ion Ca<sup>2+</sup> yang cepat (Gerber *et al.* 2004), dan aktivasi protein kinase (*Mitogen activated protein kinase* - MAPK) (Piater *et al.* 2004). Akan tetapi, belum ada data mengenai kemampuan LPS dalam menginduksi respons pertahanan berupa deposisi *callose*, sehingga dilakukan penelitian yang bertujuan untuk mengetahui dan membandingkan kemampuan LPS dari bakteri fitopatogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dalam menginduksi deposisi *callose* pada tanaman tembakau.

## 2. METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 bulan (Oktober 2010--Maret 2011) di Laboratorium Penyakit Tanaman dan Rekayasa Genetik Fakultas Pertanian, Universitas Okayama (Jepang).

## B. Bahan dan Cara kerja

### B.1 Tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi). Tanaman tersebut berasal dari biji yang ditumbuhkan pada media *vermiculite* di ruang tanam bersuhu 26 °C, selama kurang lebih 6 minggu.

### B.2 Ekstraksi lipopolisakarida (LPS)

Ekstraksi LPS bakteri bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dilakukan menggunakan *LPS kit extraction* [INTRON]. Bakteri yang telah ditumbuhkan selama 24 jam pada medium KB (*King's B medium*) cair dipindahkan ke dalam ependorf, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu ruang, selama 30--60 detik untuk memisahkan bakteri dengan medium. Pelet yang didapat kemudian ditambahkan 1 ml larutan *lysis buffer*, lalu divortex. Setelah itu, ditambahkan 200 µl kloroform, divortex, dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4 °C, selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 400 µl supernatan dipindahkan pada ependorf baru, ditambahkan 800 µl larutan buffer purifikasi, divortex, dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu -20 °C. Setelah inkubasi, larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4 °C, selama 15 menit. Pelet yang didapat adalah LPS. Tahap berikutnya, pelet dicuci menggunakan 1 ml EtOH 70% dingin, kemudian ependorf dibolak-balik menggunakan tangan atau divortex agar larutan tercampur dengan pelet. Selanjutnya, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4 °C, selama 3 menit dan supernatan dibuang. Pelet yang didapat dikeringkan pada suhu ruang. Setelah cukup kering, pelet ditambahkan 70 µl H<sub>2</sub>O dan divortex sampai pelet larut. Pelarutan LPS, selain dilakukan dengan H<sub>2</sub>O juga dapat

dilakukan dengan larutan 10mM Tris-HCl buffer (pH 8) untuk penyimpanan LPS dalam waktu yang lama.

Hasil ekstraksi LPS selanjutnya dianalisis dengan metode SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis*) 15%. Sebanyak 10  $\mu$ l sampel LPS dicampurkan dengan 2  $\mu$ l sampel *loading buffer*. Sampel dimasukkan kedalam tiap sumur pada gel dan dielektroforesis pada voltase 10 mA selama kurang lebih 30 menit saat sampel berada pada *stacking gel*, dan dielektroforesis pada voltase 20 mA selama kurang lebih 90 menit saat sampel berada pada *running gel*. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan pewarnaan perak.

### B.3 Infiltrasi LPS bakteri pada daun tembakau dan variasi perlakuan

Daun tembakau diinfiltrasi dengan 400  $\mu$ g/ml dan 800  $\mu$ g/ml LPS bakteri Pta dan Pgl. Infiltrasi LPS dilakukan menggunakan alat suntik tanpa jarum, sampai seluruh bagian daun tampak terisi oleh LPS. Kemudian daun diinkubasi dengan dua waktu inkubasi yang berbeda, masing-masing 24 jam dan 48 jam, di ruang inkubasi dengan suhu 26 °C. Berikut adalah bagan variasi perlakuan yang digunakan dalam penelitian.

Inkubasi 24 jam					Inkubasi 48 jam				
H <sub>2</sub> O	400 $\mu$ g/ml LPS		800 $\mu$ g/ml LPS		H <sub>2</sub> O	400 $\mu$ g/ml LPS		800 $\mu$ g/ml LPS	
	Pta	Pgl	Pta	Pgl		Pta	Pgl	Pta	Pgl

Sebagai perlakuan kontrol, daun diinfiltrasi dengan dH<sub>2</sub>O. Perlakuan dengan dH<sub>2</sub>O tersebut dianggap sebagai kontrol negatif karena diharapkan daun yang diinduksi oleh dH<sub>2</sub>O tidak akan memberikan respons pertahanan.

### B.4 Deteksi deposisi *callose*

Tahapan kerja untuk mendeteksi deposisi *callose* dilakukan berdasarkan Adam & Somerville (1996). Klorofil daun diluruhkan dengan cara direndam



dalam tabung berisi larutan laktofenol (fenol : gliserol : asam laktat : dH<sub>2</sub>O = 1 : 1 : 1 : 1) yang telah diencerkan sebanyak 2 kali volume dengan alkohol 50%. Daun diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruang dan dilanjutkan inkubasi pada alat pemanas dengan suhu 65 °C selama 30 menit. Pemanasan yang dilakukan bertujuan untuk mempercepat peluruhan klorofil. Setelah itu, larutan laktofenol diganti dengan larutan laktofenol baru, lalu tabung diinkubasi kembali dalam pemanas 65 °C. Tahap tersebut dapat diulang sampai klorofil dalam daun benar-benar luruh. Apabila klorofil daun belum luruh, inkubasi dapat dilakukan selama berjam-jam, sampai 24 jam bahkan lebih, pada suhu ruang.

Setelah klorofil luruh (daun tampak transparan), daun direndam dalam alkohol 50% selama 15 menit, kemudian direndam dalam dH<sub>2</sub>O steril selama 15 menit. Selanjutnya adalah tahap pewarnaan. Daun direndam dalam larutan 0.01% *aniline blue* yang telah dilarutkan dalam 150 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 9,5) selama 30 menit. Setelah diwarnai, daun diletakkan pada kaca objek, ditetesi dengan beberapa tetes larutan gliserol 50%, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan deposisi *callose* pada daun dilakukan menggunakan mikroskop fluoresensi. Deposisi *callose* akan tampak seperti titik-titik yang berpendar berwarna hijau.

### C. Analisis data

Foto deposisi *callose* pada setiap perlakuan diamati secara kualitatif dan kuantitatif. Secara kualitatif, deposisi *callose* akan terlihat berpendar warna hijau. Selanjutnya, deposisi *callose* tersebut dikuantifikasi dengan bantuan *software photoshop CS 5*. Luas area deposisi *callose* diseleksi menggunakan “*magic wand*” *tool* dan hasil pengukuran jumlah piksel, yang merepresentasikan luas area deposisi *callose*, akan tampak pada “*record measurements*” *tool* (Luna *et al.* 2011) (Lampiran 1).

Data luas area *callose* pada daun disetiap perlakuan dianalisis menggunakan uji statistik, berupa uji normalitas (kolmogorov-smirnov test), uji homogenitas (ANOVA, Duncan) dan Uji Korelasi antar variabel (*Pearson*

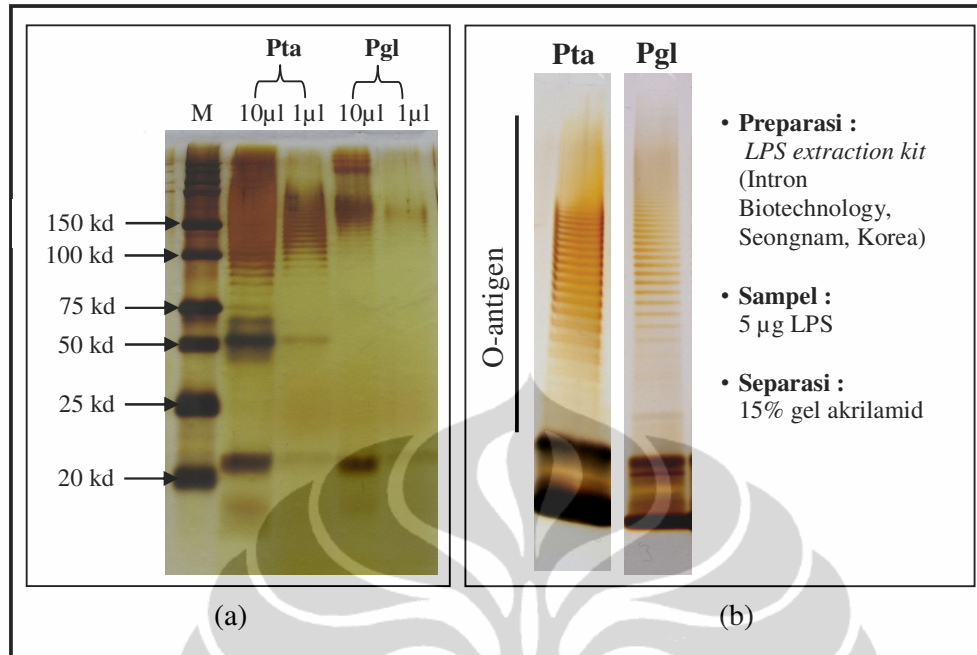
*product moment*). Uji-uji statistik tersebut dilakukan menggunakan *software* SPSS 16.

### 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

#### A. Analisis profil lipopolisakarida (LPS) bakteri

Lipopolisakarida (LPS) diekstraksi dari dua bakteri fitopatogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) menggunakan *Intron extraction kit*. Visualisasi hasil ekstraksi LPS bakteri Pta dan Pgl menggunakan metode SDS PAGE (*Sodium Dodecylsulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) menunjukkan intensitas pita yang berbeda. Profil pita-pita LPS Pta tampak lebih jelas dibandingkan LPS Pgl (Gambar I.1a). LPS yang diekstraksi dari bakteri Pta memperlihatkan adanya pita-pita yang terdiri dari tiga kelompok, yaitu pita berbobot molekul rendah (21 kd), sedang (50 kd), dan tinggi (lebih dari 100 kd). Analisis kimiawi terhadap komponen penyusun LPS Pta tersebut tidak dilakukan karena jumlah LPS yang didapat sangat sedikit (tidak mencukupi). Akan tetapi, kelompok pita bermolekul tinggi (dengan ukuran lebih dari 100 kd) yang tampak pada LPS Pta hasil ekstraksi serupa dengan profil pita LPS Pta yang diekstraksi oleh Institut Tsukuba (Gambar I.1b). Pita tersebut terdiri dari unit berulang yang diasumsikan sebagai struktur O-antigen LPS. Erbs & Newman (2003) menyatakan struktur O-antigen LPS merupakan unit berulang yang terdiri dari rantai oligosakarida.

Hasil visualisasi ekstraksi LPS bakteri Pta menunjukkan bahwa LPS berhasil diisolasi, tetapi jumlahnya sedikit sehingga tidak bisa digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Sementara itu, LPS bakteri Pgl tidak berhasil diekstraksi dengan baik (Gambar I.1a). Oleh karena itu, LPS yang digunakan untuk menginduksi deposisi *callose* pada tanaman tembakau adalah LPS hasil ekstraksi dari Institut Tsukuba yang telah terbukti memiliki kualitas LPS yang baik serta memiliki kuantitas yang cukup.



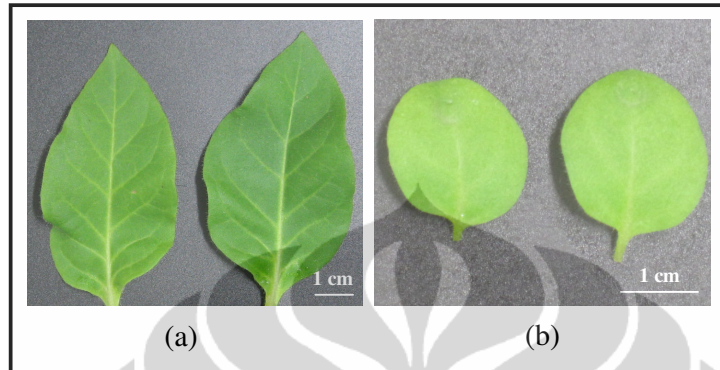
Gambar I.1 Visualisasi hasil elektroforesis LPS bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl). (a). LPS hasil ekstraksi pada penelitian ini; (b). LPS hasil ekstraksi dari Institut Tsukuba

## B. Deteksi deposisi *callose* pada daun tembakau

Deteksi respons pertahanan berupa deposisi *callose* pada tanaman tembakau, yang diinfiltrasi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl, menggunakan daun yang masih muda (berumur kurang lebih 6 minggu) (Gambar I.2b). Penggunaan daun muda untuk deteksi deposisi *callose* didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan yang menunjukkan peluruhan kandungan klorofil pada daun muda lebih mudah dibandingkan pada daun tua. Tahap peluruhan klorofil untuk deteksi deposisi *callose* merupakan tahap yang cukup penting karena keberadaan klorofil dapat menghalangi hasil perpendaran deposisi *callose* yang diamati menggunakan mikroskop fluoresensi.

Peluruhan klorofil yang lebih sulit pada daun dewasa dikarenakan kandungan klorofil pada daun dewasa jauh lebih banyak dibandingkan daun muda. Menurut Taiz & Zeger (2002) klorofil merupakan komponen utama

fotosintesis dan laju fotosintesis akan meningkat seiring dengan pertumbuhan daun. Dengan kata lain, kandungan klorofil juga akan meningkat seiring dengan pertumbuhan daun.



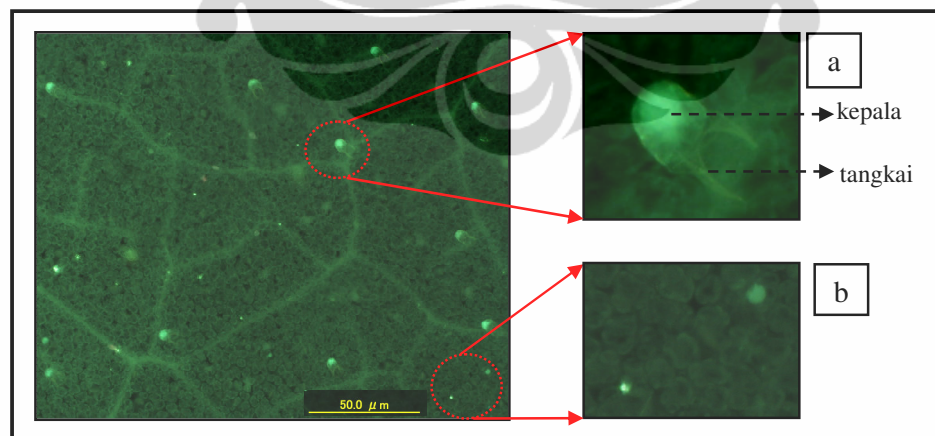
Gambar I.2 Daun tembakau. (a). Daun dewasa; (b). Daun muda

Lipopolisakarida (LPS) bakteri Pta dan Pgl yang diinfiltrasi pada daun tembakau adalah LPS dengan konsentrasi 400  $\mu\text{g/ml}$  dan 800  $\mu\text{g/ml}$ . Penggunaan dua konsentrasi tersebut didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan. Penggunaan LPS bakteri Pta dan Pgl sebanyak 200  $\mu\text{g/ml}$  pada daun tembakau tidak memperlihatkan adanya induksi *callose* yang signifikan. Kemudian dilakukan penambahan konsentrasi LPS menjadi dua kali lipat (400  $\mu\text{g/ml}$ ). Konsentrasi LPS sebesar 400  $\mu\text{g/ml}$  ternyata mampu menginduksi deposisi *callose* secara signifikan pada daun tembakau, karena itu konsentrasi LPS 400  $\mu\text{g/ml}$  tersebut yang digunakan saat penelitian. Selain itu, digunakan juga LPS dengan konsentrasi 800  $\mu\text{g/ml}$  (dua kali konsentrasi sebelumnya). Hal tersebut dilakukan untuk mengamati pengaruh kenaikan konsentrasi LPS terhadap deposisi *callose*. Selain faktor konsentrasi LPS, juga diamati pengaruh waktu inkubasi terhadap deposisi *callose*. Daun tembakau diinkubasi dengan dua waktu yang berbeda, yaitu 24 jam dan 48 jam.

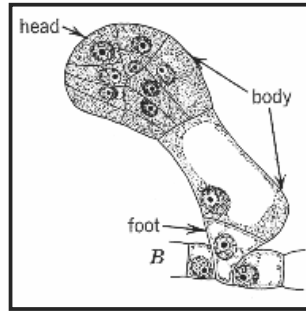
## 1. Analisis data kualitatif deposisi *callose*

Deposisi *callose* pada daun tembakau yang telah diwarnai dengan *aniline blue* tampak berpendar warna hijau ketika diamati menggunakan mikroskop fluoresensi. Casabuono *et al.* (2011) menyatakan bahwa deposisi *callose* dapat dideteksi dengan pewarnaan *aniline blue*. Ikatan 1,3 glikosida antara unit glukosa pada *callose* akan membentuk polimer yang tersusun heliks. Polimer tersebut kemudian berikatan dengan *aniline blue* dan menghasilkan suatu kompleks yang berpendar warna kuning-kehijauan ketika terpapar oleh sinar UV (terfluoresensi).

Hasil analisis terhadap data foto deposisi *callose* pada daun tembakau memperlihatkan bahwa tidak hanya *callose* hasil induksi LPS yang terwarnai hijau, tetapi juga *callose* yang terdapat pada *papillae* tampak berwarna hijau. Berdasarkan Flors *et al.* (2005) *callose* merupakan senyawa yang secara alami terdapat pada *papillae*. Meskipun demikian, *callose* hasil induksi LPS tetap dapat dibedakan dari *callose papillae*, karena *papillae* pada daun tembakau tampak memiliki bentuk yang khas, yaitu memiliki struktur seperti tangkai dan kepala (berglandular) (Gambar I.3). Menurut Evert (2006), *papillae* merupakan salah satu bentuk trikoma yang memiliki struktur tertentu, dan pada daun tembakau struktur trikoma tersebut ada yang berglandular (Gambar I.4) dan ada yang tidak.

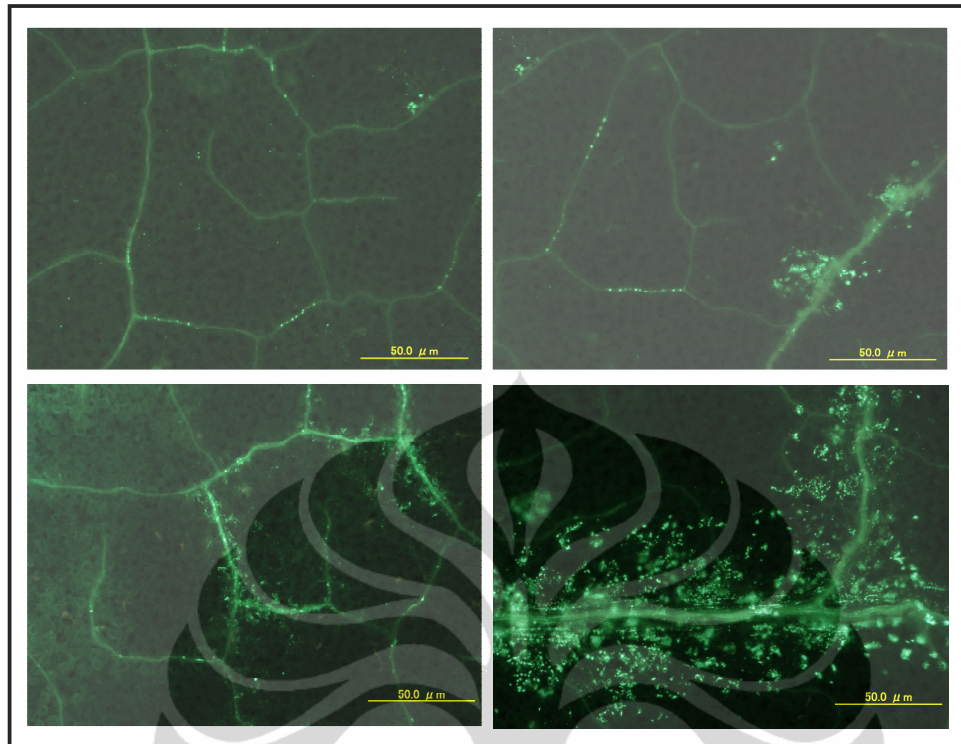


Gambar I.3 Pengamatan mikroskopik deposisi *callose* pada daun tembakau.  
a = *callose papillae*; b = *callose* hasil induksi LPS bakteri



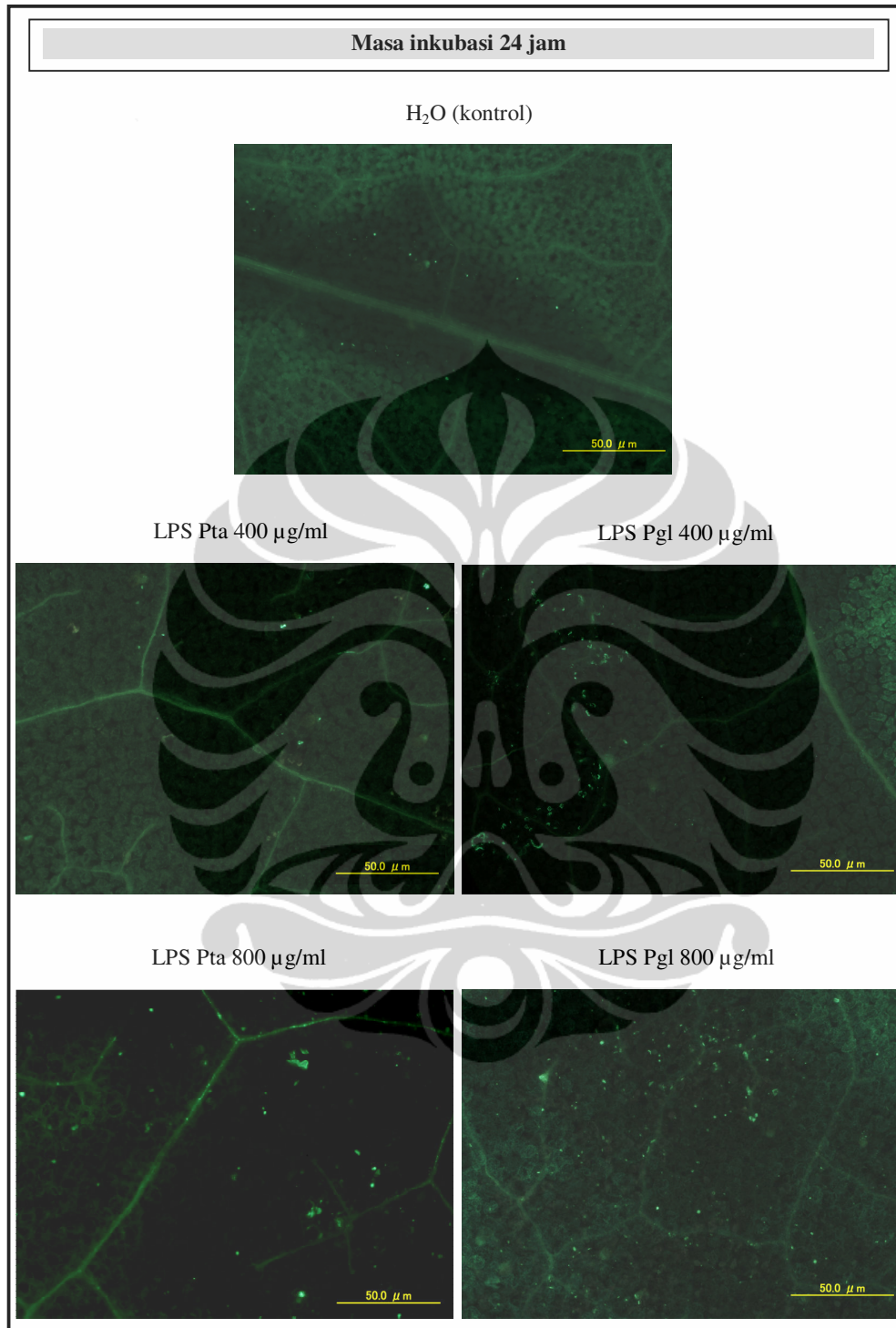
Gambar I.4 Trikom dengan kepala berglandular pada *Nicotiana* [Sumber: Evert 2006].

Intensitas deposisi *callose*, hasil induksi LPS bakteri dan juga H<sub>2</sub>O, dalam satu daun tampak tidak merata di semua bagian daun. Pada satu daun, terdapat bagian-bagian yang terinduksi deposisi *callose* dengan sangat kuat, akan tetapi pada bagian lain deposisi *callose* terinduksi sangat sedikit (Gambar I.5). Fenomena tersebut teramati pada hampir semua daun di setiap perlakuan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa intensitas deposisi *callose* yang terinduksi pada daun tembakau sangat bergantung dari kondisi fisiologi sel-sel penyusun daun. Kondisi fisiologis yang dimaksud kemungkinan seperti perbedaan tingkat sensitivitas sel-sel tanaman dalam mengenali molekul patogen, yang tentu saja memengaruhi respons pertahanan yang terinduksi. Selain itu, berdasarkan pengamatan pada beberapa daun, disepanjang permukaan daun, *callose* cenderung terdeposisi di sekitar pertulangan daun. Seperti tampak pada Gambar I.5, *callose* cenderung terdeposisi di sekitar pertulangan daun, dan intensitasnya begitu tinggi di dekat ibu tulang daun. Hal tersebut kemungkinan terkait dengan adanya pembuluh angkut di sepanjang tulang daun. Pembuluh angkut, khususnya floem, berfungsi untuk menyalurkan hasil fotosintesis (Evert 2006). Hasil fotosintesis berupa gula dapat menjadi bahan dasar sintesis *callose*. Selain itu, hasil fotosintesis merupakan sumber nutrisi bagi patogen, sehingga patogen akan cenderung berkolonisasi di sekitar pembuluh angkut (di dekat sumber nutrisi). Keberadaan patogen di sekitar pembuluh angkut tersebut tentu berimplikasi pada terbentuknya respons pertahanan tanaman, seperti deposisi *callose*, di sekitar pembuluh untuk menghambat pertumbuhan patogen.



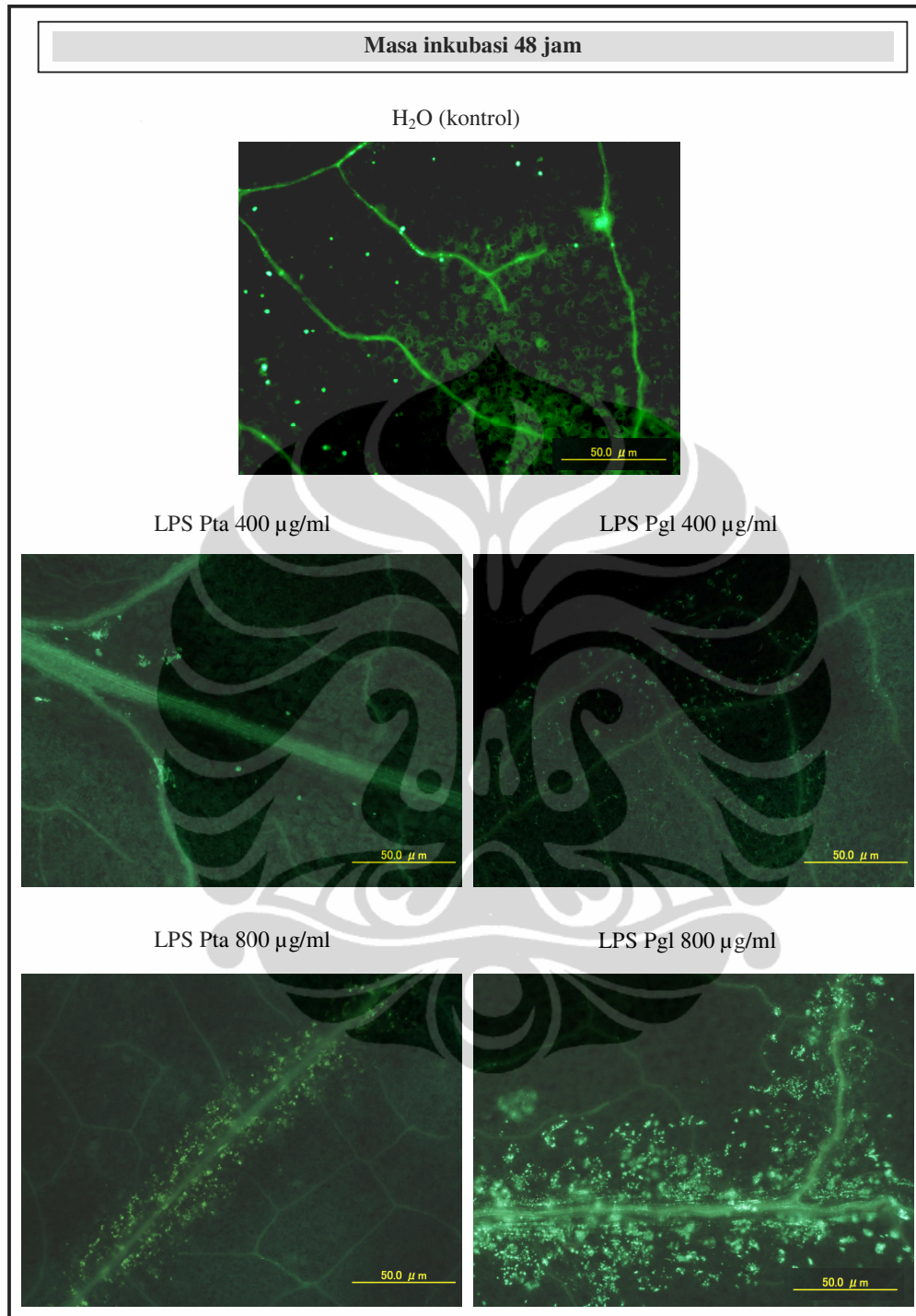
Gambar I.5 Pengamatan mikroskopik intensitas deposisi *callose* dalam satu daun tembakau, yang diinduksi oleh LPS *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dengan masa inkubasi selama 48 jam.

Berdasarkan pengamatan foto sampel-sampel daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri maupun H<sub>2</sub>O memperlihatkan adanya deposisi *callose*. Deposisi *callose* yang terbentuk hasil induksi LPS bakteri tampak lebih banyak dibandingkan deposisi *callose* yang diinduksi oleh H<sub>2</sub>O. Hasil tersebut menunjukkan LPS dari bakteri yang digunakan saat penelitian (Pta dan Pgl), mampu menginduksi deposisi *callose*. LPS bakteri Pgl mampu menginduksi deposisi *callose* yang lebih banyak dibandingkan LPS bakteri Pta. Hasil tersebut terlihat pada semua perlakuan yang diberikan. Perbedaan banyaknya *callose*, yang terinduksi oleh LPS Pta dan Pgl, tampak lebih jelas pada perlakuan 48 jam (Gambar I.7) dibandingkan 24 jam (Gambar I.6).



Gambar 1.6 Pengamatan mikroskopik kecenderungan penampakan deposisi *callose* pada daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (**Pta**) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (**Pgl**) dengan masa inkubasi 24 jam.





Gambar 1.7 Pengamatan mikroskopik kecenderungan penampakan deposisi *callose* pada daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (**Pta**) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (**Pgl**) dengan masa inkubasi 48 jam.

## 2. Analisis data kuantitatif deposisi *callose*

### 2.1 Total luas area deposisi *callose* pada daun tembakau

Hasil penelitian yang tampak pada data kualitatif, berupa foto deposisi *callose*, dikuatkan oleh pengolahan data secara kuantitatif. Kuantifikasi data *callose* didapat dengan cara mengukur total luas area deposisi *callose* dalam satu daun. Secara umum, daun-daun tembakau yang diinduksi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl menginduksi deposisi *callose* lebih banyak dibandingkan H<sub>2</sub>O pada daun tembakau. Lebih lanjut, hasil penelitian menunjukkan LPS bakteri Pgl memiliki total luasan area deposisi *callose* yang lebih besar dibandingkan daun yang diinduksi oleh LPS Pta (Tabel I.1; Lampiran 2). Untuk menunjang hasil tersebut maka selanjutnya dilakukan uji statistik terhadap data luas area deposisi *callose* yang diinduksi oleh LPS bakteri, dan juga untuk menganalisis pengaruh jenis LPS bakteri, konsentrasi LPS dan waktu inkubasi terhadap deposisi *callose*.

Hasil uji normalitas terhadap data luas area deposisi *callose* menunjukkan data berdistribusi normal (lampiran 3). Sementara itu, hasil uji homogenitas menunjukkan data dikategorikan tidak homogen (Sig. < 0,05) (Lampiran 4), yang berarti terdapat perbedaan pada setiap perlakuan terhadap luas area deposisi *callose*.

Tabel I.1 Total luas area deposisi *callose* ( $\mu\text{m}^2$ ) dalam satu daun tembakau di setiap perlakuan\*

Perlakuan / ulangan	Masa inkubasi 24 jam					Masa inkubasi 48 jam				
	H <sub>2</sub> O	400 $\mu\text{g/ml}$ LPS		800 $\mu\text{g/ml}$ LPS		H <sub>2</sub> O	400 $\mu\text{g/ml}$ LPS		800 $\mu\text{g/ml}$ LPS	
		Pta	Pgl	Pta	Pgl		Pta	Pgl	Pta	Pgl
1	11	120	108	109	237	61	99	337	693	987
2	37	231	282	184	290	162	119	426	1194	3001
3	69	244	294	418	771	583	184	2589	1260	3105
4	413	311	313	571	1344	1325	187	3024	1328	3511
5		482	400	682	1826		251	3439	14093	9194
6		753	3700	1132	1887		1409	3842		13501
		Kelompok perlakuan I		Kelompok perlakuan II			Kelompok perlakuan III		Kelompok perlakuan IV	

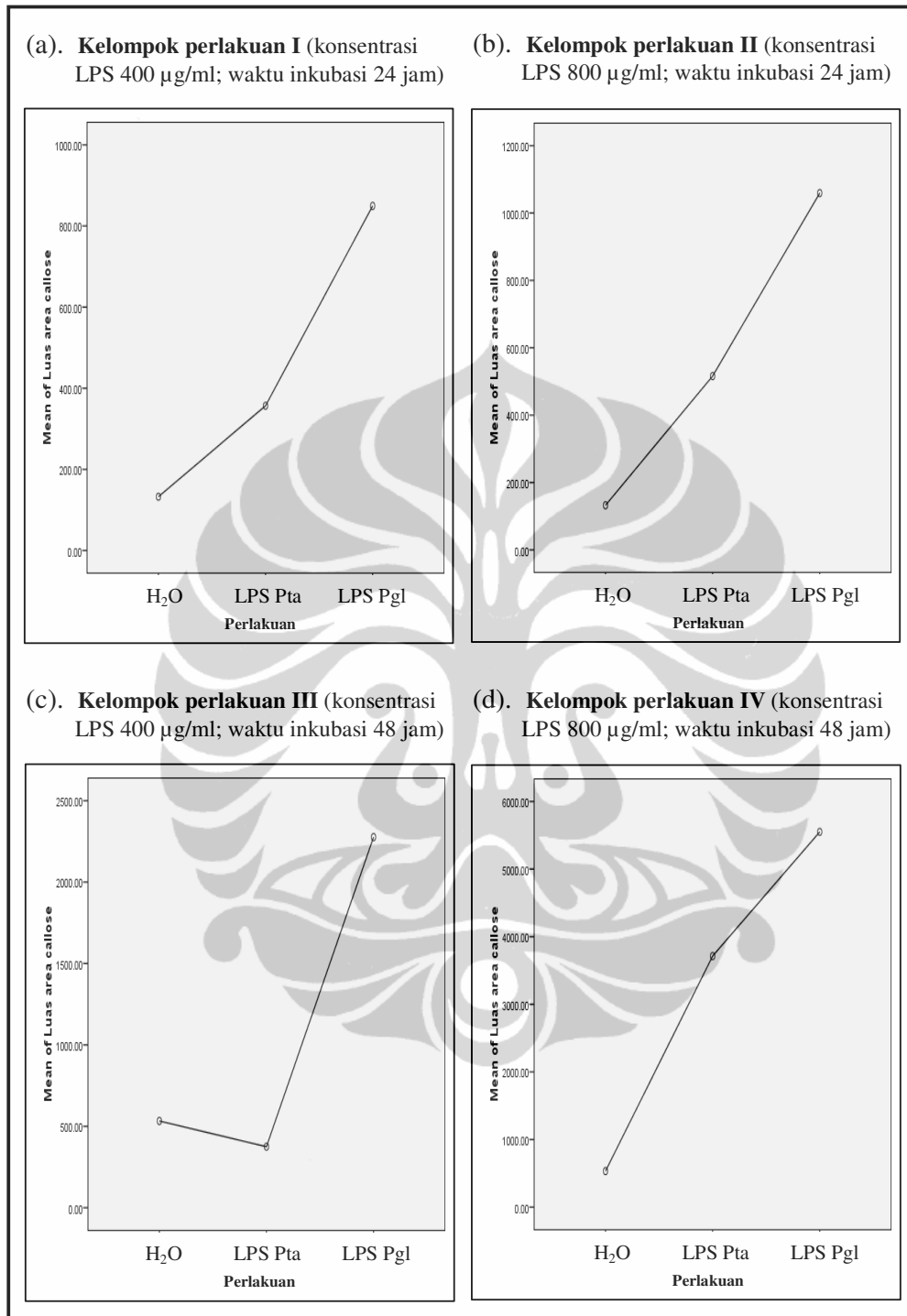
Ket: \* Data total luas area *callose* per daun dalam satu perlakuan diurutkan dari yang terkecil sampai terbesar.

## 2.2 Pengaruh perlakuan jenis LPS bakteri, konsentrasi LPS dan waktu inkubasi terhadap luas area deposisi *callose*

### 2.2.1 Pengaruh LPS bakteri (Pta dan Pgl) terhadap luas area deposisi *callose*

Analisis statistik untuk mengetahui pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta H<sub>2</sub>O dalam menginduksi deposisi *callose* dilakukan menggunakan uji Duncan. Uji dilakukan pada kelompok-kelompok perlakuan yang sama untuk memudahkan analisis. Kelompok-kelompok perlakuan yang dibuat terdiri dari empat kelompok, yaitu kelompok perlakuan I (LPS 400 µg/ml dan inkubasi 24 jam), kelompok perlakuan II (LPS 800 µg/ml dan inkubasi 24 jam), kelompok perlakuan III (LPS 400 µg/ml dan inkubasi 48 jam), dan kelompok perlakuan IV (LPS 400 µg/ml dan inkubasi 48 jam) (tabel I.1). Hasil perhitungan uji Duncan terhadap kelompok-kelompok perlakuan tersebut ditampilkan dalam bentuk grafik dan tabel luas area deposisi *callose* hasil induksi LPS bakteri.

Berdasarkan grafik uji Duncan, deposisi *callose* pada daun yang diinfiltrasi LPS bakteri (Pta dan Pgl) terinduksi lebih tinggi dibandingkan daun yang diinfiltrasi dengan H<sub>2</sub>O (Gambar I.8). Hasil tersebut menunjukkan LPS bakteri Pta dan pgl mampu menginduksi deposisi *callose* pada daun tembakau. Terinduksinya respons pertahanan tanaman berupa deposisi *callose* pada daun tembakau mengindikasikan sel-sel tanaman tembakau mampu mengenali LPS bakteri Pta dan Pgl sebagai molekul MAMP.



Gambar I.8 Grafik hasil uji statistik Duncan mengenai pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (**Pta**) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (**Pgl**)) dengan luas area deposisi callose pada daun tembakau di setiap kelompok perlakuan.

Pengenalan tanaman terhadap molekul MAMP merupakan faktor penting dalam induksi respons pertahanan (Zeidler *et al.* 2004; Zipfel 2009). Zeidler *et al.* (2004) mengungkapkan tiga proses yang mungkin terjadi pada mekanisme pengenalan LPS pada tanaman, yaitu LPS berinteraksi dengan dinding sel tanaman, reseptor plasma membran atau protein pengikat (*binding protein*) di dalam sel. Gross *et al.* (2005) menyatakan molekul LPS tidak mungkin berdifusi melalui membran plasma ke dalam sel karena LPS dikategorikan sebagai molekul berukuran besar (makromolekul). Sementara itu, pengamatan yang dilakukan Graham *et al.* (1977) menunjukkan LPS yang diinfiltrasi pada daun tembakau akan terikat pada dinding sel mesofil tembakau. Akan tetapi, mekanisme pengikatan dan jenis reseptor plasma membran yang bertanggung jawab mengenali LPS pada tembakau belum teridentifikasi.

Pengenalan LPS oleh sel tanaman akan menghasilkan sinyal transduksi tertentu dan memengaruhi perubahan aktivitas seluler yang terkait dengan respons pertahanan dalam sel tanaman. Penelitian Graham *et al.* (1977) menunjukkan bahwa LPS yang diinfiltrasi pada daun tembakau akan terikat pada dinding sel mesofil dan menginduksi perubahan ultrastruktural dari sel seperti pembentukan vesikula. Campbell *et al.* (2008) menyatakan pembentukan vesikula dalam sel terkait dengan proses sekresi protein (enzim) ataupun transfer materi di dalam sel. Lebih lanjut, Gimenez-Ibanez & Rathzen (2010) menyatakan pembentukan vesikula merupakan salah satu proses yang terlibat dalam menghambat atau menghentikan pertumbuhan patogen. Penelitian Gerber *et al.* (2004) menunjukkan bahwa kultur suspensi sel tembakau yang diberi perlakuan LPS *Burkholderia cepacia* terindikasi mengalami peningkatan aliran (influx)  $\text{Ca}^{2+}$  intraselular. Zipfel (2008) menyatakan peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraselular merupakan salah satu ciri respons pertahanan.  $\text{Ca}^{2+}$  merupakan salah satu *second messenger* penting pada Eukariot, yang terlibat pada proses transduksi sinyal melalui sistem membran dalam penginduksian respons pertahanan tanaman (Gimenez-Ibanez & Rathzen 2010).

### 2.2.2 Pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri (Pta dan Pgl) terhadap luas area deposisi *callose*

Berdasarkan grafik uji Duncan juga tampak bahwa LPS bakteri Pgl menghasilkan luas area deposisi *callose* lebih tinggi dibandingkan LPS bakteri Pta (Gambar I.8), yang berarti LPS Pgl menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau lebih kuat dibandingkan LPS Pta. Perbedaan respons pertahanan tembakau yang diinduksi LPS bakteri Pta dan Pgl kemungkinan terkait dengan adanya perbedaan pengenalan sel-sel tembakau terhadap kedua LPS bakteri. Sanabria & Dubery (2006) menyatakan LPS dari setiap organisme memiliki struktur yang bervariasi (tidak homolog). Hal tersebut menjadikan LPS sebagai target pengenalan pada sistem pertahanan organisme. Struktur LPS terdiri dari tiga bagian utama, yaitu lipid A, inti oligosakarida dan rantai polisakarida dengan unit berulang yang disebut O-antigen (Agrios 2005). Telah dilaporkan bahwa bagian-bagian dari LPS tersebut berperan aktif dalam penginduksian respons pertahanan tanaman.

Struktur LPS bakteri Pta dan Pgl yang digunakan saat penelitian telah teridentifikasi dan dinyatakan memiliki perbedaan pada bagian O-antigen. Bagian unit berulang O-antigen LPS Pta adalah  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-L-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow ]_n$ , sedangkan struktur O-antigen LPS Pgl adalah  $[\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 2)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-D-Rhap-(1}\rightarrow ]_n$  (Data dari Institut Tsukuba, belum dipublikasikan). Perbedaan yang tampak dari bagian O-antigen LPS kedua bakteri adalah O-antigen LPS Pta mengandung unit L-rhamnosa dan D-rhamnosa, sedangkan O-antigen LPS Pgl hanya tersusun atas unit D-rhamnosa. Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa LPS Pgl menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau lebih kuat dibandingkan LPS Pta diduga karena reseptor pada sel tembakau lebih mengenali LPS bakteri Pgl, dengan struktur O-antigen yang hanya tersusun atas unit D-rhamnosa sebagai molekul penginduksi respons pertahanan daripada LPS Pta yang memiliki struktur O-antigen terdiri atas unit L-rhamnosa dan D-rhamnosa.

Berdasarkan Koivistoinen (2008) struktur L-rhamnosa (L-6-deoxy-mannose) merupakan gula deoksi yang banyak terdapat pada senyawa penyusun dinding sel tanaman, misalnya pada hemiselulosa dan pektin. Lebih lanjut dinyatakan struktur L-rhamnosa lebih umum dijumpai di alam dibandingkan struktur D-rhamnosa sebagai sumber karbon. Kondisi demikian dapat menyebabkan struktur D-rhamnosa lebih dikenali sebagai struktur yang asing bagi sel tanaman dibandingkan struktur L-rhamnosa. Oleh karena itu, sel tanaman tembakau lebih mengenali LPS bakteri Pgl (O-antigen hanya tersusun atas unit D-rhamnosa) sebagai molekul asing dibandingkan LPS Pta (O-antigen terdiri atas unit L-rhamnosa dan D-rhamnosa), sehingga LPS bakteri Pgl mampu menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau lebih kuat dibandingkan LPS Pta.

Peran penting struktur O-antigen LPS terhadap induksi respons pertahanan tanaman dibuktikan juga oleh penelitian van Loon *et al.* (1998) yang melaporkan bahwa mutan bakteri *Pseudomonas fluorescens* yang kehilangan struktur O-antigen memberi pengaruh yang berbeda terhadap penginduksian ISR (*Induced Systemic Resistance*) dibandingkan *P. fluorescens wild type*. Penelitian lain menunjukkan bahwa selain O-antigen, struktur LPS yang lain seperti lipid A dan inti oligosakarida juga diindikasikan berperan dalam proses pengenalan oleh reseptor tanaman. Hasil penelitian Newman *et al.* (2000) menunjukkan lipid A yang masih terikat pada inti oligosakarida LPS *Xanthomonas campestris* adalah bagian yang menginduksi resistansi lokal (*Localized Induced Resistance-LIR*) pada tanaman cabai. Akan tetapi, bagian lipid A ataupun inti oligosakarida LPS bakteri tersebut dalam keadaan terpisah tidak mampu menginduksi respons pertahanan.

### 2.2.3 Pengaruh perbedaan konsentrasi LPS dan waktu inkubasi terhadap luas area deposisi *callose* yang diinduksi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl

Berdasarkan grafik uji Duncan, LPS bakteri Pgl cenderung menginduksi deposisi *callose* lebih tinggi dibandingkan LPS Pta (Gambar I.8). Akan tetapi,

tabel hasil analisis uji Duncan untuk luas area deposisi *callose* yang diinduksi oleh LPS bakteri pada masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan adanya perbedaan pengaruh perlakuan (konsentrasi dan waktu inkubasi) terhadap luas area deposisi *callose* yang diinduksi oleh bakteri Pta dan Pgl (Tabel I.2).

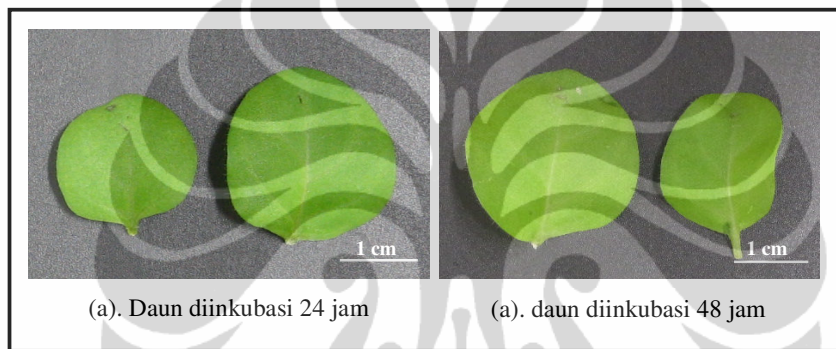
Luas area deposisi *callose* pada daun dengan perlakuan LPS 400  $\mu\text{g/ml}$  dan waktu inkubasi 24 jam (kelompok perlakuan 1) tidak menunjukkan perbedaan diantara kedua jenis LPS bakteri (Tabel I.2a), sedangkan pada perlakuan LPS 800  $\mu\text{g/ml}$  dan waktu inkubasi 24 jam (kelompok perlakuan 2) menunjukkan perbedaan (Tabel I.2b). Hasil ini memperlihatkan bahwa pada perlakuan inkubasi 24 jam, perbedaan baru terlihat pada konsentrasi LPS 800  $\mu\text{g/ml}$ .

Luas deposisi *callose* pada daun dengan perlakuan LPS 400  $\mu\text{g/ml}$  dan waktu inkubasi 48 jam (kelompok perlakuan 3) menunjukkan perbedaan di antara kedua jenis LPS bakteri (Tabel I.2c), sedangkan pada perlakuan LPS 800  $\mu\text{g/ml}$  dan waktu inkubasi 48 jam (kelompok perlakuan 4) tidak menunjukkan perbedaan (Tabel I.2d). Hasil ini memperlihatkan bahwa pada perlakuan inkubasi 48 jam, perbedaan sudah terlihat pada konsentrasi LPS 400  $\mu\text{g/ml}$ , namun konsentrasi LPS yang lebih tinggi tidak memengaruhi luas area *callose*.

Berdasarkan data di atas dapat dinyatakan bahwa pada waktu inkubasi yang lebih pendek (24 jam), konsentrasi LPS berpengaruh terhadap perbedaan luas area *callose* yang diinduksi Pta dan Pgl, sedangkan pada waktu inkubasi yang lebih lama (48 jam), konsentrasi LPS tidak memengaruhi perbedaan luas area *callose*. Tidak adanya pengaruh konsentrasi LPS terhadap luas area *callose* pada daun yang diinkubasi selama 48 jam dapat disebabkan oleh kondisi fisiologis daun yang sudah menurun. Daun tembakau yang dijadikan sampel perlakuan adalah daun yang dipisahkan (terlepas) dari induknya, sehingga sulit bagi daun untuk menjaga kondisi daun tetap segar dalam waktu cukup lama. Berdasarkan pengamatan visual terhadap daun-daun yang diinkubasi selama 48 jam, tampak pada beberapa daun sudah mengalami penurunan *fitness* (kesegaran) dibandingkan daun yang dinkubasi selama 24 jam (Gambar I.9). Penurunan *fitness* daun tentu saja berpengaruh terhadap respons pertahanan yang dihasilkan tanaman. Respons pertahanan tanaman berupa deposisi *callose* pada daun



tembakau yang diinkubasi 48 jam, diduga tidak hanya diinduksi oleh LPS bakteri, namun juga oleh kondisi daun itu sendiri. Hasil ini juga tampak pada daun tembakau yang diinkubasi selama 48 jam yang hanya diinfiltrasi oleh H<sub>2</sub>O (perlakuan 3). Daun dengan perlakuan H<sub>2</sub>O tersebut memberikan respons deposisi *callose* yang lebih tinggi dibandingkan LPS bakteri Pta, hal tersebut kemungkinan juga disebabkan oleh kondisi beberapa daun yang menurun. Oleh karena itu, perlu penelitian lebih lanjut menggunakan sampel daun yang tidak dipisahkan dari tanaman induk, untuk mengetahui pengaruh LPS bakteri terhadap deposisi *callose*.



Gambar I.9 Pengamatan visual terhadap kondisi kesegaran (*fitness*) daun tembakau yang diinfiltrasi oleh LPS bakteri dan diinkubasi selama 24 jam dan 48 jam.

Tabel I. 2 Hasil perhitungan statistik uji Duncan mengenai pengaruh perbedaan jenis LPS bakteri (Pta dan Pgl) terhadap luas area deposisi *callose* pada daun tembakau di setiap kelompok perlakuan.

(a). Kelompok perlakuan I (LPS 400 µg/ml dan waktu inkubasi 24 jam)				(b). Kelompok perlakuan II (LPS 800 µg/ml dan waktu inkubasi 24 jam)					
	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1*	2*				1*	2*
Duncan <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O 24 jam	4	132.5		Duncan <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O 24 jam	4	132.5	
	Pta 400 24 jam	6	356.8			Pta 800 24 jam	6	516.0	516.0
	Pgl 400 24 jam	6	849.5			Pgl 800 24 jam	6		1.0592E3
	Sig.		.238			Sig.		0.258	
(c). Kelompok perlakuan III (LPS 400 µg/ml dan waktu inkubasi 48 jam)				(d). Kelompok perlakuan IV (LPS 800 µg/ml dan waktu inkubasi 48 jam)					
	Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05			Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05	
			1*	2*				1*	2*
Duncan <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O 48 jam	4	374.8		Duncan <sup>a</sup>	H <sub>2</sub> O 24 jam	4	532.7	
	Pta 400 48 jam	6	532.7			Pta 800 24 jam	6	3713.6	
	Pgl 400 48 jam	6		2.2762E3		Pgl 800 24 jam	6	5549.8	
	Sig.		.811			Sig.		.128	
(e). Tabel kesimpulan hasil uji Duncan pengaruh luas area deposisi <i>callose</i> yang diinduksi LPS bakteri Pta dan Pgl pada setiap kelompok perlakuan									
	Kelompok perlakuan I	Kelompok perlakuan II	Kelompok perlakuan III	Kelompok perlakuan IV					
	Inkubasi 24 jam		Inkubasi 48 jam						
	LPS 400 µg/ml	LPS 800 µg/ml	LPS 400 µg/ml	LPS 800 µg/ml					
Pengaruh luas area deposisi <i>callose</i> yang diinduksi oleh LPS Pta dan Pgl	Tidak ada perbedaan	Terdapat perbedaan	Terdapat perbedaan	Tidak ada perbedaan					

Ket: \* data hasil perhitungan yang dikelompokkan menjadi satu kolom yang sama diartikan tidak ada perbedaan, sedangkan data hasil perhitungan yang didikelompokkan ke dalam dua kolom yang berbeda diartikan ada perbedaan antara luas area *callose* yang diinduksi LPS *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl).

#### 2.2.4 Korelasi antara perlakuan (jenis LPS bakteri, konsentrasi LPS dan waktu inkubasi) terhadap deposisi *callose*

Untuk mengetahui korelasi antara perlakuan yang digunakan saat penelitian, yaitu jenis LPS bakteri, konsentrasi LPS dan waktu inkubasi, maka dilakukan uji Korelasi Pearson. Berdasarkan perhitungan uji korelasi didapatkan hasil mengenai signifikansi korelasi antara luas area *callose* dengan macam-macam perlakuan yang digunakan saat penelitian (Tabel I.3). Pada tabel I.3 tampak bahwa korelasi antara luas area *callose* dengan waktu inkubasi sangat signifikan (korelasi Pearson sebesar 0,349), korelasi luas area *callose* dengan jenis LPS bakteri cukup signifikan (korelasi Pearson sebesar 0,278), dan korelasi luas area *callose* dengan konsentrasi LPS tidak signifikan (korelasi Pearson sebesar 0,044). Hasil tersebut menunjukkan bahwa waktu inkubasi adalah perlakuan yang paling berpengaruh terhadap besarnya luas area deposisi *callose* pada daun tembakau, diikuti oleh perbedaan jenis LPS bakteri (Pta atau Pgl), dan perlakuan konsentrasi LPS dinyatakan tidak berpengaruh secara signifikan.

Tabel I.3 Analisis hasil uji statistik korelasi Pearson antara luas area *callose* dengan waktu inkubasi, konsentrasi LPS dan jenis LPS bakteri

<b>Correlations</b>				
	Luas area <i>callose</i>	lama inkubasi	konsentrasi LPS	Bakteri LPS
Luas area <i>callose</i> Pearson Correlation	1	.349**	.044	.278*
Sig. (2-tailed)		.009	.748	.040
N	55	55	55	55

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
\* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Waktu inkubasi sangat berpengaruh pada penginduksian deposisi *callose* pada daun tembakau. Hasil tersebut dapat dipahami terkait dengan peran deposisi *callose* pada sistem pertahanan tanaman. Deposisi *callose* merupakan salah satu respons pertahanan yang termasuk pertahanan tingkat awal (Erbs & Newman

2003) dan berfungsi untuk mencegah dan menghambat penetrasi patogen (Nishimura *et al.* 2003; Buonauro 2008). Hal tersebut berarti semakin lama patogen menginfeksi maka kemungkinan patogen akan berpenetrasi ke dalam tanaman lebih luas dan lebih dalam lagi. Pada kondisi demikian, sebagai bentuk respons yang dapat menghambat penetrasi patogen, maka seiring waktu inkubasi, *callose* pun akan semakin banyak disintesis dan terdeposisi.

#### 4. KESIMPULAN

1. Lipopolisakarida (LPS) bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) mampu menginduksi deposisi *callose* pada daun tembakau.
2. Lipopolisakarida (LPS) bakteri Pgl menginduksi deposisi *callose* lebih banyak dibandingkan LPS dari bakteri pgl pada daun tembakau
3. Luas area deposisi *callose* berkorelasi sangat signifikan dengan waktu inkubasi, dan berkorelasi cukup signifikan dengan jenis LPS bakteri, sedangkan konsentrasi LPS tidak memiliki korelasi yang signifikan terhadap luas area deposisi *callose*.
4. Respons pertahanan pada sel-sel tanaman tembakau berupa deposisi *callose* bergantung pada faktor fisiologis sel

#### 5. SARAN

Perlu dilakukan penelitian mengenai induksi deposisi *callose* menggunakan sampel daun yang tidak dipisahkan dari tanaman induk untuk waktu inkubasi lebih dari 24 jam.

## 6. DAFTAR ACUAN

- Adam, L. & S. C. Somerville. 1996. Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* **9**(3): 341--356.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, California: xxv + 922 hlm.
- Bahsan, Y. 1997. Alternative strategies for controlling plant diseases caused by *Pseudomonas syringae*. *Dalam*: Rudolph, K., T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian & J. von Kietzell (eds.). 1997. *Developments in Plant Pathology Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens*. Kluwer Academic Publishers, (?): 575--583.
- Batchvarova, R., V. Nikolaeva, S. Slavov, S. Bossolova, V. Valkov, S. Atanassova, S. Guelemerov, A. Atanassov & H. Anzai. 1998. Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 986--989.
- Buonaurio, R. 2008. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. *Dalam*: Barka, E. A. & C. Clement (eds.). 2008. *Plant-Microbe Interaction*. Research signpost, Kerala: 169--197.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L. A. Urry, M. C. Cain, S. A. Wasserman, P. V. Minorsky & R. B. Jackson. 2008. *Biology*. ed. 8th. Pearson Education, Inc., San Francisco: xlvi+1267 hlm.
- Casabuono, A., S. Silvana Petrocelli, J. Ottado, E. G. Orellano & A. S. Couto. 2011. Structural analysis and involvement in plant innate immunity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* lipopolysaccharide. *Journals of Biological Chemistry (JBC)*: 1--30.
- Chen, X. & J. Kim. 2009. Mini review: Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behaviour* **4**(6): 489--492.
- Dickinson, M. 2003. *Molecular plant pathology*. BIOS Scientific Publishers, London: xvii + 273 hlm.

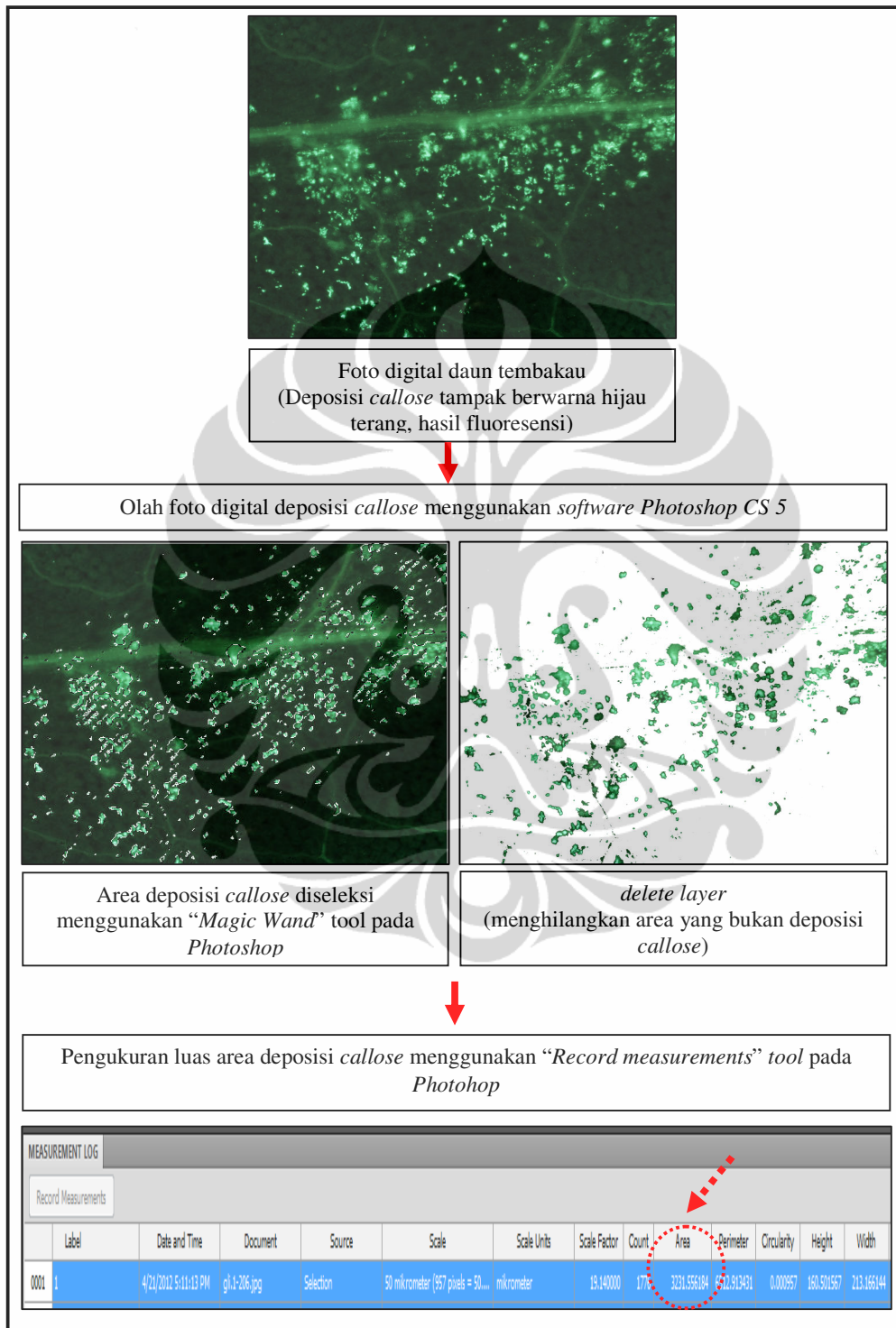
- Dow, M., M. A. Newman & E. V. Roepenack. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review Phytopathology* **38**: 241--261.
- Erbs, G. & M.A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* **4**(5): 421--425.
- Evert, R. F. 2006. *Esau's Plant Anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body : their structure, function, and development*. 3rd ed. A John Wiley & Sons, Inc., New Jersey: xx + 601 hlm.
- Flors, V., J. Ton, G. Jakab & B. Mauch-Mani. 2005. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens. *Journal of Phytopathology* **153**: 377--383.
- Gerber, I. B., D. Zeidler, J. Durner & I. A. Dubery. 2004. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* **218**: 647--657.
- Gimenez-Ibanez, S. & J. P. Rathjen. 2010. The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection* **12**: 428--437.
- Graham, T. L., L. Sequeira & T. S. R. Huang. 1977. Bacterial Lipopolysaccharides as Inducers of Disease Resistance in Tobacco. *Applied and Environmental Microbiology*, **34**(4): 424-432.
- Gross, A., D. Kapp, T. Nielse & K. Niehaus. 2005. Endocytosis of *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* lipopolysaccharides in non-host plant cells of *Nicotiana tabacum*. *New Phytologist* **65**: 215--226.
- Hann, D. R. & J. P. Rathjen. 2007. Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* **49**: 607--618.
- Koivistoinen, O. 2008. L-rhamnose-1-dehydrogenase gene and L-rhamnose catabolism in the yeast *Pichia stipitis*. Master's Thesis. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki: 62 hlm.
- Lancioni, P. 2008. *Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato*. Dottorato di Ricerca, Bologna: 125 hlm.

- Livaja, M., D. Zeidler, U. von Rad & J. Durner. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**: 161--171.
- Luna, E., V. Pastor, J. Robert, V. Flors, B. Mauch-Mani, J. Ton. 2011. Callose Deposition: A Multifaceted Plant Defense Response. *Molecular Plant-Microbe Interaction (MPMI)* **24**(2): 183--193.
- Meyer, A., A. Puhler & K. Niehaus. 2001. The lipopolysaccharide of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**: 214--222.
- Millet, Y. A., C. H. Danna, N. K. Clay, W. Songnuan, M. D. Simon, D. Werck-Reichhart & F. M. Ausubela. 2010. Innate Immune Responses Activated in *Arabidopsis* Roots by Microbe-Associated Molecular Patterns. *The Plant Cell* **22**: 973--990.
- Newman, M., E. von Roepenack, M. Daniels & M. Dow. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* **1**(1): 25--31.
- Newman, M. A., J. M. Dow & M. J. Daniels. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and plant-patogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 95--102.
- Nishimura, M. T., M. Stein, B. H. Hou, J. P. Vogel, H. Edwards & S. C. Somerville. 2003. Loss of a *callose* synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**: 969--972.
- Nomura, K., M. Melotto & S. He. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interaction. *Current opinion in Plant Biology* **8**: 361--368.
- Piater, L. A., T. Nurnberger & I. A. Dubery. 2004. Identification of a lipopolysaccharide responsive erk-like MAP kinase in tobacco leaf tissue. *Molecular Plant Pathology* **5**: 331--341.

- Sanabria, N. M. & I. A. Dubery. 2006. Differential display profiling of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**:1001--1007.
- Sigee, D. C. 1993. *Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects*. Cambridge University Press, Cambridge: xi + 325 hlm.
- Spencera, M., C. M. Ryub, K. Y. Yanga, Y. C. Kimc, J. W. Kloepperb & A. J. Anderson. 2003. Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 involves at least the ethylene pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 27--34.
- Strange, R. N. 2003. *Introduction to Plant Pathology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xvi + 479 hlm.
- Taiz, L. & E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland: iv + 623 hlm.
- van Loon, L. C., P. A. H. M. Bakker & C. M. J. Pieterse. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review Phytopathology* **36**: 453--483.
- Young, J. M. 2010. Minireview: Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* **92**: S1.5-S1.14.
- Zeidler, D., U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler & J. Durner. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **101**(44): 15811--15816.
- Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology* **20**: 10--16.
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in Plant Biology* **12**: 414--420.



Lampiran 1. Kuantifikasi area deposisi *callose* menggunakan *software photoshop CS 5*



Lampiran 2. Tabel total luas area deposisi *callose* pada setiap sampel daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri

	Masa inkubasi 24 jam					Masa inkubasi 48 jam				
	H <sub>2</sub> O	400 µg/ml LPS		800 µg/ml LPS		H <sub>2</sub> O	400 µg/ml LPS		800 µg/ml LPS	
		Pta	Pgl	Pta	Pgl		Pta	Pgl	Pta	Pgl
<b>Daun 1</b>	3	46	191	86	89	77	43	79	339	298
	1	24	39	51	215	33	61	81	232	4547
	15	104	33	119	38	474	29	58	205	3232
	18	17	20	133	98		51	178	54	327
		41		182	21			29	326	176
		32			249				104	112
		47			60					134
										369
<b>Σ</b>	<b>37</b>	<b>311</b>	<b>282</b>	<b>571</b>	<b>771</b>	<b>583</b>	<b>184</b>	<b>426</b>	<b>1260</b>	<b>9194</b>
<b>Daun 2</b>	2	89	30	29	95	110	34	297	607	832
	242	25	26	20	39	7	34	40	86	68
	125	6	184	22	128	11	31			87
	15		32	20	13	569				
	17		13	9	7	299				
	12		28	8	7	310				
						18				
<b>Σ</b>	<b>413</b>	<b>120</b>	<b>313</b>	<b>109</b>	<b>290</b>	<b>1325</b>	<b>99</b>	<b>337</b>	<b>693</b>	<b>987</b>
<b>Daun 3</b>	1	319	574	376	91	37	65	788	486	2353
	5	294	270	202	36	36	78	2018	779	115
	5	69	191	155	28	7	98	37	12	41
		17	371	312	44	38	375	97	8	563
		18	738	43	37	18	778	75	23	22
		36	496	45		10	6	9	16	13
			565			16	8		4	
			229							
		266								
<b>Σ</b>	<b>11</b>	<b>753</b>	<b>3700</b>	<b>1132</b>	<b>237</b>	<b>162</b>	<b>1409</b>	<b>3024</b>	<b>1328</b>	<b>3105</b>
<b>Daun 4</b>	14	69	33	103	158	11	26	1974	965	828
	39	78	70	106	181	6	111	1252	106	1005
	16	303	94	186	692	8	13	547	87	898
		33	84	141	344	26	31	59	35	136
			60	37	174	9	5	11		168
			46	60	196					357
			13	49	55					48
					88					58
									13	
<b>Σ</b>	<b>69</b>	<b>482</b>	<b>400</b>	<b>682</b>	<b>1887</b>	<b>61</b>	<b>187</b>	<b>3842</b>	<b>1194</b>	<b>3511</b>

## Lanjutan lampiran 2

	Masa inkubasi 24 jam				Masa inkubasi 48 jam					
	H <sub>2</sub> O	400 µg/ml LPS		800 µg/ml LPS		H <sub>2</sub> O	400 µg/ml LPS		800 µg/ml LPS	
		Pta	Pgl	Pta	Pgl		Pta	Pgl	Pta	Pgl
<b>Daun 5</b>		20	76	65	222		86	43	354	205
		8	38	30	344		33	44	975	916
		27	24	70	208			614	2551	1286
		42	28	145	38			980	99	594
		48	44	45	91			42	121	
		26	52	62	147			45	353	
		13	32		74			175	469	
		26			54			635	265	
		22			123			13	3264	
					17				2503	
					25				2538	
									216	
									316	
									69	
<b>Σ</b>		<b>231</b>	<b>294</b>	<b>418</b>	<b>1344</b>		<b>119</b>	<b>2589</b>	<b>14093</b>	<b>3001</b>
<b>Daun 6</b>		38	40	77	220		16	1324		927
		107	23	43	644		37	252		641
		17	22	63	487		198	437		714
		29	12		58			105		869
		32	12		142			146		1263
		21			119			275		1277
					87			417		519
					45			105		2290
					25			117		516
								205		108
								56		3108
										815
										81
										372
<b>Σ</b>		<b>244</b>	<b>108</b>	<b>184</b>	<b>1826</b>		<b>251</b>	<b>3439</b>		<b>13501</b>

Lampiran 3. Tabel hasil uji normalitas data

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		Luas area callose
N		55
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	1584.0545
	Std. Deviation	2850.17468
Most Extreme Differences	Absolute	.291
	Positive	.288
	Negative	-.291
Kolmogorov-Smirnov Z		2.154
Asymp. Sig. (2-tailed)		.000
a. Test distribution is Normal.		

Lampiran 4. Tabel hasil uji homogenitas data menggunakan uji ANOVA

Test of Homogeneity of Variances			
Luas area callose			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
6.860	9	45	.000

## Makalah II

# EKSPRESI GEN *PAL*, *HIN 1* DAN *HSR 203 J* PADA TANAMAN TEMPAKAU (*Nicotiana tabacum*) YANG DIINDUKSI OLEH LIPOPOLISAKARIDA BAKTERI *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* DAN *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*

Pipit Marianingsih

Program Studi Pascasarjana Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia.  
Email: p\_marianingsih@yahoo.com

### ABSTRACT

A study on expression of defense-related genes (*PAL*, *HIN 1* and *HSR 203J*) was done to determine tobacco defense response induced by lipopolysaccharide (LPS). LPS is a major component of outer membrane Gram negative bacteria, which can act as PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns). Recognition PAMP/MAMP by plant PRRs can induce defense response. To investigate defense-related gene expression, tobacco leaves were infiltrated with 400 µg/ml extracted from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) and *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl), then incubated for 6 hr. Analysis of defense-related genes expression were conducted by RT-PCR and visualized by electrophoresis on a 1.8% agarose gel. The result showed LPS Pta and Pgl can induce expression of *HIN 1* gene in tobacco leaves, but can not induce the *PAL* and *HSR 203J* genes. The *HIN 1* gene was highly expressed in tobacco leaves induced by LPS Pgl.

**Keywords:** defense-related gene; *PAL*, *HIN 1*, *HSR 203J*; lipopolysaccharide;  
*Pseudomonas syringae*; tobacco

## 1. PENDAHULUAN

*Pseudomonas syringae* merupakan bakteri Gram negatif yang menyebabkan penyakit pada banyak tanaman perkebunan (Dickinson 2003; Nomura *et al.* 2005), seperti pada tembakau dan kedelai. Bakteri *P. syringae* pv. *tabaci* (Pta) merupakan penghasil *tabtoxin* yang menyebabkan penyakit *wildfire*, salah satu penyakit yang paling merusak pada perkebunan tembakau. Sementara itu, *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl) merupakan penghasil fitotoksin *coronatine* yang menyebabkan penyakit *bacterial blight* pada kedelai (Sigeo 1993).

Penyakit pada tanaman dapat menyebabkan masalah, baik bagi manusia, hewan ataupun tanaman itu sendiri. Tanaman berpenyakit dapat menjadi racun bagi manusia maupun hewan, serta dapat mengakibatkan berkurangnya kuantitas dan kualitas produksi dari tanaman tersebut (Agrios 2005), sehingga diperlukan upaya pengendalian terhadap patogen penyebab penyakit. Salah satu pendekatan yang dilakukan untuk mengurangi penyakit pada tanaman adalah melalui penginduksian respons pertahanan tanaman (Bahsan 1997). Bentuk respons pertahanan terinduksi pada tanaman antara lain deposisi *callose*, *oxidative burst*, produksi senyawa antimikroba fitoaleksin, aktivasi *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), aktivasi *pathogenesis-related protein* (PR), induksi *Hypersensitive Response* (HR), dan induksi gen-gen terkait pertahanan tanaman (Strange 2003; Agrios 2005; Buonauro 2008).

Induksi gen-gen terkait pertahanan merupakan respons pertahanan yang banyak diteliti, karena merupakan respons pertahanan yang dikontrol oleh materi genetik (gen) (Agrios 2005). Pendekatan genetik dan molekular dapat digunakan untuk mempelajari mekanisme sinyaling (sinyal transduksi) yang terlibat dalam penginduksian respons pertahanan tanaman (Chakravarthy *et al.* 2010).

Gen-gen terkait pertahanan yang dapat terinduksi pada tanaman diantaranya adalah gen *PAL*, *HIN 1*, dan *HSR 203J*. Gen *PAL* (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*) merupakan gen pengkode enzim *PAL*, yang menjadi prekursor untuk jalur biosintesis fenilpropanoid. Jalur biosintesis tersebut berperan dalam sintesis senyawa antimikroba fitoaleksin. Enzim *PAL* juga diindikasikan terlibat

dalam biosintesis asam salisilat, yang dikenal sebagai hormon pertahanan tanaman (Durner *et al.* 1998). Gen *HIN 1* (*Harpin-Induce*) adalah gen yang terinduksi oleh molekul harpin, suatu protein yang disekresikan oleh bakteri patogen dan diketahui dapat menginduksi respons pertahanan tanaman (Takahashi *et al.* 2004). Adapun gen *HSR 203J* (*Hypersensitive-related*) adalah gen yang terkait dengan respons hipersensitif (HR), ditandai oleh peristiwa nekrosis di tempat terjadinya infeksi patogen. Terjadinya HR dapat menghambat penyebaran dan infeksi mikroorganisme yang lebih luas (Pontier *et al.* 1994).

Induksi respons pertahanan, termasuk ekspresi gen pertahanan, diawali dengan dengan tahap pengenalan patogen atau molekul patogen, yang disebut dengan *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs/MAMPs), oleh reseptor pada sel tanaman (Zipfel 2008; Zipfel 2009). Molekul PAMP/MAMP yang telah diketahui diantaranya adalah flagelin, *Elongation factor-Tu* (EF-Tu), harpin, peptidoglikan dan lipopolisakarida (Livaja *et al.* 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif yang dapat menjadi target pengenalan oleh sel-sel tanaman dalam induksi respons pertahanan (Erbs & Newman 2003). Struktur LPS terdiri atas tiga bagian utama, yaitu lipid A, inti oligosakarida dan rantai polisakarida dengan unit berulang oligosakarida yang disebut rantai-O spesifik (O-antigen) (Dow *et al.* 2000; Newman *et al.* 2001).

Lipopolisakarida (LPS) dilaporkan dapat menginduksi ekspresi gen pertahanan pengkode protein PR (*pathogenesis-relate*) pada tanaman tembakau (Coventry & Dubery 2001); *Arabidopsis* (Zeidler *et al.* 2004), dan cabai (Newman *et al.* 2000). Lebih lanjut, Berdasarkan Zeidler *et al.* (2004) LPS dinyatakan dapat menginduksi sejumlah gen terkait stress atau gen pertahanan lainnya, seperti gen-gen pengkode kelompok protein glutathion S-transferase, kelompok protein sitokrom P450, peroksidase, dan RuBisCO activase. Akan tetapi, belum diketahui kemampuan LPS dalam menginduksi ekspresi gen pertahanan *PAL*, *HIN 1*, dan *HSR 203J* pada tanaman tembakau sebagai salah satu tanaman yang sering digunakan dalam penelitian interaksi patogen dan tanaman.

Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui dan membandingkan kemampuan LPS dari bakteri fitopatogen *P. syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *P. syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dalam menginduksi ekspresi gen *PAL*, *HIN 1*, dan *HSR 203J* pada tanaman tembakau.

## 2. METODE PENELITIAN

### A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan selama 6 bulan (Oktober 2010--Maret 2011) di Laboratorium Penyakit Tanaman dan Rekayasa Genetik Fakultas Pertanian Universitas Okayama (Jepang).

### B. Bahan dan Cara kerja

#### B.1 Tanaman

Sampel yang digunakan adalah daun tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi). Tanaman tersebut berasal dari biji yang ditumbuhkan pada *vermiculite* di ruang tanam bersuhu 26 °C, selama kurang lebih 12 minggu.

#### B.2 Ekstraksi lipopolisakarida (LPS)

Ekstraksi LPS bakteri bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dilakukan menggunakan *LPS kit extraction* [INTRON]. Bakteri yang telah ditumbuhkan selama 24 jam pada medium KB (*King's B medium*) cair dipindahkan ke dalam ependorf, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu ruang, selama 30--60 detik untuk memisahkan bakteri dengan medium. Pelet yang didapat kemudian ditambahkan 1 ml larutan *lysis buffer*, lalu divortex. Setelah itu, ditambahkan 200 µl kloroform, divortex, dan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada



suhu 4 °C, selama 10 menit. Selanjutnya, sebanyak 400 µl supernatan dipindahkan pada ependorf baru, ditambahkan 800 µl larutan buffer purifikasi, divortex, dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu -20 °C. Setelah inkubasi, larutan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4 °C, selama 15 menit. Pelet yang didapat adalah LPS. Tahap berikutnya, pelet dicuci menggunakan 1 ml EtOH 70% dingin, kemudian ependorf dibolak-balik menggunakan tangan atau divortex agar larutan tercampur dengan pelet. Selanjutnya, larutan disentrifugasi dengan kecepatan 13000 rpm, pada suhu 4 °C, selama 3 menit dan supernatan dibuang. Pelet yang didapat dikeringkan pada suhu ruang. Setelah cukup kering, pelet ditambahkan 70 µl H<sub>2</sub>O dan divortex sampai pelet larut. Pelarutan LPS, selain dilakukan dengan H<sub>2</sub>O juga dapat dilakukan dengan larutan 10mM Tris-HCl buffer (pH 8) untuk penyimpanan LPS dalam waktu yang lama.

Hasil ekstraksi LPS selanjutnya dianalisis dengan metode SDS-PAGE (*Sodium dodecylsulphaate polyacrylamide gel electrophoresis*) 15%. Sebanyak 10 µl sampel LPS dicampurkan dengan 2 µl sampel *loading buffer*. Sampel dimasukkan kedalam tiap sumur pada gel dan dielektroforesis pada voltase 10 mA selama kurang lebih 30 menit saat sampel berada pada *stacking gel*, dan dielektroforesis pada voltase 20 mA selama kurang lebih 90 menit saat sampel berada pada *running gel*. Setelah proses elektroforesis selesai, gel diwarnai dengan pewarnaan perak.

### **B.3 Infiltrasi LPS bakteri pada daun tembakau**

Daun tembakau diinfiltrasi dengan 400 µg/ml LPS bakteri, Pta dan Pgl. Infiltrasi LPS dilakukan menggunakan alat suntik tanpa jarum, sampai seluruh bagian daun tampak terisi oleh LPS, kemudian daun diinkubasi selama 6 jam pada suhu 26 °C. Setelah waktu inkubasi selesai, daun dibungkus dengan alumunium foil dan direndam beberapa saat dalam nitrogen cair untuk menghentikan proses-proses yang terjadi di daun. Sebagai perlakuan kontrol, daun diinfiltrasi dengan dH<sub>2</sub>O. Perlakuan dengan dH<sub>2</sub>O tersebut dianggap sebagai kontrol negatif karena

diharapkan daun yang diinduksi oleh  $dH_2O$  tidak akan memberikan respons pertahanan.

#### **B.4 Isolasi RNA**

Isolasi RNA dari sampel daun tembakau dilakukan menggunakan Trizol reagen [Invitrogen]. Isolasi RNA terdiri dari lima tahap, yaitu homogenisasi, fase separasi, presipitasi RNA, pencucian RNA dan pelarutan kembali RNA. Tahap homogenisasi, daun diletakkan dalam mortar, dihaluskan menggunakan pestel dan ditambahkan 1 ml Trizol reagent lalu dimasukkan dalam ependorf. Selanjutnya adalah fase separasi. Ependorf berisi sampel diinkubasi selama 5 menit, lalu ditambahkan 0.2 ml kloroform. Selanjutnya, sampel diinkubasi selama 3 menit, disentrifugasi dengan kecepatan 11000 rpm, pada suhu  $4^{\circ}C$ , selama 10 menit. Selanjutnya, lapisan teratas pada larutan dipindahkan ke ependorf baru dan ditambahkan larutan fenol : kloroform : isoamil alkohol (25 : 24 : 1) sebanyak volume yang sama dengan cairan lapisan atas yang dipindahkan ke dalam ependorf baru. Semua larutan dicampur dengan cara divorteks, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 11000 rpm, pada suhu  $4^{\circ}C$ , selama 15 menit. Lapisan teratas yang terbentuk diasumsikan mengandung RNA dan sudah terpisah dengan isi sel lainnya. Tahap presipitasi RNA, larutan mengandung RNA ditambahkan 0,5 ml isopropil alkohol, kemudian divorteks. Selanjutnya, diinkubasi selama 10 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 11000 rpm, pada suhu  $4^{\circ}C$ , selama 10 menit. Pelet yang terbentuk adalah RNA. Tahapan selanjutnya adalah pencucian RNA. Sebanyak 1 ml alkohol 70% dingin ditambahkan pada RNA, lalu divorteks dan disentrifugasi dengan kecepatan 7500 rpm, pada suhu  $4^{\circ}C$ , selama 5 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang dan hanya tersisa pelet. Pada pelet dilakukan pengeringan dengan alat vakum selama 5 menit. Tahap terakhir adalah pelarutan kembali RNA. RNA dilarutkan dalam 50 ml  $dH_2O$  yang sudah disterilisasi.

Hasil isolasi RNA diukur kuantitas atau konsentrasinya menggunakan alat nanodrop spektrofotometer. Sementara itu, kualitas RNA divisualisasikan dengan

teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa 1,8% sebagai medium. Sebanyak 2 µg sampel RNA yang telah dilarutkan dengan 10 µl *loading buffer (loading dye)* dimasukkan dalam sumur gel agarosa. Proses elektroforesis RNA dilakukan pada tegangan 50 volt selama 1--1.5 jam. Kemudian, gel hasil elektroforesis direndam dalam etidium bromida selama 20 menit kemudian dibilas menggunakan dH<sub>2</sub>O selama 1--3 jam. Pita-pita RNA yang terbentuk pada gel diamati dengan *UV-light*.

### **B.5 Reaksi transkripsi balik (*Reverse Transcription Reaction-RT Reaction*)**

Tahap reaksi transkripsi balik (*Reverse Transcription Reaction-RT Reaction*) dilakukan untuk mendapatkan cDNA. Proses tersebut dilakukan dalam mesin *Polymerase Chain Reaction (PCR) thermal cycler*. Dalam ependorf berukuran 200 µl, sebanyak 2 µg sampel RNA ditambahkan dengan 1 µl oligo (dT) *mixture*, kemudian ditambahkan dH<sub>2</sub>O sampai semua larutan berjumlah 18 µl. Selanjutnya, ependorf berisi sampel tersebut didenaturasi dengan suhu 70 °C selama 10 menit dalam mesin *thermal cycler*. Sampel kemudian dikeluarkan dari mesin PCR untuk ditambahkan 9.25 µl larutan campuran antara 1 µl AMV RT XL, 6 µl *RT buffer*, 0,25 µl *ribonuclease inhibitor* dan 2 µl *dNTP mixture*. Semua larutan yang sudah tercapur dalam ependorf, dimasukkan kembali dalam mesin *thermal cycler* untuk selanjutnya mengalami proses *annealing* pada suhu 42 °C selama 1,5 jam dan diteruskan dengan proses polimerisasi pada suhu 72 °C selama 10 menit. Sampel cDNA yang sudah diperoleh, diencerkan sebanyak 5X menggunakan dH<sub>2</sub>O steril.

### **B.6 Amplifikasi dan deteksi gen-gen terkait pertahanan tanaman**

Amplifikasi gen yang terkait pertahanan tanaman menggunakan *Polymerase Chain Reaction (PCR) thermal cycler*. Reaksi PCR dilakukan pada 1 µl cDNA sampel (hasil *RT reaction* yang sudah diencerkan 5X) yang dicampur dengan 10 µl Premix (2X), 2 µl Primer mixture dan 7 µl dH<sub>2</sub>O steril dalam

ependorf 200  $\mu$ l. Masing-masing sampel cDNA diperlakukan dengan tiga macam primer, yaitu primer untuk mendeteksi gen *EF-1 $\alpha$*  (*Elongation Factor 1  $\alpha$* , F : 5'-TCACATCAACATTGTGGTCATTGGCC-3'; R: 5'-TGGTAGCATCCATCTTGTTACAGCA-3) dan primer untuk mendeteksi gen-gen terkait pertahanan tanaman tembakau yaitu gen *PAL* (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*, F : 5'-CAAGATGTGAACTCCTTGGG-3'; R: 5'-GCATCAGTGGGTAGTTGGCG-3'), gen *HIN 1* (*Harpin-Induce 1*, F : 5'-CTTGAGCCATGCCGGAATCC-3'; R: 5'-CTCCTTCGGAGATGTGAAGATC-3') serta gen *HSR 203J* (*Hypersensitive-related*, F : 5'-AAGTATCCGGCTGGCTTAGA-3'; R: 5'-GACAATGATAGCTTTGGCCG-3').

Gen *EF-1 $\alpha$*  merupakan gen yang digunakan sebagai gen kontrol internal volume cDNA (Takahashi *et al.* 2004; Higashi *et al.* 2008). Jika sampel-sampel menampilkan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  yang sama atau hampir sama, maka diartikan volume cDNA antar sampel adalah sama dan selanjutnya dapat digunakan untuk analisis perbandingan ekspresi gen pertahanan. Proses amplifikasi gen *EF-1 $\alpha$*  juga dilakukan pada sampel kontrol negatif cDNA sebagai tahap konfirmasi kemurnian RNA hasil isolasi.

Proses amplifikasi dalam mesin PCR diawali dengan denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 2 menit, kemudian dilanjutkan dengan siklus yang masing-masing terdiri atas tiga tahap yaitu denaturasi pada suhu 95 °C selama 30 detik, pelekatan (*annealing*) pada suhu 58 °C selama 30 detik, dan elongasi pada suhu 72 °C selama 30 detik, siklus tersebut dapat berlangsung sebanyak 25--35 siklus. Setelah siklus, dilanjutkan dengan elongasi akhir pada suhu 72 °C selama 3 menit. Produk PCR dapat disimpan pada suhu 12 °C atau 4 °C.

Produk PCR divisualisasikan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa 1.8% yang dilarutkan dalam larutan TAE (*Tris Base-Acetic acid-EDTA*). sebanyak 10  $\mu$ l sampel cDNA produk PCR dimasukkan dalam sumur. Proses elektroforesis dilakukan pada tegangan 100 volt selama 20--30 menit. Gel hasil elektroforesis direndam dalam etidium bromida selama 20 menit kemudian

dibilas menggunakan dH<sub>2</sub>O selama 20 menit. Pita-pita yang terbentuk pada gel diamati dengan *UV-light*.

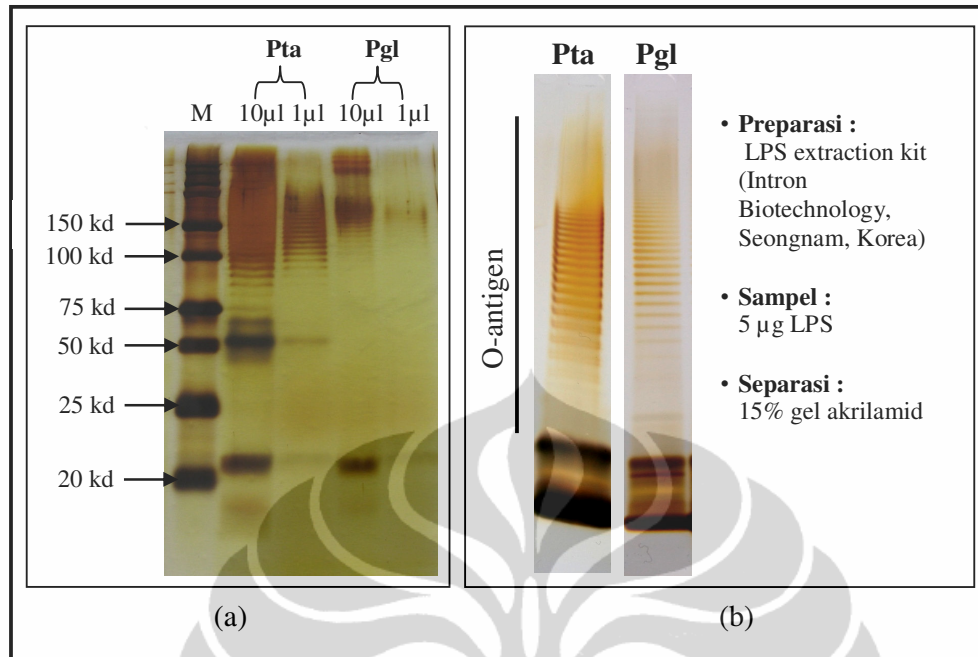
### C. Analisis data

Data ekspresi gen pertahanan *PAL*, *HIN1* dan *HSR 203J* akan dianalisis secara kualitatif dengan cara membandingkan pita-pita hasil visualisasi dengan elektroforesis dari setiap sampel.

## 3. HASIL DAN PEMBAHASAN

### A. Hasil ekstraksi lipopolisakarida (LPS) bakteri

Lipopolisakarida (LPS) diekstraksi dari dua bakteri fitopatogen *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) menggunakan *Intron extraction kit*. Berdasarkan visualisasi LPS bakteri menggunakan metode SDS PAGE (*Sodium Dodecylsulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) menunjukkan kualitas LPS Pta yang didapat lebih baik dibandingkan LPS pgl (Gambar II.1a). Akan tetapi, jumlah LPS yang terekstrak dari kedua bakteri tersebut sangat sedikit sehingga tidak dapat digunakan untuk penelitian lebih lanjut. Oleh karena itu, LPS yang digunakan saat penelitian untuk menginduksi ekspresi gen pertahanan *PAL*, *HIN 1* dan *HSR 203J* pada tanaman tembakau adalah LPS hasil ekstraksi dari Institut Tsukuba yang telah terbukti memiliki kualitas LPS yang baik serta memiliki kuantitas yang cukup (Gambar II.1b).



Gambar II.1 Visualisasi hasil elektroforesis LPS bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl). (a). LPS hasil ekstraksi pada penelitian ini; (b). LPS hasil ekstraksi dari Institut Tsukuba

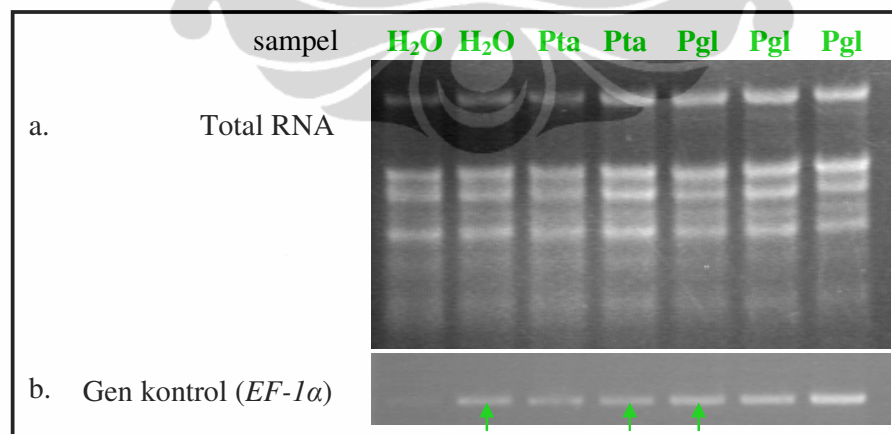
## B. Hasil isolasi RNA dan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*

Pengamatan ekspresi gen terkait pertahanan *PAL* (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*), *HIN 1* (*Harpin-Induce*), dan *HSR 203J* (*Hypersensitive-related*) pada daun tembakau yang diinduksi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl dilakukan menggunakan reaksi transkripsi balik (*Reverse Transcription Reaction-RT Reaction*). RNA diisolasi dari satu sampel daun tembakau yang telah diinfiltrasi dengan 400  $\mu\text{g/ml}$  LPS bakteri dan diinkubasi selama 6 jam. RNA kemudian melalui transkripsi balik untuk mendapatkan cDNA, yang selanjutnya digunakan untuk proses amplifikasi gen-gen pertahanan.

Pengamatan ekspresi gen pertahanan *PAL*, *HIN 1* dan *HSR 203J* pada sampel daun tembakau didahului dengan pengamatan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$* . Gen *EF-1 $\alpha$*  (*Elongation factor*) merupakan gen yang digunakan sebagai kontrol internal volume cDNA (Takahashi *et al.* 2004; Higashi *et al.* 2008). Hasil

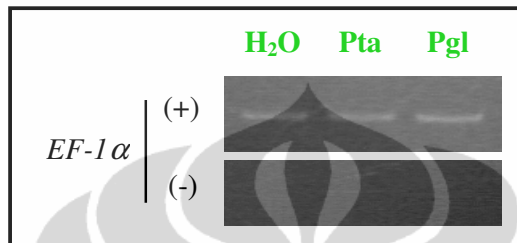
pengamatan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  pada setiap sampel daun tembakau menunjukkan sampel-sampel memiliki besaran (intensitas) pita yang tidak sama (Gambar II.1b). RNA hasil isolasi dari daun tembakau telah melalui pengukuran konsentrasi menggunakan alat nanodrop spektrofotometer, kemudian dari RNA tersebut dilakukan penyesuaian volum untuk setiap 2  $\mu\text{g}$  RNA sampel yang digunakan untuk proses transkripsi balik. Sebanyak 1  $\mu\text{l}$  volume dari cDNA yang telah diencerkan 5 kali, digunakan untuk proses amplifikasi gen *EF-1 $\alpha$* . Hasil penelitian yang menunjukkan perbedaan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  pada sampel mengindikasikan bahwa penyesuaian volume RNA untuk proses transkripsi balik tidak selalu akurat. Oleh karena itu, untuk mengetahui sampel-sampel yang memiliki konsentrasi cDNA yang sama, maka cara yang lebih baik adalah dengan pengamatan ekspresi gen menggunakan metode elektroforesis.

Sampel-sampel dengan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  yang sama dianggap memiliki konsentrasi cDNA yang sama. Berdasarkan hasil penelitian, sampel-sampel yang dianggap memiliki ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  yang hampir sama adalah sampel nomor 2 (perlakuan  $\text{H}_2\text{O}$ ), sampel nomor 4 (perlakuan LPS Pta), dan sampel nomor 5 (perlakuan LPS Pgl) (Gambar II.2). Ketiga sampel tersebut dianggap memiliki konsentrasi cDNA yang sama dan selanjutnya digunakan untuk analisis perbandingan ekspresi gen-gen terkait pertahanan.



Gambar II.2 Ekspresi RNA dan gen *EF-1 $\alpha$*  pada daun tembakau yang diinfiltrasi oleh LPS 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) dan diinkubasi selama 6 jam.

Proses amplifikasi gen *EF-1 $\alpha$*  juga dilakukan pada sampel kontrol negatif cDNA sebagai tahap konfirmasi kemurnian RNA hasil isolasi. Hasil pengamatan ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  pada setiap sampel kontrol negatif cDNA memperlihatkan tidak ada pita yang terbentuk (Gambar II.3), yang berarti tidak ada kontaminasi DNA pada sampel RNA daun tembakau.



Gambar II.3 Ekspresi gen *EF-1 $\alpha$*  dari sampel kontrol positif dan negatif cDNA daun tembakau yang diinfiltrasi LPS bakteri Pta dan Pgl serta diinkubasi selama 6 jam.

### C. Ekspresi gen-gen terkait pertahanan (*PAL*, *HIN 1* dan *HSR 203J*)

#### C.1 Ekspresi gen *PAL* (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*)

Hasil visualisasi ekspresi gen *PAL* pada sampel yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>O, LPS bakteri Pta dan Pgl menunjukkan bahwa gen *PAL* terekspresi pada ketiga perlakuan dengan ekspresi yang sama (Gambar II.4c). Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekspresi gen *PAL* belum tentu dipicu oleh LPS bakteri, karena daun yang diperlakukan dengan H<sub>2</sub>O juga mengekspresikan gen *PAL*. Dapat dikatakan ekspresi gen *PAL* lebih dipicu oleh adanya faktor cekaman (perlukaan dan tekanan) akibat proses infiltrasi. Proses infiltrasi dilakukan untuk memasukan H<sub>2</sub>O dan LPS bakteri ke dalam daun dengan cara melukai daun pada satu titik menggunakan ujung jarum kemudian dilakukan proses injeksi larutan perlakuan. Tekanan saat injeksi dapat dianggap sebagai cekaman bagi daun, sehingga daun memberikan respons terhadap cekaman tersebut. Durner *et al.* (1998) menyatakan gen *PAL* merupakan salah satu gen pertahanan yang mudah



terinduksi oleh berbagai stimulus, tidak hanya oleh patogen namun juga oleh tekanan oksidatif, cahaya ataupun perlukaan.

Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa pada banyak tanaman, gen *PAL* dapat terinduksi oleh perlukaan. Perlukaan dilaporkan dapat menginduksi ekspresi gen *PAL* pada daun tembakau (Fukusawa-Akada *et al.* 1996), pada daun dan akar tanaman peterseli (Lois *et al.* 1989) serta pada daun selada (Saltveit *et al.* 2002; Campos *et al.* 2004). Hasil penelitian Campos *et al.* (2004) menunjukkan peningkatan ekspresi gen *PAL* pada tanaman selada terjadi dalam waktu 6--12 jam setelah adanya perlukaan. Untuk meminimalisir pengaruh perlukaan pada pengamatan ekspresi gen *PAL*, metode yang lebih efektif adalah penggunaan sampel suspensi sel dibandingkan daun. Durner *et al.* (1998) menyatakan bahwa ekspresi gen *PAL* terdeteksi lebih baik pada sampel suspensi sel dari pada daun, karena adanya proses sinkronisasi sel pada kultur dan juga pemberian perlakuan pada suspensi sel tidak melau proses perlukaan untuk memasukkan zat perlakuan ke dalam sel.

Gen *PAL* merupakan ge pertahanan yang dapat diinduksi oleh banyak stimulus, baik abiotik maupun biotik. Ekspresi gen *PAL* pada tanaman peterseli (*Petroselinum crispum*) tidak hanya terinduksi oleh perlukaan tetapi juga oleh sinar UV (Lois *et al.* 1989). Sementara itu, patogen yang dilaporkan dapat menginduksi ekspresi gen *PAL* adalah bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* dan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* pada tanaman *Arabidopsis* (Dong *et al.* 1991) dan oleh Fungi *Phytophthora clandestine* pada tanaman *Trifolium subterraneum* (Ma *et al.* 2010).

## **C.2 Ekspresi gen *HIN 1* (*Harpin-induced*)**

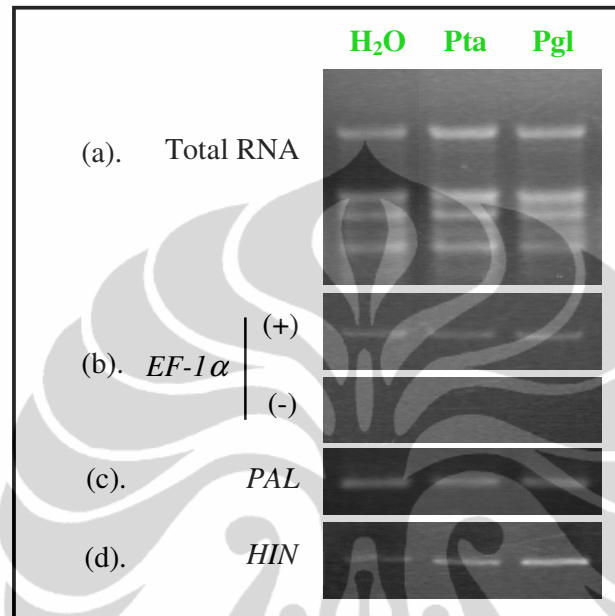
Daun tembakau yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>O, LPS bakteri Pta dan Pgl, serta diinkubasi selama 6 jam, menunjukkan adanya ekspresi gen pertahanan *HIN 1*. Berdasarkan penampakan pita-pita hasil elektroforesis, sampel yang diberi perlakuan LPS bakteri (Pta dan Pgl) menghasilkan pita yang lebih besar dibandingkan sampel yang diberi perlakuan H<sub>2</sub>O (Gambar II.4d). Hasil tersebut

mengindikasikan bahwa LPS bakteri Pta dan Pgl mampu menginduksi respons pertahanan, berupa ekspresi gen *HIN 1*, pada daun tembakau. Gen *HIN 1* merupakan gen pertahanan yang diketahui terinduksi oleh harpin, suatu protein elisitor yang dikeluarkan bakteri (Takahashi *et al.* 2004). Sanabria & Dubery (2006) menyatakan LPS dapat menginduksi regulasi gen yang mengkode protein pengikat harpin (*harpin-binding protein*). Terinduksinya *harpin-binding protein* diduga akan memicu ekspresi gen *HIN 1* pada daun tembakau yang infiltrasi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl. Lebih lanjut, Sanabria & Dubery (2006) menyatakan induksi *harpin-binding protein* dapat berimplikasi peningkatan respons pertahanan sel-sel yang terserang patogen.

Hasil penelitian yang dilakukan juga menunjukkan bahwa sampel daun tembakau yang diberi perlakuan LPS bakteri Pgl memiliki pita yang lebih besar dibandingkan daun yang diberi perlakuan LPS Pta, yang berarti LPS bakteri Pgl menginduksi ekspresi gen *HIN 1* lebih kuat daripada LPS Pta. Hal tersebut mengindikasikan bahwa LPS Pgl mampu menginduksi respons pertahanan yang lebih kuat dibandingkan LPS Pta pada daun tembakau. LPS Pgl mampu menginduksi respons pertahanan tembakau lebih baik dibandingkan LPS Pta kemungkinan karena sel-sel daun tembakau lebih mengenali LPS Pgl sebagai molekul penginduksi respons pertahanan daripada LPS Pta. Zipfel (2009) menyatakan tahap awal penginduksian respons pertahanan tanaman adalah proses pengenalan molekul penginduksi oleh reseptor sel-sel tanaman.

Struktur LPS bakteri Pta dan Pgl yang digunakan saat penelitian telah teridentifikasi dan dinyatakan memiliki perbedaan pada bagian O-antigen. O-antigen LPS Pta mengandung unit L-rhamnosa dan D-rhamnosa, sedangkan O-antigen LPS Pgl hanya tersusun atas unit D-rhamnosa. Berdasarkan Koivistoinen (2008) struktur L-rhamnosa (*L-6-deoxy-mannose*) merupakan gula deoksi yang banyak terdapat pada senyawa penyusun dinding sel tanaman, misalnya pada hemiselulosa dan pektin. Hal tersebut kemungkinan menyebabkan LPS Pta yang memiliki struktur L-rhamnosa pada O-antigennya tidak dikenali sebagai molekul asing, berbeda dengan LPS Pgl yang tidak memiliki struktur L-rhamnosa pada O-antigennya sehingga lebih dikenali sebagai molekul asing oleh sel tembakau.

Pengenalan suatu molekul asing oleh sel tanaman dapat memicu terinduksinya respons pertahanan tanaman. Oleh karena itu, LPS bakteri Pgl mampu menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau lebih kuat dibandingkan LPS Pta.



Gambar II.4 Ekspresi RNA, gen *EF-1α*, *PAL* dan *HIN 1* pada daun tembakau yang diinfiltrasi H<sub>2</sub>O dan LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta diinkubasi selama 6 jam.

### C. 3 Ekspresi gen *HSR 203J* (*Hypersensitive-related*)

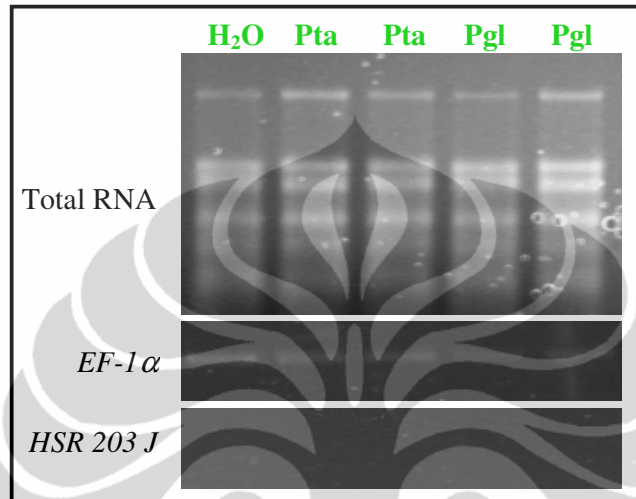
Hasil penelitian menunjukkan ekspresi gen *HSR 203J* tidak terinduksi pada daun tembakau yang diinfiltrasi dengan H<sub>2</sub>O dan LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta diinkubasi selama 6 jam (Gambar II.5). Tidak terekspresinya gen *HSR 203* pada daun yang hanya diberi perlakuan H<sub>2</sub>O maupun LPS bakteri menunjukkan bahwa gen *HSR 203J* tidak diinduksi oleh faktor cekaman, seperti perlukaan maupun LPS bakteri. Hal tersebut sejalan dengan Brederode *et al.* (1991 dalam Pontier *et al.* 1994) yang menyatakan bahwa *HSR 203J* merupakan gen pertahanan yang tidak terinduksi oleh banyak faktor tekanan ataupun faktor induksi umum, seperti pelukaan atau sayatan.

Pontier *et al.* (2004) menduga gen *HSR 203J* berperan kuat dalam terbentuknya HR. Penelitian Pontier *et al.* (2004) menginokulasikan isolat *Pseudomonas solanacearum* pada tembakau. Bakteri tersebut memang diketahui dapat memicu HR pada tembakau. Hasil penelitian Pontier *et al.* tersebut menunjukkan bahwa aktivasi promotor gen *HSR 203J* terlihat sangat kuat pada daun tembakau yang diinokulasi oleh bakteri *Pseudomonas solanacearum*, sedangkan pada daun tembakau yang diinokulasi oleh mutan *P. solanacearum* yang tidak menginduksi HR, tidak ada aktivasi promotor gen *HSR 203J*. Selain mengkonfirmasi spesifitas gen *HSR 203J* yang terkait dengan HR, hasil penelitian Pontier *et al.* juga menunjukkan bahwa induksi gen *HSR 203J* hanya terlokalisasi di tempat inokulasi patogen dan di sel-sel yang mengalami nekrosis. Promotor gen *HSR 203J* terekspresi di bagian daun tempat inokulasi bakteri *P. solanacearum*, sedangkan di tempat yang berjauhan dengan tempat inokulasi tidak ada ekspresi promotor gen *HSR 203J*. Peristiwa nekrosis juga hanya terjadi di sekitar tempat inokulasi bakteri.

Lipopolisakarida (LPS) merupakan molekul MAMP yang dilaporkan tidak menginduksi HR. Penelitian Esposito *et al.* (2008) menunjukkan tanaman tembakau yang diinokulasi oleh bakteri *Ralstonia solanacearum* dapat menginduksi HR, akan tetapi LPS yang diekstraksi dari *Ralstonia solanacearum* tidak menginduksi HR, baik pada tanaman inang (kentang) maupun tanaman noninang (tembakau). Lebih lanjut, Zeidler *et al.* (2004) juga menyatakan LPS juga tidak menginduksi HR pada tanaman *Arabidopsis thaliana*. Hal tersebut sesuai dengan hasil pengamatan visual pada daun tembakau yang diinfiltrasi LPS bakteri Pta dan pgl pada penelitian ini juga tidak menampakkan adanya ciri-ciri HR, seperti nekrosis. Hasil pengamatan tersebut diperkuat dengan tidak terekspresinya gen *HSR 203J* pada daun tembakau.

Untuk mengkonfirmasi tidak adanya reaksi hipersensitif (HR) pada sel-sel penyusun daun tembakau yang diinduksi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl, maka dapat dilakukan penelitian lanjutan untuk mendeteksi HR menggunakan metode pewarnaan tertentu, salah satunya pewarnaan *trypan blue*. Pewarnaan *trypan blue* banyak digunakan untuk mendeteksi sel-sel mati, sebagai indikasi terjadinya HR,

pada tanaman, contohnya pada tanaman *Arabidopsis thaliana* yang diinduksi oleh flagelin (Ichimura *et al.* 2006), tanaman *Arabidopsis thaliana* yang diinduksi bakteri *Erwinia amylovora* (Degrave *et al.* 2008), dan tanaman *Solanum tuberosum* yang diinduksi oleh *Phytophthora infestans* (Vleeshouwers *et al.* 2000).



Gambar II.5 Ekspresi RNA, gen *EF-1α*, dan gen *HSR 203J* pada daun tembakau yang diinfiltrasi H<sub>2</sub>O dan LPS bakteri (Pta dan Pgl) serta diinkubasi selama 6 jam

#### 4. KESIMPULAN

1. Lipopolisakarida (LPS) bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) menginduksi ekspresi gen *HIN 1* pada daun tembakau.
2. LPS bakteri Pgl menginduksi ekspresi gen *HIN 1* lebih kuat daripada LPS Pta.
3. Ekspresi gen *PAL* pada daun tembakau terinduksi oleh sayatan bukan oleh perlakuan LPS bakteri Pta dan Pgl.
4. LPS bakteri Pta dan Pgl tidak menginduksi ekspresi gen *HSR* pada daun tembakau.

## 5. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian menggunakan suspensi sel dalam mengamati ekspresi gen pertahanan *PAL* untuk meminimalisir pengaruh perlakuan terhadap sel yang diberi perlakuan.
2. Perlu dilakukan penelitian pendukung untuk mengkonfirmasi tidak adanya reaksi hipersensitif pada sel-sel penyusun daun tembakau yang diinduksi oleh LPS bakteri Pta dan Pgl, dengan cara deteksi sel-sel yang masih hidup atau mati dengan pewarnaan tertentu (metode *trypan blue staining*).

## 6. DAFTAR ACUAN

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, California: xxv + 922 hlm.
- Bahsan, Y. 1997. Alternative strategies for controlling plant diseases caused by *Pseudomonas syringae*. Dalam: Rudolph, K., T. J. Burr, J. W. Mansfield, D. Stead, A. Vivian & J. von Kietzell (eds.). 1997. *Developments in Plant Pathology Pseudomonas Syringae Pathovars and Related Pathogens*. Kluwer Academic Publishers, (?): 575--583.
- Buonaurio, R. 2008. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. Dalam: Barka, E. A. & C. Clement (eds.). 2008. *Plant-Microbe Interaction*. Research signpost, Kerala: 169--197.
- Campos, R., H. Nonogaki, T. Suslow & M.E. Saltveit. 2004. Isolation and characterization of a wound inducible phenylalanine ammonia-lyase gene (LsPAL1) from Romaine lettuce leaves. *Physiologia Plantarum* **121**: 429--438.
- Chakravarthy, S., A. C. Velásquez, S. K. Ekengren, A. Collmer & G. B. Martin. 2010. Identification of *Nicotiana benthamiana* genes involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interaction (MPMI)* **23**(6): 715--726.

- Degrave, A., M. Fagard, C. Perino, M. N. Brisset, S. Gaubert, S. Laroche, O. Patrit & M. A. Barny. 2008. *Erwinia amylovora* Type Three–Secreted Proteins Trigger Cell Death and Defense Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interaction (MPMI)* **21**(8): 1076--1086.
- Dickinson, M. 2003. *Molecular plant pathology*. BIOS Scientific Publishers, London: xvii + 273 hlm.
- Dong, X., M. Mindrinos, K. R. Daviq & F. M. Ausubel. 1991. Induction of *Arabidopsis* Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene. *The Plant Cell* **3**: 61--72.
- Dow, M., M. A. Newman & E. V. Roepenack. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review Phytopathology* **38**: 241--261.
- Durner, J., D. Wendehenne & D. F. Klessig. 1998. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 10328--10333.
- Erbs, G. & M.A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* **4**(5): 421--425.
- Esposito, N., O. G. Ovchinnikova, A. Barone, A. Zoina, O. Holst & A. Evidente. 2008. Host and non-host plant response to bacterial wilt in potato: role of the lipopolysaccharide isolated from *Ralstonia solanacearum* and molecular analysis of plant-pathogen interaction. *Chemistry & Biodiversity* **5**: 2662--2675.
- Flors, V., J. Ton, G. Jakab & B. Mauch-Mani. 2005. Absicic acid and callose: team players in defence against pathogens. *Journal of Phytopathology* **153**: 377--383.
- Fukusawa-Akada, T. S.D. Kung & J.C. Watson. 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* **30**(4): 711--722.

- Gimenez-Ibanez, S. & J. P. Rathjen. 2010. The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection* **12**: 428--437.
- Higashi, K. Y. Ishiga, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, Y. Ichinose. 2008. Modulation of defense signal transduction by flagellin-induced WRKY41 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* **279**: 303--312.
- Ichimura, K., C. Casais, S. C. Peck, K. Shinozaki & K. Shirasu. 2006. MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry* **281**(48): 36969--36976.
- Koivistoinen, O. 2008. L-rhamnose-1-dehydrogenase gene and L-rhamnose catabolism in the yeast *Pichia stipitis*. Master's Thesis. Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Helsinki: 62 hlm.
- Lancioni, P. 2008. *Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato*. Dottorato di Ricerca, Bologna: 125 hlm.
- Lois, R., A. Dietrich, K. Hahlbrock & W. Schulz. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 8(6): 1641--1648.
- Ma, X., H. Li, K. Sivasithamparam & M. J. Barbetti. 2010. Infection processes and involvement of defense-related genes in the expression of resistance in cultivars of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*) to *Phytophthora clandestine*. *The American Phytopathological Society* **100**(6): 551--559.
- Newman, M., E. von Roepenack, M. Daniels & M. Dow. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* **1**(1): 25--31.
- Newman, M. A., J. M. Dow & M. J. Daniels. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 95--102.



- Nomura, K., M. Melotto & S. He. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interaction. *Current opinion in Plant Biology* **8**: 361--368.
- Pontier, D., L. Godiard, Y. Marco & D. Roby. 1994. *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *The Plant Journal* **5**(4): 507--521.
- Saltveit, M.E., R. Campos, H. Nonogaki & T. Suslow. 2002. Characterization of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) gene in wounded lettuce tissue. *Patent Publication*: 1--12.
- Sanabria, N. M. & I. A. Dubery. 2006. Differential display profiling of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **344**:1001--1007.
- Sigee, D. C. 1993. *Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects*. Cambridge University Press, Cambridge: xi + 325 hlm.
- Strange, R. N. 2003. *Introduction to Plant Pathology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xvi + 479 hlm.
- Takahashi, Y., T. Berberich, K. Yamashita, Y. Uehara, A. Miyazaki & T. Kusano. 2004. Identification of tobacco HIN1 and two closely related genes as spermine-responsive genes and their differential expression during the Tobacco mosaic virus-induced hypersensitive response and during leaf- and flower-senescence. *Plant Molecular Biology* **54**: 613--622.
- Vleeshouwers, V. G. A. A., W. van Dooijeweert, F. Govers, S. Kamoun, & L. T. Colon. 2000. The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**: 853--864.
- Zeidler, D., U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler & J. Durner. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **101**(44): 15811--15816.

- Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology* **20**: 10--16.
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in Plant Biology* **12**: 414--420.

## DISKUSI PARIPURNA

Selama hidupnya tanaman banyak terpapar oleh patogen. Meskipun demikian, tidak semua tanaman menunjukkan kondisi sakit walaupun berinteraksi dengan patogen karena tanaman memiliki sistem pertahanan yang dapat mencegah infeksi patogen (Kunze 2005; Griebel 2010: 5). Secara umum, sistem pertahanan tanaman dapat dibagi menjadi dua, yaitu pertahanan pasif dan pertahanan aktif. Pertahanan pasif (*preformed/constitutive defense*) adalah pertahanan yang sudah ada pada tanaman, sedangkan pertahanan aktif (*inducible defense*) adalah pertahanan yang akan terinduksi jika tanaman mengenali patogen (Gwinn *et al.* 2006; Buonauro 2008). Penginduksian respons pertahanan tanaman dapat menjadi upaya pengendalian patogen penyebab penyakit. Induksi respons pertahanan tanaman diawali dengan tahap pengenalan patogen atau molekul patogen yang dikenal dengan istilah *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs/MAMPs) oleh *Pattern-Recognition Receptors* (PRRs), suatu reseptor pengenalan pada sel tanaman (Zipfel 2008; Gimenez-Ibanez & Rathjen 2010). Salah satu fokus penelitian dibidang penyakit tanaman adalah untuk mengetahui mekanisme pengenalan molekul PAMP/MAMP dalam penginduksian respons pertahanan tanaman. Molekul PAMP/MAMP yang cukup penting sebagai target pengenalan patogen oleh tanaman adalah lipopolisakarida (LPS) (Zeidler *et al.* 2004). LPS merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif (Erbs & Newman 2003). Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang sebagian besar bersifat sebagai fitopatogen (Sigeo 1993). Oleh karena itu, kajian mengenai molekul bakteri Gram negatif yang terlibat dalam patogenisitas perlu untuk dipelajari.

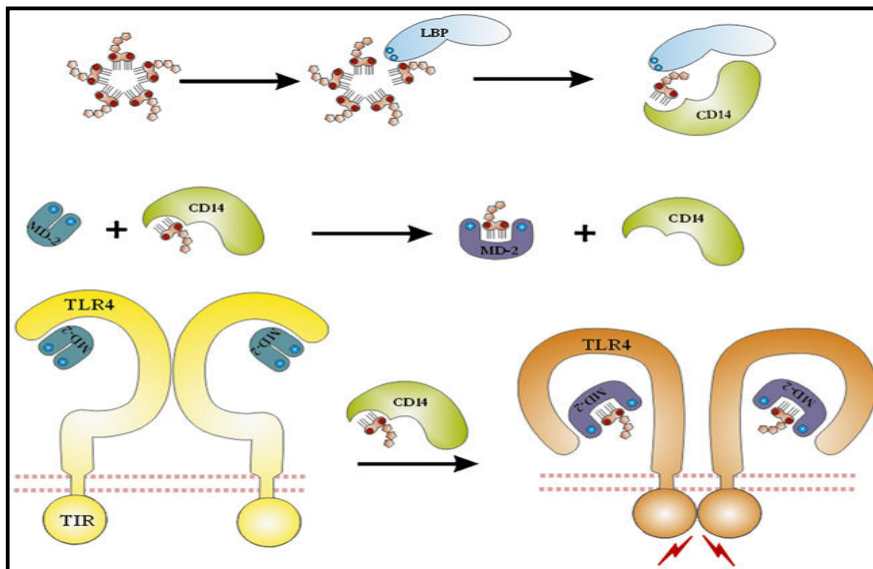
Lipopolisakarida (LPS) bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycineai* (Pgl) yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan bahwa kedua LPS bakteri mampu menginduksi respons pertahanan tembakau berupa deposisi *callose* dan ekspresi gen pertahanan *HIN 1*. Hasil tersebut menambah informasi hasil-hasil penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa LPS mampu menginduksi respons pertahanan tanaman seperti *oxidative burst* (peningkatan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pada tanaman tembakau (Meyer *et al.*

2001; Gerber *et al.* 2004) dan *Arabidopsis thaliana* (Zeidler *et al.* 2004), influx ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang cepat (Gerber *et al.* 2004), aktivasi protein kinase (*Mitogen activated protein kinase* - MAPK) (Piater *et al.* 2004) pada tembakau, dan *nitric oxide burst* pada *Arabidopsis thaliana* (Zeidler *et al.* 2004). LPS juga dilaporkan menginduksi ekspresi gen-gen terkait pertahanan, seperti gen pengkode protein PR (*pathogenesis-relate*) pada tanaman tembakau (Coventry & Dubery 2001); *Arabidopsis* (Zeidler *et al.* 2004), dan cabai (Newman *et al.* 2000). Zeidler *et al.* (2004) juga menyatakan bahwa LPS dapat menginduksi sejumlah gen terkait stress atau gen pertahanan, seperti gen-gen pengkode kelompok protein glutation S-transferase, kelompok protein sitokrom P450, peroksidase, dan RuBisCO activase.

Variasi bentuk respons pertahanan tanaman yang terinduksi oleh LPS mengindikasikan adanya perbedaan persepsi sel-sel tanaman terhadap LPS. Hal tersebut menunjukkan peran penting reseptor tanaman (PRRs) dalam mengenali LPS. Jenis PRRs yang bertanggung jawab dalam pengenalan LPS pada sel-sel tanaman belum teridentifikasi. Saat ini, PRRs yang sudah diketahui pada *Arabidopsis thaliana* diantaranya adalah *leucine-rich repeat receptor kinase flagellin sensing 2* (LRR-RK FLS 2) yang dapat mengenali flagelin bakteri dan LRR-RK *elongation factor* (LRR-RK EFR) yang dapat mengenali faktor elongasi Tu (Ef-Tu) bakteri (Zipfel 2008; Zipfel 2009).

Mekanisme pengenalan LPS oleh sel-sel tanaman belum teridentifikasi, namun mekanisme pengenalan LPS oleh sel-sel hewan telah diketahui (Gerber *et al.* 2004; Erbs *et al.* 2010). Data-data pengenalan LPS oleh sel-sel hewan mengindikasikan LPS akan berinteraksi dengan reseptor transmembran, *Toll-like receptors* (TLR). Reseptor tersebut diketahui bertanggung jawab atas pengenalan LPS oleh sel dan selanjutnya mengaktivasi transduksi sinyal LPS untuk menginduksi respons pertahanan (Triantafilou & Triantafilou 2002). Pada Mammalia, mekanisme pengenalan dan sinyaling yang terlibat dalam penginduksian respons pertahanan oleh LPS telah diketahui. Jerala (2007) memaparkan bahwa pada tahap awal LPS akan dikenali oleh reseptor ekstraselular berupa glikoprotein yang dikenal dengan istilah LBP (*Lipopolysaccharide-*

*Binding Protein*). LPS yang terikat pada LBP akan mengalami penurunan energi ikatan dan pecah menjadi monomer-monomer LPS. Monomer LPS kemudian akan ditransfer pada *co-reseptor* glikoprotein CD14 (*Cluster of Differentiation*). CD14 tersebut diperlukan untuk efisiensi transfer monomer LPS ke akseptor LPS, yaitu MD-2 (*Myeloid Differentiation Protein-2*). MD-2 merupakan molekul yang akan memfasilitasi pengikatan LPS pada reseptor transmembran TLR4. Formasi trimerik LPS:MD-2:TLR4 merupakan kompleks terakhir pengenalan LPS ekstraselular. Asosiasi kompleks MD-2:LPS akan mengubah susunan TLR 4 yang menyebabkan terbentuknya asosiasi dengan TIR (*Toll Interleukin Receptors*) suatu domain sinyaling intraselular yang ditemukan pada TLR4 (Gambar 5). Kompleks tersebut memediasi interaksi protein-protein adaptor, seperti TLR dengan protein komponen sinyal transduksi. Mekanisme sinyal transduksi tersebut akhirnya akhirnya mengaktifasi berbagai gen.



Gambar 5. Skema tahapan pengenalan LPS pada Vertebrata oleh kompleks “*pattern recognition receptors*” ekstraselular dan mekanisme sinyaling yang terlibat didalamnya [Sumber: Jerala 2007].

Aktivasi sel yang terinduksi LPS melalui TLR4 merupakan mekanisme yang khas dan berbeda dibandingkan dengan jenis TLR lainnya. Hal tersebut

dikarenakan pengikatan LPS pada TLR4 tidak terjadi secara langsung, namun memerlukan keberadaan suatu *sensing-protein* yaitu MD-2.

Kompleks reseptor yang homolog dengan reseptor pengenal LPS pada sel hewan, kemungkinan juga bertanggung jawab terhadap pengenalan LPS di tanaman. Asumsi tersebut didasarkan pada laporan yang menyatakan bahwa *Receptor-like kinase* FLS2 yang berperan dalam pengenalan dan pengikatan flagellin pada sel tanaman memiliki struktur yang homolog dengan kelompok TLR, dan TLR5 adalah reseptor yang bertanggung jawab terhadap pengenalan flagelin pada Mammalia (Gomez-Gomez & Boller 2002).

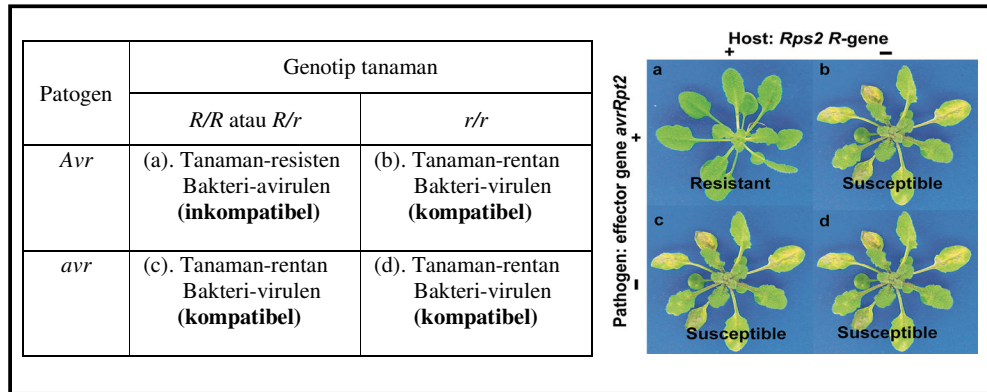
Pengidentifikasian kompleks reseptor (PRRs) yang bertanggung jawab terhadap pengenalan LPS oleh sel tanaman perlu dilakukan untuk mengetahui mekanisme sinyal transduksi yang terlibat dalam induksi respons pertahanan oleh LPS. Gerber *et al.* (2004) menyatakan pendekatan yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi PRRs LPS adalah dengan melakukan penelitian respons-respons pertahanan yang diinduksi oleh LPS, khususnya ekspresi gen pertahanan. Newman *et al.* (2001) berpendapat identifikasi reseptor pada tanaman menggunakan pendekatan genetik akan lebih mudah dibandingkan pendekatan biokimia. Pengenalan LPS oleh suatu reseptor akan memicu sinyal-sinyal transduksi dengan melibatkan protein-protein tertentu, yang dikode oleh gen-gen pertahanan, dan akan memengaruhi respons biokimia yang terkait dengan respons pertahanan tanaman.

Aplikasi penginfiltrasian LPS bakteri Pta dan Pgl pada daun tembakau menunjukkan bahwa LPS bakteri Pgl lebih kuat menginduksi respons pertahanan tembakau berupa deposisi *callose* dan ekspresi gen *HIN 1*. Hal tersebut mengindikasikan bahwa respons pertahanan tembakau sebagai tanaman noninang (diinduksi oleh LPS Pgl) lebih kuat dibandingkan respons pertahanan pada tanaman tembakau sebagai tanaman inang (diinduksi oleh LPS Pta).

Respons pertahanan yang dihasilkan tanaman terkait dengan interaksi kompatibilitas antara bakteri dengan tanaman dan akan memengaruhi keberhasilan atau kegagalan bakteri patogen dalam menginfeksi tanaman. Interaksi kompatibel adalah interaksi yang terjadi ketika bakteri patogen

menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada tanaman inang. Sementara itu, interaksi inkompatibel terjadi ketika bakteri menyerang tanaman noninang (resistensi noninang) ataupun tanaman inang resisten (resistensi inang tingkat kultivar) (Bounario 2008). Hasil penelitian yang menunjukkan bahwa respons pertahanan pada tembakau sebagai tanaman noninang lebih kuat dibandingkan pada tembakau sebagai tanaman inang mengindikasikan bahwa pada interaksi inkompatibel akan menghasilkan respons pertahanan yang lebih kuat dibandingkan pada interaksi kompatibel. Oleh karena itu, pada interaksi inkompatibel, bakteri yang menyerang gagal menyebabkan penyakit karena dapat teratasi oleh respons pertahanan yang ada pada tanaman.

Interaksi kompatibel dan inkompatibel antara tanaman dengan patogen sangat dipengaruhi oleh hubungan genetik diantara keduanya. Hubungan tersebut dapat dijelaskan dengan model atau hipotesis “*gene-for gene*”, yang melibatkan gen avirulensi (*Avr*) pada patogen dan gen resisten (*R*) pada tanaman. Dalam patologi tanaman istilah avirulensi diartikan sebagai ketidakmampuan patogen untuk menginfeksi tanaman, karena tanaman mampu mendeteksi molekul yang ada pada patogen (misalnya protein efektor), sedangkan virulensi diartikan sebagai kemampuan patogen untuk menginfeksi tanaman. Berdasarkan hipotesis “*gene-for gene*”, interaksi tanaman yang memiliki gen dominan *R* dengan patogen yang memiliki gen *Avr* maka akan terjadi interaksi inkompatibel (tanaman resisten) (Gambar 6a). Sementara itu, interaksi kompatibel terjadi apabila tanaman tidak memiliki gen dominan *R* berinteraksi dengan patogen yang memiliki gen dominan *Avr* (Gambar 6b) maupun tidak memiliki gen *Avr* (Gambar 6d) serta tanaman yang memiliki gen *R* tetapi berinteraksi dengan patogen yang tidak memiliki gen *Avr* (Gambar 6c) (Nobuta & Meyers 2005; Kim *et al.* 2008).



Gambar 6. Interaksi tanaman-patogen berdasarkan hipotesis “*gene-for-gene*” [Sumber: Nobuta & Meyers 2005; Kim *et al.* 2008].

Resistensi pada tanaman noninang terdiri dari dua tipe. Resistensi noninang tipe I adalah resistensi pada tanaman yang dicirikan dengan tidak terinduksinya respons hipersensitif (HR), dan sangat bergantung pada resistensi basal. Adapun resistensi noninang tipe II, dan juga resistensi spesifik kultivar, dicirikan dengan terjadinya HR yang ditandai adanya kematian yang cepat pada sel-sel yang terinfeksi. HR tersebut penting untuk menghambat pertumbuhan dan penyebaran bakteri penginfeksi (Mysore & Ryu 2004). Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa resistensi pada tanaman noninang tembakau yang diinduksi LPS bakteri Pgl adalah resistensi tipe I karena LPS bakteri Pgl tidak menginduksi HR, dan hal tersebut dibuktikan dengan tidak terekspresinya gen pertahanan terkait HR, yaitu gen *HSR 203J* pada daun tembakau. Tidak terinduksinya HR berimplikasi pada terbentuknya respons pertahanan basal berupa deposisi *callose* dengan cukup kuat pada daun tembakau yang induksi LPS Pgl sebagai strategi untuk menghambat penetrasi dan pertumbuhan patogen.

Hasil penelitian mengenai penginduksian respons pertahanan tanaman tembakau oleh LPS bakteri Pta dan Pgl diharapkan dapat mengungkap peran dan mekanisme yang terlibat dalam penginduksian respons pertahanan tanaman oleh LPS bakteri. Selain itu juga menambah informasi mengenai mekanisme interaksi antara tanaman dan patogen sehingga dapat menjadi acuan dalam pengendalian patogen penyebab penyakit serta usaha penguatan respons pertahanan yang dimiliki tanaman.



## RANGKUMAN KESIMPULAN DAN SARAN

### A. KESIMPULAN

1. Lipopolisakarida (LPS) bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (Pta) dan *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Pgl) menginduksi deposisi *callose* dan ekspresi gen pertahanan *HIN 1* pada daun tembakau.
2. LPS bakteri Pgl menginduksi respons pertahanan tanaman tembakau lebih kuat dibandingkan LPS Pta.
3. LPS bakteri Pgl menginduksi deposisi *callose* lebih kuat dibandingkan LPS Pta.
4. LPS bakteri Pgl menginduksi ekspresi gen *HIN 1* lebih kuat dibandingkan LPS Pta.
5. LPS bakteri Pta dan Pgl tidak menginduksi ekspresi gen *PAL* dan *HSR 203J* pada daun tembakau.

### B. SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai respons-respons pertahanan lain yang diinduksi oleh LPS untuk memahami mekanisme sinyaling yang terkait dengan peran LPS dalam induksi respons pertahanan tanaman.
2. Perlu dilakukan penelitian mengenai jenis reseptor (PRRs - *Pattern-Recognition Receptors*) yang bertanggung jawab terhadap proses pengenalan lipopolisakarida (LPS) pada tanaman.

## DAFTAR ACUAN

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 5th ed. Elsevier Academic Press, California: xxv + 922 hlm.
- Atkinson, M. E., J. S. Huang & J. A. Knopp. 1985. The hypersensitive reaction of tobacco to *Pseudomonas syringae* pv. *pisii*: Activation of a plasmalemma  $K^+/H^+$  exchange mechanism. *Plant physiology* **79**: 843--847.
- Batchvarova, R., V. Nikolaeva, S. Slavov, S. Bossolova, V. Valkov, S. Atanassova, S. Guelemerov, A. Atanassov & H. Anzai. 1998. Transgenic tobacco cultivars resistant to *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Theoretical and Applied Genetics* **97**: 986--989.
- Buonaurio, R. 2008. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. *Dalam*: Barka, E. A. & C. Clement (eds.). 2008. *Plant-Microbe Interaction*. Research signpost, Kerala: 169--197.
- Chakravarthy, S., A. C. Velásquez, S. K. Ekenegren, A. Collmer & G. B. Martin. 2010. Identification of *Nicotiana benthamiana* genes involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity. *Molecular Plant-Microbe Interaction (MPMI)* **23**(6): 715--726.
- Chase, M. W., S. Knapp, A. V. Cox, J. J. Clarkson, Y. Butsko, J. Joseph, V. Savolainen & A. S. Parokonny. 2003. Molecular systematic, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Annals of Botany* **92**: 107-127.
- Coventry, H. S. & I. A. Dubery. 2001. Lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia* contribute to an enhanced defensive capacity and the induction of pathogenesis-related proteins in *Nicotiana tabacum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**: 149--158.
- Dickinson, M. 2003. *Molecular plant pathology*. BIOS Scientific Publishers, London: xvii + 273 hlm.
- Dow, M., M. A. Newman & E. V. Roepenack. 2000. The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual Review Phytopathology* **38**: 241--261.

- Erbs, G. & M.A. Newman. 2003. The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Molecular Plant Pathology* **4**(5): 421--425.
- Erbs, G., A. Molinaro, J. M. Dow & M. A. Newman. 2010. Lipopolysaccharide and Plant Innate Immunity. *Dalam: Wang, X. & P. J. Quinn. (eds.). 2010. Endotoxins: Structure, Function, and Recognition. Springer Science+Business Media B.V., (?): 387--403 hlm.*
- Ganapathi, T. R., P. Suprasanna, P. S. Rao, & V. A. Bapat. 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian Journal of Biotechnology* (3): 171--184.
- Gerber, I. B., D. Zeidler, J. Durner & I. A. Dubery. 2004. Early perception responses of *Nicotiana tabacum* cells in response to lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Planta* **218**: 647--657.
- Gimenez-Ibanez, S. & J. P. Rathjen. 2010. The case for the defense: plants versus *Pseudomonas syringae*. *Microbes and Infection* **12**: 428--437.
- Gomez-Gomez, L. & T. Boller. 2000. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular* **5**:1003-1012.
- Goodman, R. N. & S. B. Plurad. 1971. Ultrastructural changes in tobacco undergoing the hypersensitive reaction caused by plant pathogenic bacteria. *Physiology Plant Pathology* **1**:11--15.
- Griebel, T. 2010. *Local and systemic resistance in Arabidopsis thaliana in response to Pseudomonas syringae: impact of light and phytosterols*. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg: iv + 127 hlm.
- Gwinn, K. D., S. E. Greene, J. F. Green & D. J. Treendy. 2006. Host defense. *Dalam: Trigiano, R. N., M. T. Windham, A. S. Windham (eds.). 2006. Plant pathology: concepts and laboratory exercises. CRS Press LLC, Florida: 443--455.*
- Jerala, R. Structural biology of the LPS recognition. *International Journal of Medical Microbiology* **297**: 353--363.

- Kim, M. G., S. Y. Kim, W. Y. Kim, D. Mackey & S. Y. Lee. 2008. Minireview: Responses of *Arabidopsis thaliana* to Challenge by *Pseudomonas syringae*. *Molecular Cells* **25**(3): 323--331.
- Klement, Z., Z. Bozso, P.G. Ott, M. L. Kecskes & K. Rudolph. 1999. Symptomless resistant response instead of the hypersensitive reaction in tobacco leaves after infiltration of heterologous pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Journals Phytopathology* **147**: 467--475.
- Kombrink, e. & I. E. Somssich. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* **21**: 1--33.
- Kunze, G. U. 2005. *Characterization of a novel bacterial PAMP – Elongation Factor Tu – and its role in Arabidopsis thaliana defense and immunity*. Inauguraldissertation zur Erlangung der Würde eines Doktors der Philosophie vorgelegt der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, Basel: 169 hlm.
- Lancioni, P. 2008. *Studies on biotic and abiotic elicitors inducing defense responses in tomato*. Dottorato di Ricerca, Bologna: 125 hlm.
- Livaja, M., D. Zeidler, U. von Rad & J. Durner. 2008. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**: 161--171.
- Meyer, A., A. Puhler & K. Niehaus. 2001. The lipopolysaccharide of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**: 214--222.
- Mysore, K. S., & C. M. Ryu. 2004. Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Science* **9**: 97--104.
- Newman, M., E. von Roepenack, M. Daniels & M. Dow. 2000. Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology* **1**(1): 25--31.
- Newman, M. A., J. M. Dow & M. J. Daniels. 2001. Bacterial lipopolysaccharides and plant-patogen interactions. *European Journal of Plant Pathology* **107**: 95--102.

- Nobuta, K. & B. C. Meyers. 2005. *Pseudomonas* versus *Arabidopsis*: Models for genomics research into plant disease resistance. *Bioscience* **55**(8): 679--686.
- Nomura, K., M. Melotto & S. He. 2005. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interaction. *Current opinion in Plant Biology* **8**: 361--368.
- Piater, L. A., T. Nurnberger & I. A. Dubery. 2004. Identification of a lipopolysaccharide responsive erk-like MAP kinase in tobacco leaf tissue. *Molecular Plant Pathology* **5**: 331--341.
- Segonzac, C. & C. Zipfel. 2011. Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, **14**: 54--61.
- Sigeo, D. C. 1993. *Bacterial plant pathology: Cell and molecular aspects*. Cambridge University Press, Cambridge: xi + 325 hlm.
- Spencera, M., C. M. Ryub, K. Y. Yanga, Y. C. Kimc, J. W. Kloepperb & A. J. Anderson. 2003. Induced defence in tobacco by *Pseudomonas chlororaphis* strain O6 involves at least the ethylene pathway. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **63**: 27--34.
- Strange, R. N. 2003. *Introduction to Plant Pathology*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex: xvi + 479 hlm.
- Triantafilou, M. & K. Triantafilou. 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol* **23**: 301--304
- Venkatesh, B. 2002. *Characterization of bacterial lipopolysaccharides (Pseudomonas syringae pv. tomato and Pseudomonas syringae pv. apii) and pectins of tomato and celery plants (Lycopersicon esculentum and Apium graveolens) regarding their possible role in host/pathogen-interaction*. Dissertation Zur Erlangung des Doktorgrades Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten Der Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen: x + 136 hlm.
- Young, J. M. 2010. Minireview: Taxonomy of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Plant Pathology* **92**: S1.5-S1.14.
- Zeidler, D., U. Zahringer, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler & J. Durner. 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*:

Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **101**(44): 15811--15816.

Zipfel, C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Current opinion in immunology*. **20**: 10--16.

Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current opinion in Plant Biology* **12**: 414--420.