

**ANALISIS PROFIL PROTEIN DAN KARAKTER SPESIFIK ANGGREK
Cattleya sp. SETELAH PEMBERIAN ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO***

Tesis

Oleh

Yuliana Permata Sari



**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUANALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

ANALISIS PROFIL PROTEIN DAN KARAKTER SPESIFIK ANGGREK *Cattleya* sp. SETELAH PEMBERIAN ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO*

Oleh

YULIANA PERMATA SARI

Salah satu jenis tanaman anggrek yang banyak diminati adalah anggrek *Cattleya* sp. Sayangnya tanaman anggrek sering mendapatkan serangan penyakit busuk lunak yang disebabkan oleh patogen berupa jamur *Fusarium oxysporum*. Pengendalian penyakit layu *Fusarium* biasanya dilakukan hanya dengan menggunakan fungisida kimia, namun penggunaan fungisida ini masih belum efektif dalam mengendalikan penyakit tersebut dan dapat berdampak buruk bagi lingkungan. Metode seleksi *in vitro* dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman dengan sifat yang diinginkan yaitu dengan menggunakan komponen penyeleksi berupa toksin murni seperti asam fusarat. Asam fusarat, merupakan racun murni dari *Fusarium oxysporum*. Penelitian ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian Asam Fusarat terhadap profil protein dan karakteristik Anggrek *Cattleya* sp berupa kandungan gula reduksi dan fenol total. Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL), dengan lima taraf perlakuan dan setiap taraf dilakukan lima ulangan. Perlakuan terdiri atas penambahan Asam Fusarat dengan konsentrasi asam fusarat dalam medium: 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm dan 40 ppm. Data yang diperoleh dianalisis ragam ANOVA. Analisis ragam dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji Tukey pada taraf nyata 5%. Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan terdapat peningkatan kadar gula reduksi dari 119,882% pada kontrol sampai 150,709% pada konsentrasi 40 ppm. Sedangkan fenol total meningkat dari 36,534 mgGAE/g pada kontrol sampai 45,468 mgGAE/g pada konsentrasi 40 ppm. Pada pita protein belum menunjukkan adanya penambahan atau pengurangan pita protein setelah dianalisis dengan metode SDS – PAGE.

Kata kunci: Asam Fusarat, *Cattleya* sp, Fenol, Gula Reduksi, Profil Protein

ABSTRACT

ANALYSIS OF PROTEIN PROFILE AND SPECIFIC CHARACTER OF THE ORCHID OF *Cattleya* sp. AFTER IN VITRO ADMINISTRATION OF FUSARIC ACID

By

YULIANA PERMATA SARI

One type of orchid that is in great demand is the *Cattleya* sp. Unfortunately, orchids often suffer from soft rot disease caused by a pathogen in the form of the fungus *Fusarium oxysporum*. *Fusarium* wilt disease control is usually carried out only by using chemical fungicides, but the use of these fungicides is still not effective in controlling the disease and can have a negative impact on the environment. In vitro selection method can be used to obtain plants with the desired properties by using a selector component in the form of pure toxins such as fusaric acid. Fusaric acid, is a pure poison from *Fusarium oxysporum*. This research was conducted to determine the effect of Fusaric Acid on the protein profile and characteristics of the *Cattleya* sp Orchid in the form of reducing sugar content and total phenol. The study was conducted using a Completely Randomized Design (CRD) method, with five levels of treatment and five replications for each level. The treatment consisted of the addition of Fusaric Acid with the final concentration of fusaric acid in the medium: 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm and 40 ppm. The data obtained were analyzed by ANOVA variance. Analysis of variance was carried out at the 5% significance level and further test with the Tukey test at 5% significance level. Based on the results of the analysis carried out there was an increase in reducing sugar levels of 119.882% in the control to 150.709% at a concentration of 40 ppm. Meanwhile, total phenol increased from 36.534 mgGAE/g in the control to 45.468 mgGAE/g at a concentration of 40 ppm. The protein bands have not shown any addition or reduction of protein bands after being analyzed by the SDS – PAGE method.

Keywords: *Cattleya* sp, Fusaric Acid, Phenol, Protein Profile, Reducing Sugar

**ANALISIS PROFIL PROTEIN DAN KARAKTER SPESIFIK ANGGREK
Cattleya sp. SETELAH PEMBERIAN ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO***

Oleh

Yuliana Permata Sari

Tesis

**Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
MAGISTER SAINS**

pada

**Program Studi Magister Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Tesis : **ANALISIS PROFIL PROTEIN DAN KARAKTER SPESIFIK ANGGREK *Cattleya* sp. SETELAH PEMBERIAN ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO***

Nama Mahasiswa : **YULIANA PERMATA SARI**

NPM : 2027021004

Program Studi : Magister Biologi

Fakultas : Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si
NIP. 196510311992032003

Dr. Sumardi, M.S.
NIP. 196503251991031003

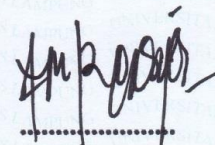
2. Ketua Program Studi Magister Biologi

Dr. Nuning Nurcahyani, M.Sc.
NIP. 196603051991032001

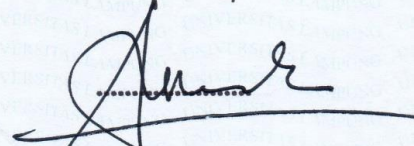
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

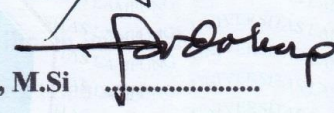
Ketua : **Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.**



Sekretaris : **Dr. Sumardi, M.S.**



Penguji
Bukan Pembimbing 1 : **Dr. Hardoko Insan Qudus, M.Si**



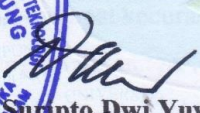
Bukan Pembimbing 2 : **Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si.**



Jekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



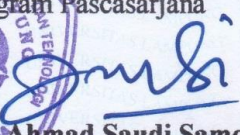
Dr. Eng. Sumpo Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001



3. Direktur Program Pascasarjana



Prof. Dr. Ir. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T.
NIP. 197104151998031005



Tanggal Lulus Ujian : 1 Agustus 2022

PERNYATAAN KEASLIAN HASIL KARYA

Nama yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Yuliana Permata Sari

NPM : 2027021004

Dengan ini menyatakan bahwa apa yang tertulis dalam karya ilmiah ini adalah hasil karya sendiri berdasarkan pengetahuan dan informasi yang telah saya dapatkan. Karya ilmiah ini tidak berisi material yang telah dipublikasikan sebelumnya atau dengan kata lain hasil plagiat karya orang lain.

Demikian pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terdapat kecurangan dalam karya ilmiah ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 01 Agustus 2022
Pembuat Pernyataan



Yuliana Permata Sari
NPM. 2027021004

RIWAYAT HIDUP



Penulis Yuliana Permata Sari, dilahirkan di Bandar Lampung pada tanggal 07 Juli 1990 sebagai anak ketiga dari empat bersaudara dari Ayahanda Chaidir dan Ibunda Alm. Yulia. Penulis mengawali pendidikan Taman Kanak – Kanak di TK Yaharki Bandar Lampung pada tahun 1996 dilanjutkan Sekolah Dasar (SD) di SD Negeri 2 Talang pada tahun 1996, kemudian Sekolah Menengah Pertama (SMP) di SMP Negeri 3 Bandar Lampung pada tahun 2003 dan Sekolah Menengah Atas (SMA) di SMA Negeri 4 Bandar Lampung pada tahun 2006. Penulis terdaftar sebagai mahasiswi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro pada tahun 2009 melalui jalur Penerimaan Seleksi Siswa Berpotensi (PSSB) Universitas Diponegoro. Selama menjadi mahasiswa di Jurusan Biologi FSM UNDIP, penulis pernah menjadi asisten praktikum matakuliah Biologi Umum dan Struktur, Fungsi Perkembangan Hewan. Pada tahun 2020, penulis melanjutkan pendidikan S2 dan tercatat sebagai mahasiswi Magister Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirobbil alamin, segala puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala kemudahan, limpahan rahmat dan karunia yang telah diberikan selama ini sehingga karya ini dapat terselesaikan, maka dengan rasa bahagia dan syukur, kupersembahkan karya ini untuk :

- *Kepada diriku sendiri yang telah berjuang menyelesaikan Tesis ini dengan penuh semangat*
- *Orangtuaku tersayang, Ibu Alm. Yulia dan Ayah Chaidir atas kasih sayang yang telah diberikan, doa yang terus dipanjatkan, serta motivasi dan dukungan yang telah diberikan agar tetap tabah dan tawakal dalam menuntut ilmu.*
- *Kepada dosen-dosenku yang telah membimbingku hingga saat ini, serta segala limpahan ilmu yang sangat bermanfaat.*
- *Almamater tercinta yang menjadi kebanggaanku, Universitas Lampung.*

MOTTO

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari suatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap

(Q.S. Al-Insyirah: 6-8)

“..dan berbuat baiklah (kepada orang lain) sebagaimana Allah telah berbuat baik kepadamu..”

(Q.S. Al-Qasas : 77)

Bila akar dan batang sudah cukup kuat dan dewasa, dia akan dikuatkan oleh taufan dan badai.

(Pramoedya Ananta Toer, Tetralogi Pulau Buru)

SANWACANA

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Alhamdulillah Puji Syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat – Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Shalawat serta salam kepada junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah menjelaskan tentang isi kandungan Al- Qur'an sebagai petunjuk jalan menuju kebahagiaan hidup di dunia dan di akhirat kelak.

Tesis yang berjudul “**ANALISIS PROFIL PROTEIN DAN KARAKTER SPESIFIK ANGGREK *Cattleya* sp. SETELAH PEMBERIAN ASAM FUSARAT SECARA *IN VITRO***”

Dengan terselesaikannya tesis ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Karomani, M.Si. selaku Rektor Universitas Lampung.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T. selaku Direktur Program Pascasarjana Universitas Lampung.
3. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
4. Orangtuaku tersayang, Ibu Alm. Yulia dan Ayah Chaidir atas kasih sayang yang telah diberikan, doa yang terus dipanjatkan, serta motivasi dan nasihat yang telah diberikan agar tetap tabah dan tawakal dalam menuntut ilmu.

5. Ibu Dr. Endang Nurcahyani, M.Si., selaku pembimbing I yang telah memberikan ilmu, sabar dalam membimbing, menasehati, memberikan pengarahannya, saran, dan kritik serta motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan tesis.
6. Bapak Dr. Sumardi, M.S., selaku pembimbing II yang telah membimbing, memberikan ilmu, memberikan saran dan kritik kepada penulis dalam menyelesaikan tesis.
7. Bapak Dr. Hardoko Insan Qudus, M.Si., selaku Dosen Pembahas I yang telah banyak memberikan banyak bimbingan, saran, dan kritik, koreksi, serta masukkan kepada penulis selama proses penyusunan tesis ini.
8. Ibu Dr. Sri Wahyuningsih, M.Si., selaku Dosen Pembahas II yang telah banyak memberikan banyak bimbingan, saran, dan kritik, koreksi, serta masukkan kepada penulis selama proses penyusunan tesis ini.
9. Ibu Dr. Nuning Nurcahyani, M.Si., selaku Ketua Prodi Magister Biologi FMIPA Universitas Lampung.
10. Bapak Drs. M. Kanedi, M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi FMIPA Universitas Lampung.
11. Bapak dan Ibu Dosen serta segenap karyawan di Magister Biologi atas ilmu, bimbingan dan bantuannya kepada penulis.
12. Teman - teman sepenelitian Kultur *In Vitro*
13. Teman – teman Magister Biologi angkatan 2020 atas ilmu, keakraban, canda tawa, dukungan dan kebersamaannya selama ini.
14. Almamater Tercinta, Universitas Lampung.

Akhir kata, penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan di dalam penyusunan tesis ini dan jauh dari kata sempurna, semoga tesis yang sederhana ini dapat berguna dan bermanfaat bagi kita. Aamiin.

Wassalamu'alaikum Wr. Wb.

Bandar Lampung, 01 Agustus 2022

Penulis

Yuliana Permata Sari

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	i
DAFTAR GAMBAR	iii
DAFTAR TABEL	iv
 I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
1.4 Kerangka Pikir	4
1.5 Hipotesis	5
 II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tanaman Anggrek <i>Cattleya</i> sp.....	6
2.2 Penyakit Layu Fusarium	8
2.3 Ketahanan Terimbas	10
2.4 Asam Fusarat	11
2.5 Perbanyak Tanaman Secara <i>In vitro</i>	12
2.6 Kandungan Gula Reduksi	13
2.7 Senyawa Fenol	15
2.8 Profil Protein	16
 III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	17
3.2 Alat dan Bahan.....	17
3.2.1 Alat – Alat Penelitian.....	17
3.3.3 Bahan – Bahan Penelitian	17
3.3 Rancangan Percobaan	18
3.4 Pelaksanaan Penelitian	18
3.4.1 Penanaman Planlet <i>Cattleya</i> sp. Dalam Medium Vacint and Went Yang Sudah Diberi Asam Fusarat	20
3.4.2 Seleksi Planlet <i>Cattleya</i> sp. Dengan Asam Fusarat Pada Berbagai Konsentrasi	20
3.4.3 Analisis Karakterisasi Planlet <i>Cattleya</i> sp.	21
3.4.3.1 Analisis Kandungan fenol Total	21

3.4.3.2 Analisis Kandungan Gula Reduksi.....	22
3.4.4 Analisis Profil Protein <i>Cattleya</i> sp. Dengan Metode SDS PAGE	24
3.5 Analisis Data	27

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4. 1 Jumlah Planlet Hidup	28
4. 2 Visualisasi Planlet	29
4. 3 Karakterisasi Planlet Anggrek <i>Cattleya</i> sp	32
4.3.1 Analisis Kandungan Fenol Total	32
4.3.2 Kandungan Gula reduksi.....	35
4. 4 Analisis Profil Protein Planlet Anggrek <i>Cattleya</i> sp.....	39

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan	42
5.2 Saran	42

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 Bunga Anggrek <i>Cattleya</i> sp	7
Gambar 2 Penyakit Layu Fusarium Pada Anggrek <i>Cattleya</i> sp.....	10
Gambar 3 Struktur Kimia Asam Fusarat.....	12
Gambar 4 Beberapa contoh gula reduksi	13
Gambar 5 Reaksi glukosa dengan pereaksi Nelson	14
Gambar 6 Perbedaan struktur senyawa fenol dan alkohol.....	16
Gambar 7 Bagan Alir Penelitian	19
Gambar 8 Visualisasi perkembangan planlet anggrek <i>Cattleya</i> sp.....	31
Gambar 9 Kurva Standar Asam Galat	33
Gambar 10 Grafik Kandungan Fenol Total	35
Gambar 11 Kurva Standar Gula Reduksi	36
Gambar 12 Grafik Kandungan Gula Reduksi	38
Gambar 13 Pola pita profil protein planlet anggrek <i>Cattleya</i> sp.....	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase Jumlah Planlet Hidup Setelah Hasil Seleksi dengan Asam Fusarat	28
Tabel 2 Persentase Visualisasi Planlet Hasil Seleksi dengan Asam Fusarat....	30
Tabel 3 Perbandingan Asam Galat dan Absorbansi.....	33
Tabel 4 Kadar Fenol Total Planlet Anggrek <i>Cattleya</i> sp Yang Diinduksi Asam Fusarat	34
Tabel 5 Perbandingan Konsentrasi Gula Reduksi dan Absorbansi	36
Tabel 6 Kadar Gula Reduksi Planlet Anggrek <i>Cattleya</i> sp Yang Diinduksi Asam Fusarat	37

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Anggrek merupakan salah satu komoditas tanaman hortikultura yang mempunyai peranan penting dalam pertanian, khususnya tanaman hias (Widyas, 2009). Salah satu tanaman hias yang bernilai ekonomi tinggi dan harganya cukup stabil adalah anggrek. Anggrek banyak diusahakan petani anggrek dan pengusaha secara komersial (Nuryani dkk., 2012). Tanaman anggrek merupakan jenis tanaman hias yang paling banyak diminati oleh masyarakat dibanding tanaman hias lain karena keindahan bentuk, warna, tekstur, dan susunan bunga (Litbang pertanian, 2015).

Menurut Balithi (2010), peningkatan kualitas tanaman anggrek perlu dilakukan agar tanaman anggrek dapat bersaing dalam era globalisasi. Usaha dalam meningkatkan kualitas tanaman anggrek dilakukan dengan metode non konvensional melalui bioteknologi.

Jenis tanaman anggrek yang banyak dikenal di Indonesia salah satunya adalah anggrek *Cattleya*. Anggrek ini mendapat julukan ratu anggrek karena memiliki bentuk dan warna bunga yang anggun seperti halnya seorang ratu (Rahmatia dan Pitriana, 2007). Anggrek *Cattleya* merupakan salah satu jenis tanaman epifit yaitu tanaman yang hidup menempel pada pohon lain (Iswanto, 2010).

Anggrek *Cattleya* memiliki banyak jenis yang merupakan hasil persilangan. Persilangan tersebut dapat dilakukan baik antar jenis maupun antar marga

(Rahmatia dan Pitriana , 2007). Ciri khas yang dimiliki anggrek *Cattleya* adalah ukuran bunga yang besar dan warna bunga yang sangat beragam (Iswanto, 2010).

Peningkatan kualitas anggrek *Cattleya* perlu dilakukan agar dapat menghasilkan tanaman yang resisten terhadap patogen dan dapat meningkatkan persaingan di pasar nasional maupun internasional. Tanaman anggrek sering mendapatkan serangan penyakit busuk lunak yang sangat merusak dan mengakibatkan penurunan produksinya (Wu *et al.*, 2011). Serangan penyakit tersebut biasanya disebabkan oleh patogen berupa jamur. Salah satu jamur patogen yang sering menyerang tanaman anggrek adalah *Fusarium* sp. (Carling *et al.*, 1999).

Penyakit layu fusarium merupakan penyakit penting yang menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek. Tingkat kematian tanaman anggrek di Amerika Serikat yang disebabkan oleh *Fusarium* mencapai lebih dari 50% dari jumlah tanaman anggrek dan sulit dikendalikan dengan hanya menggunakan fungisida (Wedge and Elmer, 2008).

Daun dan batang menguning, berkeriput, tipis, bengkok, dan leher daun membusuk mencapai pangkal batang merupakan ciri gejala dari tanaman anggrek yang terserang layu *Fusarium*. Secara umum, jamur patogen *Fusarium* sp. akan menyebabkan tanaman layu kemudian mati (Soelistijono, 2015). Pengendalian penyakit layu *Fusarium* biasanya dilakukan hanya dengan menggunakan fungisida kimia, tetapi penggunaan fungisida ini masih belum efektif dalam mengendalikan penyakit tersebut dan dapat berdampak buruk bagi lingkungan (Wedge and Elmer, 2008; Soelistijono, 2015).

Metode seleksi *in vitro* dapat digunakan untuk mendapatkan tanaman dengan sifat yang diinginkan yaitu dengan menggunakan komponen penyeleksi berupa toksin murni seperti asam fusarat. Penggunaan komponen penyeleksi pada medium kultur *in vitro* seperti asam fusarat dapat menyebabkan tanaman

yang ditumbuhkannya memiliki sifat yang lebih terarah sesuai dengan sifat yang diinginkan sehingga lebih efektif dan efisien dalam menangani penyakit, misalnya penyakit yang diakibatkan oleh *Fusarium oxysporum* (Damayanti, 2010).

Asam fusarat (AF), merupakan racun murni dari *Fusarium oxysporum* yang secara kimia disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Asam fusarat pada konsentrasi lebih dari 10^{-5} M dapat bersifat toksik, tetapi pada konsentrasi non toksik, dibawah 10^{-6} M dapat digunakan untuk mengimbas sintesis fitoaleksin, yang merupakan bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen . Sifat asam fusarat di atas menyebabkan asam fusarat banyak digunakan untuk seleksi *in vitro* pada banyak tanaman (Bouizgarne *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa metode seleksi *in vitro* dengan cara penambahan asam fusarat pada medium kultur sebagai komponen seleksi berkorelasi dengan tingkat ketahanan eksplan terhadap *Fusarium oxysporum*. Pendekatan seleksi *in vitro* dilaporkan telah menghasilkan banyak varietas tanaman tahan diantaranya pada tanaman pisang ambon kuning (Sukmadjaja dkk., 2013), vanili (Nurcahyani dkk., 2012), *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016) anggrek *Phalaenopsis amabilis* (Nurcahyani *et al.*, 2021) *Manihot esculent* (Nurcahyani *et al.*, 2021) melon (Sujatmiko dkk., 2012), dan planlet abaka (Sukmadjaja dkk., 2003).

Sejauh ini penelitian mengenai pengaruh asam fusarat terhadap kandungan gula reduksi, fenol total dan profil protein pada anggrek *Cattleya* sp. belum banyak dilakukan, sehingga penelitian ini dilakukan dengan tujuan mendapatkan informasi lebih mendalam mengenai pengaruh asam fusarat terhadap kandungan gula reduksi, fenol total dan profil protein anggrek *Cattleya* sp.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini sebagai berikut.

1. Mengetahui karakter ekspresi yang spesifik pada planlet anggrek *Cattleya* berupa aktivitas senyawa fenol total dan gula reduksi setelah diinduksi asam fusarat
2. Menganalisis perbedaan profil protein planlet anggrek yang telah diinduksi dengan asam fusarat dengan kontrol

1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan kontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang pemuliaan dan penyakit tanaman.

1.4 Kerangka Pikir

Anggrek *Cattleya* adalah salah satu jenis anggrek yang memiliki keistimewaan dari bentuk, ukuran, maupun warna bunganya. Dibandingkan dengan bunga anggrek lainnya, anggrek ini memiliki ukuran bunga yang besar dan warna bunga yang sangat beragam. Keistimewaan inilah yang menjadikan anggrek *Cattleya* mampu bersaing di pasar nasional maupun internasional, tetapi akibat adanya penyakit layu yang sering menyerang tanaman anggrek *Cattleya*, menyebabkan kualitasnya menjadi menurun.

Penyakit layu pada anggrek *Cattleya* disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum*. Jamur ini menyerang akar tanaman anggrek yang terluka atau rimpang akar yang baru saja dipotong. Tanaman anggrek yang terserang penyakit ini akan menunjukkan gejala yaitu daunnya menguning dan mengeriput seperti kekurangan air.

Pada umumnya, pengendalian layu *Fusarium* dilakukan hanya dengan menggunakan fungisida, tetapi penggunaan fungisida dapat berdampak buruk bagi lingkungan dan kesehatan manusia. Untuk itu, pengendalian yang aman dan tidak membahayakan sangat diperlukan. Salah satu

pengendalian yang aman terhadap lingkungan adalah pengendalian hayati. Pengendalian tersebut dilakukan dengan cara menginduksikan asam fusarat pada planlet anggrek *Cattleya* secara *in vitro* untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen.

Asam fusarat (AF) adalah toksin yang dihasilkan oleh *Fusarium oxysporum* yang dapat menginduksi tanaman sehingga memberikan respon dalam menghambat aktivitas patogen dengan memproduksi senyawa fitoaleksin. Ketahanan terimbis (*induced resistance*) merupakan ketahanan yang tereksresi setelah patogen menyerang. *Induced resistance* dapat dijadikan sebagai alternatif cara untuk mendapatkan tanaman tahan terhadap penyakit karena tanaman mampu menstimulasi mekanisme resistensi alami.

1.5 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah:

1. Terdapat karakter ekspresi yang spesifik pada planlet anggrek *Cattleya* melalui aktivitas senyawa fenol total dan gula reduksi setelah diinduksi asam fusarat
2. Terdapat perbedaan profil protein planlet anggrek *Cattleya* sp. yang diinduksi asam fusarat dengan kontrol

II. TINAJUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Anggrek *Cattleya* sp.

Klasifikasi bunga anggrek *Cattleya* sp. dalam sistem klasifikasi Cronquist (1981) dan APG II (2003) sebagai berikut.

Divisi : Magnoliophyta
Kelas : Liliidae
Bangsa : Asparagales
Suku : Orchidaceae
Marga : *Cattleya*
Jenis : *Cattleya* sp. Lindl.

Anggrek *Cattleya* mendapat julukan *The Queen of Orchid* karena keindahan bunganya. Anggrek *Cattleya* memiliki ukuran bunga yang lebih besar dibandingkan dengan anggrek lainnya (Sarwono, 2002). Tanaman anggrek *Cattleya* termasuk ke dalam tipe simpodial. Tanaman tipe ini memiliki ciri-ciri yaitu tidak memiliki batang utama, bunga keluar dari ujung batang, dan akan berbunga kembali pada pertumbuhan anakan atau tunas baru (Darmono, 2003).

Anggrek *Cattleya* termasuk tanaman epifit yaitu tanaman yang menempel pada tanaman lain dengan menggunakan akarnya. Akar anggrek *Cattleya* berbentuk silindris dan berujung runcing, serta memiliki daya lekat. Akar anggrek ini tampak berwarna putih keperak-perakan pada bagian luarnya dan berwarna hijau hanya pada bagian ujungnya jika dalam keadaan kering (Darmono, 2003).

Anggrek *Cattleya* memiliki bentuk daun yang lebar, tulang daun yang lurus, dan berjumlah satu atau dua helai tiap batang (Sandra, 2003). Memiliki Batang berwarna hijau, bercabang panjang batang lebih kurang 2-6 cm, pertumbuhan batang simpodial dan lebar daun 2-4 cm (Zulianti dan Zuraidah, 2022). *Pseudobulb* berbentuk ganda agak pipih, keras dan berdaging serta memiliki ukuran yang bervariasi tergantung pada spesiesnya (Darmono, 2003).

Pada **Gambar 1** dapat dilihat bentuk bunga dari anggrek *Cattleya* sp, yang memiliki kelopak bunga berwarna putih dan ungu.



Gambar 1. Bunga Anggrek *Cattleya* sp. (Sumber: Adhe, 2017)

Anggrek *Cattleya* memiliki syarat tertentu untuk dapat tumbuh di dalam suatu lingkungan. Anggrek ini dapat tumbuh pada daerah dengan ketinggian antara 750-2000 mdpl. Pertumbuhan anggrek *Cattleya* dipengaruhi oleh iklim baik kapasitas suhu, cahaya matahari, dan kelembapan udara. Ketiga faktor ini merupakan faktor primer yang menentukan keadaan fisik lingkungan setempat (Sarwono, 2002).

Suhu yang baik untuk pertumbuhan anggrek *Cattleya* yaitu pada suhu siang antara 21-32 °C dan suhu malam 13- 18 °C. Anggrek *Cattleya* membutuhkan intensitas penyinaran berkisar antara 2000-4000 fc atau

30% cahaya matahari penuh (Soeryowinoto, 2006). Pada umumnya, kelembapan nisbi / *relativity humidity* (RH) yang dibutuhkan oleh tanaman anggrek berkisar antara 60-80 %. Faktor kelembapan ini biasanya disertai dengan kelancaran sirkulasi udara (Iswanto, 2002).

2.2 Penyakit Layu *Fusarium*

Jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) adalah salah satu jenis patogen tular tanah yang menyebar melalui tanah atau rimpang dari tanaman sakit, dan menginfeksi tanaman melalui luka yang terjadi karena pengangkutan benih, penyiangian, atau karena serangga dan nematoda. Di dalam jaringan tanaman yang terinfeksi akan terbentuk miselium yang berkembang sampai mencapai pembuluh xilem, sehingga menyebabkan terhalangnya transportasi unsur hara dan akhirnya tanaman layu (Putri *et al.*, 2014 ; Semangun, 2001). Siklus hidup *Fusarium oxysporum* dibagi ke dalam dua fase yaitu fase patogenesis dan fase saprogenesis. Pada fase patogenesis, jamur hidup sebagai parasit pada tanaman inang. Jika tidak ada tanaman inang, jamur *Fusarium* akan hidup di dalam tanah sebagai saprofit pada sisa tanaman dan masuk ke fase saprogenesis, yang kemudian dapat menjadi sumber inokulum untuk menimbulkan penyakit pada tanaman lain (Groenewald, 2006).

Fusarium oxysporum menghasilkan toksin yang menyerang pembuluh xilem dan mengubah permeabilitas membran plasma sel tanaman inang sehingga tanaman yang terinfeksi lebih cepat kehilangan air. Toksin yang dihasilkan *Fusarium oxysporum* yaitu asam fusarat (Nugraheni, 2010). Gejala umum penyakit layu fusarium antara lain tanaman menguning dan kadang-kadang menggulung, daun berkerut dan mengering serta akar membusuk. Penyakit layu fusarium dapat menyebar melalui luka bekas potong (Darmono, 2003).

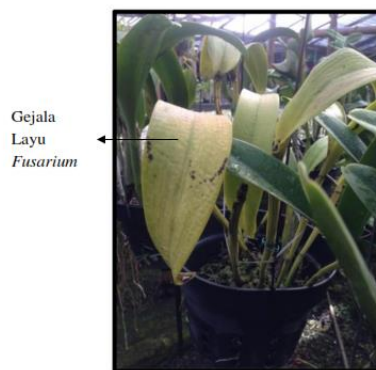
Klasifikasi jamur *Fusarium oxysporum* menurut Semangun (2001) adalah sebagai berikut.

Divisio : Ascomycota
Classis : Sordariomycetes
Ordo : Hypocrales
Familia : Nectriaceae
Genus : *Fusarium*
Species : *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum (Fo) dapat bertahan lama dalam tanah sebagai saprofit pada sisa-sisa tanaman. Apabila kondisi lingkungan menguntungkan, jamur akan berkecambah dan mengadakan penetrasi sehingga terjadi infeksi pada tanaman (Semangun, 1996). Penyakit layu fusarium dapat menyerang bunga, pucuk daun, daun, dan pangkal daun. Kadang-kadang dapat meluas pada bagian batang (Lestari, 2002). Tanaman yang terserang *Fusarium oxysporum* akan menyebabkan gejala penyakit awal seperti tulang-tulang daun pucat, terutama pada daun-daun bagian atas dan diikuti dengan menggulungnya daun yang lebih tua kemudian tangkai daun.

Infeksi tanaman oleh patogen penyebab layu *Fusarium* dapat terjadi melalui biji yang terkontaminasi atau pencangkakan tanaman yang terinfeksi. Selain itu, infeksi tanaman dapat disebabkan oleh inokulum patogen yang masuk melalui akar akibat adanya luka maupun dengan cara penetrasi langsung (Winarsih, 2007).

Proses invasi tanaman oleh patogen melalui serabut akar dapat mengganggu proses pengambilan air dan mineral, sehingga proses metabolisme tanaman tidak berjalan dengan baik (Winarsih, 2007). Penyakit yang ditimbulkan dari infeksi patogen ini dapat menyerang tanaman sebelum berkecambah, pada masa perkembangan, pada saat tanaman masih muda, dan menjelang berbunga atau berbuah (Semangun, 2001). Gejala penyakit layu *Fusarium* disajikan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Penyakit Layu Fusarium Pada Anggrek *Cattleya* sp.
(Sumber: Adhe, 2017)

Secara visual, tanaman anggrek *Cattleya* yang terserang jamur *Fusarium oxysporum* menunjukkan gejala yaitu menguningnya tanaman seperti kekurangan air, daun-daun mengeriput dan terkadang agak terpilin, umbi semu menjadi kurus, dan perakaran membusuk yang meluas hingga pangkal batang. Gejala yang ditimbulkan lainnya yaitu jika akar rimpang dipotong, epidermis dan hipodermis tampak berwarna ungu, sedangkan floem dan xilem tampak berwarna ungu merah jambu muda hingga akhirnya seluruh bagian akar menjadi ungu kemudian mati (Ditlinhorti, 2013).

2.3 Ketahanan Terimbas

Ketahanan terimbas merupakan proses pengaktifan ketahanan alami tanaman, seperti penambahan sel lignin, produksi fitoaleksin, peningkatan enzim peroksidase dan kandungan klorofil (Agrios, 2005), yang diaktifkan oleh agensia biotik atau abiotik (Soesanto, 2008). Pada umumnya, ketahanan terimbas adalah ketahanan sistemik. Ketahanan ini diartikan sebagai bentuk ketahanan yang daya pertahanan tanamannya ditingkatkan tidak hanya pada bagian tanaman yang terinfeksi, tetapi juga pada jaringan terpisah tempat yang tidak terinfeksi (Van Loon *et al.*, 1998).

Mekanisme ketahanan tanaman terhadap penyakit dapat dibedakan menjadi dua yaitu ketahanan alami dan ketahanan terimbas. Ketahanan alami berkaitan dengan karakter normal dari tanaman seperti kutikula yang tebal,

pembukaan stomata, jumlah trikoma, dan juga kemampuan membentuk senyawa anti mikroba. Ketahanan terimbas merupakan ketahanan yang terekspresi setelah tanaman diserang patogen (Hwang and Kook 1995). *Induced resistance* menggunakan bahan pengimbas (elisitor) menyebabkan sistem ketahanan tanaman menjadi aktif, dengan menstimulasi mekanisme resistensi alami yang dimiliki oleh inang. Elisitor dapat berupa agen biologi, kimia, dan fisika (Agrios, 2005 dan Amza, 2011). *Induced resistance* merupakan strategi pengendalian yang efektif, karena tanaman dapat meningkatkan kemampuan dalam menahan serangan patogen seperti jamur, bakteri dan virus (Quing and Hongwen, 2002).

Penggunaan jamur antagonis adalah salah satu strategi yang diterapkan untuk meningkatkan ketahanan tanaman, melalui mekanisme pengimbasan. Beberapa parameter yang dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain adanya peningkatan senyawa fenol, enzim peroksidase, dan lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997).

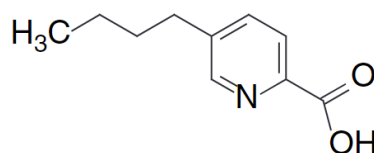
2.4 Asam Fusarat

Salah satu cara untuk mendapatkan tanaman yang tahan terhadap layu fusarium adalah dengan menginduksikan toksin yang dihasilkan *Fusarium oxysporum* pada tanaman (Sukmadjaja dkk., 2013). Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Asam ini dapat bersifat toksin (konsentrasi lebih dari 10^{-5} M) sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Bouizgarne *et al.*, 2006)

Asam fusarat dapat menginduksi pembentukan senyawa untuk ketahanan tanaman. Seleksi tanaman dengan menginduksi ketahanan menggunakan asam fusarat akan lebih efektif dengan memberikan sumber induksi dengan dosis rendah yaitu pada konsentrasi asam fusarat nontoksik (di bawah 10^{-6} M) sehingga tanaman akan memberikan respon ketahanan dengan memproduksi fitoaleksin untuk menghambat aktivitas patogen. Salah satu senyawa

fitoaleksin yang diproduksi oleh tanaman adalah fenol. Induksi asam fusarat juga dapat meningkatkan senyawa H_2O_2 pada medium kultur, di mana H_2O_2 bersifat toksik bagi patogen. Sebaliknya asam fusarat pada konsentrasi toksik akan menyebabkan kematian pada tanaman (Bouizgarne *et al.*, 2006).

Asam fusarat adalah asam piridin-karboksilat yang memiliki rumus empiris $C_{10}H_{13}O_2N$ dan secara kimia dapat disebut juga asam 5-n-butil-pikolinat (Srivastava, *et al.*, 2020). Pada **Gambar 3** dapat dilihat rumus kimia dari Asam Fusarat



Gambar 3: Struktur kimia asam fusarat (sumber: Son *et al.*, 2007)

Penggunaan Asam fusarat dapat digunakan untuk menyeleksi tanaman yang tahan terhadap penyakit layu fusarium. Penggunaan pada seleksi *in-vitro* karena asam fusarat bersifat pathogen terhadap tumbuhan. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan asam fusarat pada media sebagai komponen seleksi berkorelasi dengan tingkat ketahanan tanaman terhadap fusarium (Nurchayani dkk., 2012).

2.5 Perbanyak Tanaman Secara *In Vitro*

Metode *in vitro* dapat digunakan untuk menciptakan varietas-varietas tumbuhan baru dengan menumbuhkan tanaman utuh dari bagian-bagian tanaman induknya seperti daun, mata tunas serta menumbuhkannya pada medium buatan yang mengandung berbagai nutrient dan hormon (Campbell *et al.*, 2008).

Faktor utama dalam perbanyak dengan kultur *in vitro* adalah media. Keberhasilan metode kultur *in vitro* secara umum sangat tergantung pada jenis media. Media tumbuh pada kultur *in vitro* sangat besar pengaruhnya terhadap pertumbuhan dan perkembangan eksplan serta bibit yang

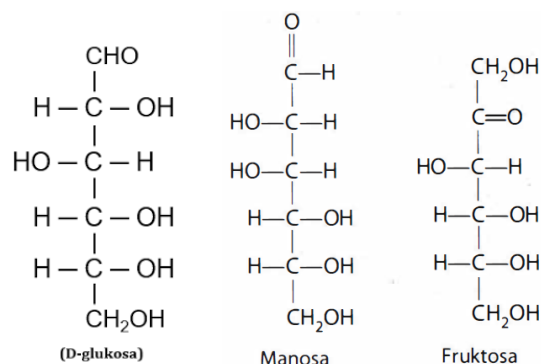
dihasilkannya (Tuhuteru dkk, 2012). Hal lain yang mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman secara *in vitro* yaitu faktor lingkungan seperti pH, kelembapan, cahaya, dan temperatur (Nugroho, 2000).

Perbanyak tanaman secara *in vitro* mendatangkan banyak keuntungan, yaitu lingkungan terkontrol dan kondisi yang aseptik pada ruangan mengakibatkan bahan (medium) tanam yang akan digunakan terbebas dari kontaminasi jamur dan bakteri. Sehingga memungkinkan memberi perlakuan pada medium tanam secara *in vitro* yaitu dengan memberikan bahan pengimbas. Tanaman yang ditanam dengan kultur *in vitro* yaitu pada wadah kultur yang relatif kecil sehingga memungkinkan tanaman ditanam dalam jumlah besar pada tempat yang terbatas (Andiyani, 2001).

\Pendekatan seleksi *in-vitro* dilaporkan telah menghasilkan banyak varietas tanaman tahan diantaranya pada tanaman vanili (Nurchayani *et al.*, 2012) dan melon (Sujatmiko dkk., 2012).

2.6 Kandungan Gula Reduksi

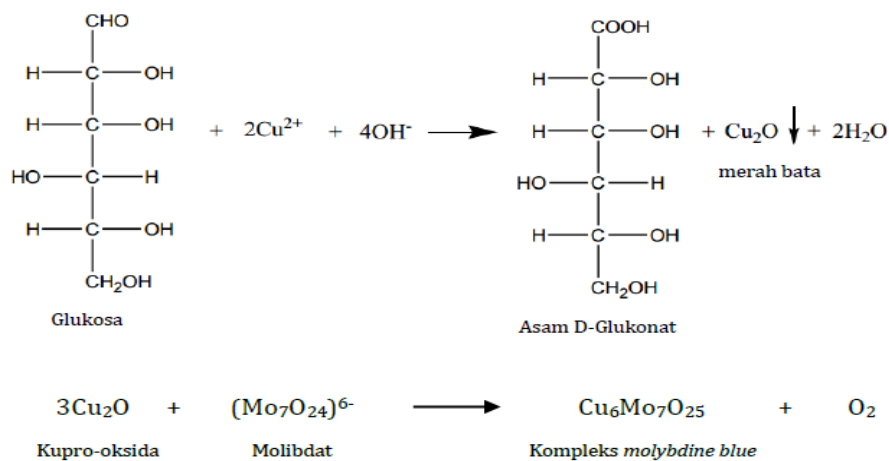
Gula reduksi adalah gula yang mempunyai kemampuan untuk mereduksi. Hal ini dikarenakan adanya gugus aldehid atau keton bebas. Senyawa-senyawa yang mengoksidasi atau bersifat reduktor adalah logam-logam oksidator seperti Cu (II). Contoh gula yang termasuk gula reduksi adalah glukosa, fruktosa, laktosa, maltosa, dan lain-lain. Beberapa contoh dari gula reduksi dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Beberapa contoh gula reduksi
(sumber: Hutapea dan Sitorus, 2017)

Monosakarida mempunyai kemampuan untuk mereduksi suatu senyawa. Sifat pereduksi dari suatu gula ditentukan oleh ada tidaknya gugus hidroksil bebas yang reaktif. Prinsip analisisnya berdasarkan pada monosakarida yang memiliki kemampuan untuk mereduksi suatu senyawa. Adanya polimerisasi monosakarida memengaruhi sifat mereduksinya (Wilberta dkk., 2021).

Analisa yang dapat digunakan untuk mengetahui golongan gula reduksi adalah analisis Nelson-Somogyi. Penambahan reagen Nelson bertujuan untuk mereduksi kupri oksida menjadi kupro oksida yang mana K-Na-tartrat yang terkandung dalam reagen Nelson berfungsi untuk mencegah terjadinya pengendapan kupri oksida. Dalam analisa ini, sampel akan direaksikan dengan arsenomolybdat, penambahan reagen arsenomolibdat ini bertujuan agar bisa bereaksi dengan endapan kupro oksida. Pada peristiwa ini kupro oksida akan mereduksi kembali arsenomolibdat menjadi *molibdene blue* yang berwarna biru kehijauan yang nanti diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Anggraini dan Damayanti, 2019). Intensitas warna biru yang terbentuk ekuivalen dengan jumlah gula reduksi dalam sampel. Jika nilai absorbansinya semakin tinggi maka kandungan gula reduksi dalam sampel semakin banyak (Hutapea dan Sitorus, 2017). Reaksi glukosa dengan pereaksi Nelson dapat dilihat pada **Gambar 5**



Gambar 5. Reaksi glukosa dengan pereaksi Nelson

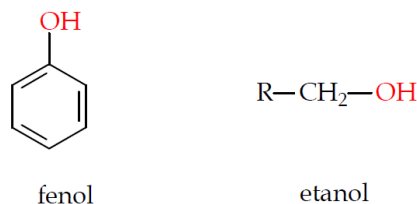
Secara umum gula reduksi memiliki struktur yang hemiasetal atau hemiketal. Semua monosakarida (glukosa, fruktosa, galaktosa) dan disakarida (laktosa dan maltose), kecuali sukrosa dan pati (polisakarida) termasuk gula reduksi. Hasil dari gula reduksi sangat berhubungan erat dengan aktivitas enzim. Semakin tinggi aktivitas suatu enzim maka akan semakin tinggi gula pereduksi yang dihasilkan (Lehninger, 1982).

2.7 Senyawa Fenol

Senyawa fenolik di alam terdapat sangat luas mempunyai variasi struktur yang luas, mudah ditemukan di semua tanaman, daun, bunga dan buah. Ribuan senyawa fenolik di alam telah diketahui strukturnya antara lain flavonoid, fenol monosiklik sederhana, fenil propanoid, polifenol (lignin, melanin, tanin), dan kuinon fenolik (Fauziah, 2008).

Senyawa fenol mirip dengan alkohol. Perbedaannya, senyawa fenol terikat pada gugus aromatik atau gugus aril (benzena yang kehilangan 1 atom hidrogen atau $-\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$), sedangkan gugus hidroksil pada senyawa alkohol terikat pada gugus alifatik. Berdasarkan hal tersebut senyawa $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ lazim disebut senyawa fenol. Antara alkohol dengan fenol kedua-duanya sama mengandung gugusan hidroksil ($-\text{OH}$), tetapi berbeda pada karbon C di mana alkohol terikat pada karbon tetrahedral, sedangkan fenol terikat pada

karbon *sp*²-hibrida dari cincin aromatik (Hadanu, 2019). Perbedaan struktur senyawa fenol dengan alkohol dapat dilihat pada **Gambar 6**.



Gambar 6. Perbedaan struktur senyawa fenol dan alkohol

(Sumber: Hadanu, 2019)

Senyawa fenol dalam tumbuhan dapat berupa fenol, asam fenolat, tannin, lignin dan flavonoid (Septiani *et al.*, 2018). Kandungan fenolik yang terkandung dalam suatu tumbuhan dinyatakan sebagai *GAE* (*galic acid equivalent*) yaitu jumlah kesetaraan milligram asam galat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) dalam satu gram sampel. Secara umum senyawa fenol memiliki sifat bakteriosid, antimetik, antihelminik, antiasmatik, analgetik, antiinflamasi, meningkatkan motilitas usus, antimikroba, dan masih banyak lagi (Andarwulan, 2012).

2.8 Profil Protein

Protein merupakan polipeptida yang berlipat membentuk struktur biologi yang aktif. Terdapat 2 jenis protein, yaitu protein struktural, contohnya protein penyusun dinding sel dan protein fungsional, contohnya enzim (Tropp, 2012). Protein profiling bertujuan untuk melihat protein yang diturunkan dari organisme untuk menghasilkan informasi tentang protein organisme secara keseluruhan (Pizzaro *et al.*, 2007).

Marka protein dapat digunakan untuk mengidentifikasi berat molekul dari campuran polipeptida. Elektroforesis sering digunakan untuk karakterisasi protein berdasarkan berat molekul. Salah satu metode elektroforesis yang sering dipakai adalah SDS PAGE (Sodium Dodecylsulphat Polyacrylamid Gel

Electrophoresis) yang merupakan metode standar pengujian terhadap berat molekul protein (Rantam, 2003). Alasan elektroforesis digunakan dalam penelitian ini karena memiliki peran sangat penting dalam proses pemisahan molekul-molekul biologi, khususnya protein. Metode tersebut tidak memengaruhi struktur biopolimer, serta sangat sensitif terhadap perbedaan muatan dan berat molekul yang cukup kecil (Bachrudin, 1999).

Prinsip kerja SDS PAGE melibatkan denaturasi awal protein komponen dengan deterjen anionik yang juga mengikat protein, memberikan semua protein muatan negatif sebanding dengan massa molekul protein. Langkah ini diikuti dengan elektroforesis melalui akrilamida matriks gel berpori yang memisahkan protein berdasarkan massa molekul (Nowakowski *et al.*, 2014). Molekul molekul yang lebih kecil akan bergerak lebih cepat pada gel, sedangkan molekul yang lebih besar akan bergerak secara lambat sehingga menghasilkan pita yang dekat dengan well pada gel (Grabski and Burgess, 2000).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2021 sampai Januari 2022 di Laboratorium Botani (ruang penelitian *In Vitro*) Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat – Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian ini adalah autoclave, *Laminar Air Flow* (LAF) *Cabinet*, spektrofotometer, botol kultur berukuran 250 ml, cawan petri berukuran 10 cm, aluminium foil, kertas saring, pinset, scalpel, mata pisau scalpel, pipet tip, mikropipet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, microwave, hot plate, timbangan analitik Ohaus, waterbath, petridish, tisu, shaker, alat elektroforesis, mortar, pestle, *cover glass*, *obyek glass*, mikroskop, kertas label dan kamera.

3.2.2 Bahan – Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah planlet anggrek *Cattleya* sp, asam fusarat murni yang diproduksi oleh *Sigma Chemical Co*, Alkohol 70%, Alkohol 80%, dan akuades, *Bovin Serum Albumine* (BSA), marker berat molekul protein (*Page – Ruler Low Range Unstained Protein Ladder*) larutan akrilamid/ bisakrilamid, asam glacial, buffer Tris-HCL, *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS), Larutan penyangga

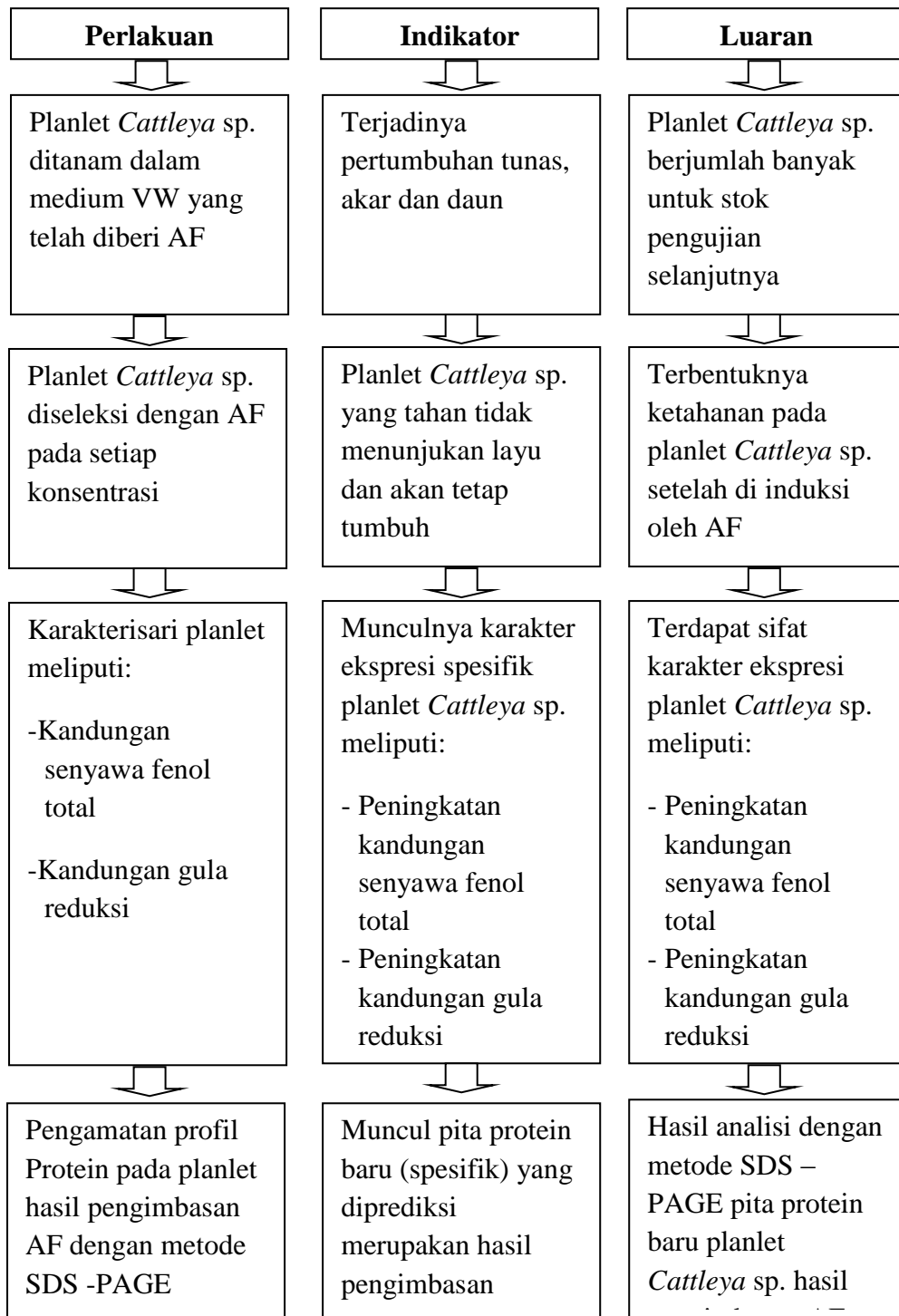
elektroforesis, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *Coomasie Brilliant Blue*, *Reducing Sample Buffer* (RBS).

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan satu faktor, yaitu konsentrasi asam fusarat 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm dan 40 ppm. Masing – masing dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali, dan pada setiap ulangan terdiri dari 3 planlet anggrek *Cattleya* sp. dalam setiap botol kultur. Parameter yang diuji yaitu analisis kandungan senyawa fenol total, kandungan gula reduksi, dan analisis profil protein.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahap, yaitu 1). Penanaman planlet anggrek *Cattleya* sp. kedalam media VW yang sebelumnya telah ditambahkan asam fusarat dengan masing – masing konsentrasi: 2). Penentuan kisaran konsentrasi asam fusarat toleran untuk seleksi planlet *Cattleya* sp. secara *in vitro*: 3). Analisis karakter spesifik pada planlet anggrek *Cattleya* sp., meliputi analisis kandungan senyawa fenol total, kandungan gula reduksi, dan analisis profil protein. Tahap penelitian ini disajikan dalam bentuk bagan alir pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Bagan alir penelitian

Berikut ini uraian dari tahapan penelitian yang tertera pada bagan alir.

3.4.1 Penanaman planlet *Cattleya* sp. dalam medium Vacin and Went yang sudah diberi Asam Fusarat

Medium *Vacint & Went* pada botol kultur yang telah disterilisasi ditambah asam fusarat (AF) dengan konsentrasi asam fusarat adalah 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Asam fusarat sebelum digunakan, dilarutkan dengan akuades sampai diperoleh konsentrasi yang ditentukan, kemudian disaring menggunakan kertas saring, dilakukan sebanyak 2 kali. Penyaringan dilakukan dalam ruang steril di dalam *Laminar Air Flow* dalam botol kultur yang sudah disterilisasi. Sebelum digunakan, medium diinkubasikan selama 7 hari pada suhu kamar 25 °C untuk memastikan AF telah tersaring dengan baik. Apabila dalam waktu 7 hari tidak terjadi kontaminasi pada medium, maka medium dapat digunakan.

Penanaman planlet *Cattleya* sp. dilakukan dalam ruang steril didalam *Laminar Air Flow* (LAF) *Cabinet* planlet dari botol kultur dikeluarkan dengan *scalpel* steril dan satu-persatu diletakkan di atas cawan petri berdiameter 10 cm, kemudian planlet dipilah satu-satu, setelah itu ditanam pada masing-masing botol kultur yang berisi medium perlakuan yang telah ditentukan di atas. Masing-masing konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan dan setiap ulangan terdiri dari 3 eksplan *Cattleya* sp dalam setiap botol kultur.

3.4.2 Seleksi planlet *Cattleya* sp. dengan asam fusarat pada berbagai konsentrasi

Seleksi planlet dilakukan selama 30 hari. Pada hari ke 30 dilakukan evaluasi untuk mengetahui konsentrasi AF yang toleran untuk seleksi planlet *Cattleya* sp. secara *in vitro*. Rumus yang digunakan untuk menghitung jumlah planlet *Cattleya* sp. yang hidup menggunakan Persamaan 1, menurut Nurcahyani (2014):

$$\text{Persentase planlet yang hidup} = \frac{\text{jumlah planlet hidup}}{\text{Jumlah seluruh planlet}} \times 100\% \quad (1)$$

3.4.3 Analisis Karakterisasi Planlet *Cattleya* sp.

Karakter planlet anggrek *Cattleya* sp. yang berhubungan dengan ketahanan *Fusarium oxysporum* dapat ditinjau melalui visualisasi dan persentase planlet yang hidup, kandungan senyawa fenol total dan kandungan gula reduksi.

3.4.3.1 Analisis Kandungan Fenol Total

Bahan untuk analisis senyawa fenol total menggunakan planlet *Cattleya* sp yang sudah diberi asam fusarat dan tanpa perlakuan (kontrol). Analisis senyawa fenol total menggunakan Follin-Ciocalteu dengan langkah – langkah sebagai berikut,

3.4.3.1.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Asam Galat dengan Reagen Fenol *Follin – Ciocalteu*

Pembuatan larutan asam galat dalam methanol dengan konsentrasi 300, 400, 500, 600, 700 dan 800 mg/L dari masing – masing konsentrasi pipet 0,2 mL, lalu ditambahkan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen *Follin – Ciocalteu*. Larutan tersebut dikocok hingga homogen berwarna jernih kekuningan. Larutan didiamkan selama 8 menit, ditambah 3 mL larutan Na_2CO_3 20%, lalu dikocok kembali hingga homogen. Larutan tersebut didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru pada larutan. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer Vis pada panjang gelombang 749 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi asam galat (mg/100 g) dengan absorbansi.

3.4.3.1.1 Analisis Kandungan Fenol Total dengan Metode *Follin – Ciocalteu*

Ekstrak daun anggrek *Cattleya* sp. segar dalam methanol, sebanyak 0,2 mL dari masing – masing larutan ekstrak ditambah dengan 15,8 mL akuades dan 1 mL reagen *Follin – Ciocalteu*, dikocok hingga homogen. Setelah homogen maka akan terbentuk larutan jernih berwarna kekuningan. Larutan didiamkan selama 8 menit, lalu ditambah 3 mL larutan 3 mL larutan Na₂CO₃ 20%, lalu dikocok kembali hingga homogen. Larutan tersebut didiamkan selama 30 menit pada suhu kamar hingga terbentuk warna biru pada larutan. Serapan larutan diukur dengan spektrofotometer Vis pada panjang gelombang 749 nm. Kadar fenol yang diperoleh merupakan mg ekuivalen asam galat/ gram sampel. Menurut Hapsari dkk. (2018) Perhitungan Kandungan Fenol Total dihitung menggunakan persamaan 2:

$$\text{Kandungan Fenol Total (mg GAE/g)} = \frac{x \cdot V \cdot FP}{BS} \quad (2)$$

Keterangan:

x = Konsentrasi (ppm)

V= Volume larutan sampel (ekstrak) (mL)

FP= Faktor pengenceran larutan sampel

BS = Berat sampel (g)

3.4.3.2 Analisis Kandungan Gula reduksi

Bahan untuk analisis kandungan gula reduksi menggunakan planlet *Cattleya* sp. yang sudah diberi asam fusarat dan tanpa perlakuan (kontrol). Analisis kandungan gula reduksi menggunakan metode Nelson – Somogyi dengan langkah – langkah sebagai berikut.

3.4.3.2.1 Pembuatan Kurva Kalibrasi Gula reduksi

Pembuatan Larutan glukosa standar (10 mg glukosa/100mL), dilakukan 5 pengenceran larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 ml yang masing – masing konsentrasi dimasukan kedalam masing – masing tabung reaksi dan 1 tabung berisi akuades sebagai blanko. Sebanyak 1 mL reagensia nelson (nelson a 25 bagian nelson b 1 bagian) ditambahkan kedalam masing – masing tabung, kemudian dipanaskan selama 20 menit. Larutan didinginkan di dalam gelas piala sampai suhu tabung 25 °C, lalu ditambahkan 1 ml reagensia arsenomolibdat, dikocok sampai semua endapan larut kembali. Setelah homogen kembali maka ditambahkan 7 ml akuades dan dikocok hingga homogen. Larutan diukur dengan spektrofotometer Vis pada panjang gelombang 695 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.

3.4.3.2.2 Penentuan Kandungan Gula Reduksi

Ekstrak daun anggrek *Cattleya* sp. segar (larutan ekstrak harus jernih) masing – masing konsentrasi diambil 1 ml, dimasukan kedalam masing – masing tabung reaksi dan ditambahkan 1 ml reagensia nelson ke dalam masing – masing tabung, kemudian dipanaskan selama 20 menit. Larutan didinginkan di dalam gelas piala sampai suhu tabung 25 °C, lalu ditambahkan 1 ml reagensia arsenomolibdat, dikocok sampai semua endapan larut kembali. Setelah homogen kembali

maka ditambahkan 7 ml akuades dan dikocok hingga homogen. Larutan diukur dengan spektrofotometer Vis pada panjang gelombang 695 nm, kemudian dibuat kurva kalibrasi hubungan antara konsentrasi glukosa dengan absorbansi.

Menurut Pujiati (2016) kadar gula reduksi dihitung dengan persamaan 3:

$$\text{Kadar Gula Reduksi (\%)} = \frac{x \cdot \text{FP}}{\text{BS}} \times 100 \% \quad (3)$$

Keterangan:

x = Konsentrasi (ppm)

FP= Faktor pengenceran larutan sampel

BS = Berat sampel (g)

3.4.4 Analisis Profil Protein *Cattleya* sp. dengan Metode SDS –PAGE

3.4.4.1 Ekstraksi Protein Planlet *Cattleya* sp.

Ekstraksi dilakukan dengan menimbang 1 g daun planlet dan masing – masing ditambah 300 μL *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (NaCl 8,55 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,33 g/L, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,34 g/L) dengan pH 7 sebagai buffer ekstraksi dan ditambah inhibitor protease, selanjutnya digerus menggunakan mortar dan *pestle* sampai homogen. Sampel yang telah digerus disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 detik. Supernatan yang mengandung *crude protein* diambil dan disimpan pada suhu - 20°C (Maniatis *et al.*, 1982).

3.4.4.2 Analisis Profil Protein Planlet *Cattleya* sp (SDS- PAGE)

3.4.4.2.1 Pengukuran Konsentrasi Protein

Setelah *crude protein* didapatkan, maka dilakukan pengukuran konsentrasi protein pada masing – masing

sampel. Konsentrasi sampel protein ditentukan menggunakan metode Bio-rad (*Bio-rad Assay*). Perhitungan konsentrasi profil protein yaitu menggunakan *Bovin Serum Albumin* (BSA) yang digunakan sebagai standar konsentrasi protein. Blangko digunakan 200 μL *Bio-rad dye* dan 800 μL akuades. Penentuan konsentrasi protein dilakukan dengan cara yaitu diambil 2 μL dari sampel protein menggunakan mikropipet lalu ditambah 200 μL *Bio-rad dye* dan 798 μL akuades, kemudian disuspensi agar tercampur dan selanjutnya dibaca menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm. Konsentrasi protein dapat diketahui melalui persamaan fungsi kurva baku standar protein BSA.

3.4.4.2.2 Penentuan Berat Molekul (BM) Protein

Penentuan Berat Molekul (BM) Protein menggunakan metode SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfat – Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) menurut Maniatis *et al.*, (1982). Urutan model ini yaitu resolving gel 12% (akuades 3,3 mL, poliakrilamid 4 mL, 1,5 M Tris pH 8,8 2,5 mL, 10% SDS 100 μL , 10% APS 90 μL) dimasukkan ke dalam pasangan plat kaca sebagai cetakan gel dan ditunggu sampai gel terpolarisasi.

Stacking gel 6% (akuades 2,6 mL, poliakrilamid 1 mL, 0,5 M tris pH 6,8 1,15 mL, 10% SDS 50 μL , TEMED 10 μL , 10% APS 90 μL) dimasukkan di atas resolving gel dan dipasang sisir yang kegunaannya untuk membuat sumuran agar sampel protein dapat dimasukkan. Setelah stacking gel terpolarisasi, gel dilepaskan dari cetakan dan plat dirangkai dengan apparatus elektroforesis.

Running buffer 0,1% (akuades 1 L, tris Base 15 g, glisin 72 g, SDS 5g) dituangkan ke dalam bak dan sisir dilepas. Kemudian sampel protein sebanyak 10 μ L dicampur dengan 2 μ L sampel buffer (Tris 1 ml, SDS 10%, β mercaptoetanol, bromophenol blue 1%, aquades 4 ml). Semua larutan di panaskan dalam air mendidih selama 2 menit dan secepatnya didinginkan dalam pecahan es. Larutan sampel protein dan marker protein dimasukkan ke dalam sumuran gel (gel akrilamid 12%). Elektroforesis pada tegangan 100 volt dilakukan selama 1,5 -2,5 jam. Pita protein dengan berat molekul lebih besar akan terbentuk lebih dekat dengan tempat awal pemisahan.

Pewarnaan pita protein dilakukan dengan cara merendam gel hasil elektroforesis (rangkai plat dilepas) ke dalam larutan 1, 10 % *Coomasie Brilliant Blue* dan dilakukan menggunakan shaker. Kemudian setelah diwarnai, dilakukan destaining untuk menghilangkan warna dengan jalan merendam gel ke dalam larutan destaining (500 mL akuades, 40 mL methanol, 10 mL asam asetat glasial) hingga gel menjadi jernih dengan pita terpisah satu sama lainnya. Gel kemudian disimpan dalam 10% asam glasial dan dikeringkan dengan plat kit. Pita protein yang terbentuk dalam gel setelah elektroforesis kemudian ditentukan berat molekulnya.

3.5 Analisis Data

Data berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif yang didukung oleh foto. Adapun data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda. Analisis data dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (Analysis of Variant) atau ANOVA. Analisis ragam atau anova dilakukan pada taraf nyata 5% dan uji lanjut dengan uji Tukey pada taraf nyata 5%.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 SIMPULAN

Simpulan dari penelitian ini adalah:

1. Planlet Anggrek *Catteleya* sp. yang diinduksi dengan Asam Fusarat menunjukkan adanya peningkatan kadar Fenol total dan kandungan gula Reduksi.
2. Dalam analisis profil protein tidak menunjukkan adanya penambahan pita baru atau pengurangan pita. Ini menunjukkan asam fusarat belum berpengaruh nyata terhadap planlet anggrek *Catteleya* sp.

5.2 SARAN

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, harus dilakukan peneitian lebih lanjut untuk mengetahui kadar konsentrasi Asam fusarat yang dapat mempengaruhi profil protein sehingga didapatkan Anggrek Mutan yang toleran terhadap Asam Fusarat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press. New York.
- Al-kayyis, H. K. dan Susanti, H. 2016. Perbandingan Metode Somogyi-Nelson Dan Anthrone-Sulfat Pada Penetapan Kadar Gula Pereduksi Dalam Umbi Cilembu (*Ipomea batatas L.*). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community*. 13(02): 81–89.
- Amza, R.L. 2011. Respon Ketahanan Kultur Pisang Kepok (*Musa balbisiana*) Terhadap Inokulasi *Fusarium oxysporum f. sp cubens*. Universitas Andalas Padang. *Thesis*. pp 1-5
- Andarwulan, N. dan Faradilla., Fitri, R.H. 2012. *Senyawa Fenolik pada Buah Manggis Dari Indonesia*. penerbit SEAFast IPB. Bogor Jawa Barat.
- Andiyani, Y. 2001. *Usaha Pembibitan Anggrek Dalam Botol*. Pustaka Baru press. Yogyakarta. 217p
- Anggraini, D. I. dan Damayanti, D. 2019. Studi Anti Diabetes Kombinasi Ekstrak Etanol Kubis (*Brassica oleracea L.*) Dan Tomat (*Solanum lycopersicum L.*) Secara In Vitro. *As-Syifaa Jurnal Farmas*. 11 (01): 30-37.
- Apridamayanti, P. dan Normagiat, S. 2021. Kandungan Fenol, Flavonoid Total, dan Aktivitas Antioksidan Sediaan Infusa dan Freeze-dried Infusa Tanaman *Plocoglottis lowii* Rchb. f. *Pharmaceutical Journal*. 18 (01): 122–129.
- Bachrudin, Z. 1999. *Petunjuk Laboratorium: Isolasi, Identifikasi, dan Pewarnaan Protein*. Yogyakarta.
- Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi). 2010. *Panduan Karakterisasi Tanaman Hias Anggrek*. Balithi. Jakarta.
- Bouizgarne, B., Bouteau, H.E.M., Frankart, C., Rebutier, D., Madiona, K., Pennarun, A.M., Monestiez, M., Trouverie, J., Amiar, Z., Briand, J., Brault, M., Rona, J.P., Ouhdouch, Y. and Hadramu E.I. 2006. *Early Physiological Responses of Arabidopsis thaliana Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects*. *New Phytologist*. 169 : 209 – 218
- Campbell, N.A. and Jane, B.R. 2008. *Biologi Edisi Delapan Jilid 2*. Erlangga, Jakarta. 439p

- Carling, D. E., Pope, E. J., Brainard, K. A. and Carter, D. A. 1999. Characterization of mycorrhiza isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathology*. 89 : 942 – 946.
- Darmono, D. W. 2003. *Merawat Cattleya*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Damayanti, F. 2010. Peningkatan Ketahanan Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L) Hasil Kultur Jaringan Terhadap Penyakit Layu Fusarium Melalui Seleksi Asam Fusarat. *Jurnal Ilmiah Fakor Exacta*. 3 (4): 310-319
- Direktorat Perlindungan Hortikultura (Ditlinhorti). 2013. *OPT Anggrek*. <http://ditlin.hortikultura.pertanian.go.id/>. Diakses 15 Februari 2021
- Fatmawati, U., Suranto, S. dan Sajidan, S. 2019. Protein expression on Cr resistant microorganism using electrophoresis method. *Nusantara Bioscience*. 1(1): 31–37
- Fauziah, L. 2008. *Studi Dimerisasi Asam*. FMIPA. Universita Indonesia. Depok.
- Fitriiningrum, R. dan Susilowati, A. R. I. 2013. Analisis kandungan karbohidrat pada berbagai tingkat kematangan buah karika (*Carica pubescens*) di Kejajar dan Sembungan, Dataran Tinggi Dieng, Jawa Tengah. *Bioteknologi*. 10(1): 6–14.
- Grabski, A and Burgess, R.R. 2000. Preparation of sampler SDS-polyacrilamide gel electrophoresis : Procedures and tips. *Novations*. 13: 10–12
- Groenewald, S. 2006. Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense. University of Pretoria etd. Disertasi. Tidak dipublikasikan
- Gunawan, L.W. 1997. *Teknik Kultur Jaringan*. Laboratorium Kultur Jaringan Tanaman. PAU Bioteknologi IPB Bogor. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Bogor. 396p
- Hadanu, R. 2019. *Kimia Organik (Pengantar, Sifat, Struktur Molekul, Tata Nama, Reaksi, Sintesis, dan Kegunaan)*. Penertbit Leisyah. Makasar
- Hapsari, A.M., Masfria. dan Aminah, D. 2018. Pengujian Total Fenol Ekstrak Etanol Tempuyung (*Shoncus arvenis*). *TM Conference Series*. 01: 284-290
- Hutapea, C. B. R. dan Sitorus, R. E. (2017). Studi Teknik Produksi Gula Reduksi Dari Limbah Kulit Buah Kopi. *Institute Teknologi Sepuluh*

Nopember Surabaya.

- Hwang, B. and Kook. 1995. *Effects of Age-Related Resistance and Metalaxyl on Capsidiol Production in Pepper Plants Infected with Phytophthora capsici in Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Iswanto, H. 2002. *Petunjuk Perawatan Anggrek*. Agro Media Putri. Jakarta.
- Iswanto, H. 2010. *Petunjuk Praktis Merawat Anggrek*. Agromedia pustaka. Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-dasar Biokimia*. Erlangga. Jakarta.
- Lestari, S. 2002. *Mengenal dan Bertanam Anggrek*. Aneka Ilmu. Semarang. 68p
- Litbang Pertanian. 2015. *Kuning Ungu Percantik Tanaman*. <http://www.litbang.pertanian.go.id/berita/one/2102/>. 2021
- Machsun, I. R., dan Zulaika, E. 2017. Profil Protein Bakteri Ureolitik. *Jurnal Sains Dan Seni ITS*. 6(2): 2–4.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Printed In USA
- Noviantia, R. A., Nurcahyani, E., dan Lande, M. L. 2017. Uji Ketahanan Planlet Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) Hasil Seleksi dengan Asam Salisilat Terhadap *Fusarium oxysporum* Secara *In Vitro*. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. 17(2): 132–137
- Nowakowski, A. B., William, J. W. and David, H. P. 2014. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomisc*, 6 (5): 1068–1078
- Nugraheni, E. S. 2010. Karakterisasi Biologi Isolat- isolat *Fusarium* sp. pada Tanaman Cabai Merah (*Capsicum annuum* L.) Asal Boyolali. Universitas Sebelas Maret. Skripsi. Tidak dipublikasikan.
- Nugroho A. 2000. *Pedoman Pelaksanaan Kultur Jaringan*. Penebar Swadaya. Jakarta
- Nurcahyani, E., Sumardi, I., Hadisutrisno, B. dan Suharyanto, E. 2012. Penekanan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika. JHPTT*. 12 (1): 12-22
- Nurcahyani, E., Hadisutrisno, B., Sumardi, I. dan Suharyanto, E. 2014.

- Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM pp 272- 279.
- Nurchayani, E., Agustina, R. and Handayani, T. T. 2016. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Sciences* 2016; 4(5): 102-105
- Nurchayani, E., Qudus, H. I. and Evlin, F. 2021. Analysis of The Reducing Sugar of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Mutant Plantlets Resistant to Fusarium Wilt. AIP Conference Proceedings 2331, 050010 (2021): 050010-1 – 050010-4
- Nurchayani, E., Sholekhah, Sumardi and Qudus, H. I. 2021. Analysis of Total Carbohydrate and Chlorophyll Content of The Orchid Plantlet [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.] Resistant Fusarium Wilt Disease. *Journal of Physics: Conference Series*. 1751 012061 (2021) : 1-5
- Nuryani, W., Yusuf, S., Hanudin, E., Djatnika, I. dan Marwoto, B. 2012. Kemangkasan biobakterisida terhadap penyakit busuk lunak (*Pseudomonas viridiflava*) pada Phalaenopsis. *Jurnal Hortikultura*. 22(4) : 392-399
- Pizzaro, S.A., Lane, P., Lane, T. D. and Cruz, E. 2007. Bacterial Characterization using Protein Profiling in a Microchip Separations Platform. *Electrophoresis*. 28 (24): 4697–4704
- Pujiati, C. dan Novi, P. 2016. Analisis Kadar Gula Reduksi pada Fermentasi Kacang Gude (*Cajanus cajan*) oleh *Aspergillus niger* . *Proceeding Biology Education Conference*. 13 (1): 832 - 835
- Putri, A. R. 2017. Karakterisasi Planlet Anggrek *Cattleya* sp. Hasil Induksi Asam Salisilat Dan Inokulasi Mikoriza (*Rhizoctonia* sp) Secara In Vitro. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Lampung. [Skripsi]
- Putri, O. S.D., Ika R.S. dan Syamsuddin, D. 2014. Pengaruh Metode Inokulasi Jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*(sacc.) Terhadap Kejadian Penyakit Layu *Fusarium* pada Tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Jurnal HP*. 2: 2338 – 4336.
- Quing and Hongwen C. 2002. Application of Induced Resistance in Cucumber Disease Control. *Cucurbit Genetics Cooperative*. 25: 11-13
- Rahmatia, D. dan Pitriana, P. 2007. *Pengayaan Seri Flora dan Fauna 'Bunga*

- Anggrek'*. Ganesha Ecxact. Jakarta.
- Rantam, F. A. 2003. *Metode Immunologi*. Airlangga University Press. Surabaya.
- Razak, A. R., Sumarni, N. K., dan Rahmat, B. 2012. Optimalisasi hidrolisis sukrosa menggunakan resin penukar kation tipe sulfonat. *Jurnal Natural Science Desember*. 1(1): 119–131.
- Sandra, E. 2003 *Membuat Anggrek Rajin Berbunga*. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sandy, N. J., Nurhidayati, T. dan Purwani, K.I. 2015. Profil Protein Tanaman Kiambang (*Salvinia molesta*) Yang Dikultur Pada Media Modifikasi Air Lumpur Sidoarjo. *Institut Teknologi Sepuluh November*. Surabaya
- Sarwono, B. 2002. *Mengenal dan Membuat Anggrek Hibrida*. Agro Media Pustaka. Depok.
- Semangun, H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. UGM Press. Yogyakarta. 754 p.
- Senet, M. R. M., Raharja, I. G. M. A. P., Darma, I. K. T., Prastakarini, K. T., Dewi, N. M. A. dan Parwata, I. M. O. A. 2018. Peenentuan Kandungan Total Flavonoid Dan Total Fenol dari Akar Kersen (*Muntingia calabura*) Serta Aktivitasnya Sebagai Antioksidan. *Jurnal Kimia*. 13.
- Septiani, K. A., Parwata, N. O. A. dan Putra, I. A. A. B. 2018. Penentuan Kadar Total Fenol, Kadar Total Flavonoid Dan Skrining Fitokimia Ekastrak Etanol Daun Gaharu (*Gyrinops versteegii*). *Jurnal Matematika*. 12(1): 78–89.
- Soelistijono. 2015. Kajian Efektifitas *Rhizoctonia* sp Mikoriza Dataran Rendah dan Sedang pada Tingkat Keparahan Penyakit (Dsi) Anggrek *Phalaenopsis amabilis* terhadap *Fusarium* sp. *Biosaintifika*. 7 (2).
- Sujatmiko, B., Sulistyaningsih, E., dan Murti, R. H. 2012. Studi Ketahanan Melon (*Cucumis melo* L) Terhadap Layu Fusarium Secara *In-Vitro* Dan Kaitannya dengan Asam Salisilat. *Ilmu Pertanian*. 15(2): 1 – 18
- Sukmadjaja D, Mariska I, Lestari E.G, Tombe M dan Kosmiatin M. 2003. Pengujian planlet abaka hasil seleksi terhadap F. Oxysporum. *Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman*. Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian. Bogor. Pp 302-307
- Sukmadjaja, D., Purnamaningsih, R. dan Priyatno, T. P. 2013. Seleksi *In Vitro* dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning untuk Ketahanan terhadap Penyakit Layu Fusarium. *Jurnal AgroBiogen*. 9(2): 66-76

- Soesanto, L. 2008. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Soeryowinoto, S. M. 2006. *Merawat Anggrek Cetakan 26*. Kanisius. Yogyakarta. 87p
- Son, S.W., Kim, H. Y., Cho, G.J., Lim, H. K., Jang, K. S., Lee, S.O., Lee, S., Sung, N. D. and Kim, J.C. 2007. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Microbiology*. 104 (2008): 692 -698
- Tropp, B. E. 2012. *Molecular Biology Fourth Edition : Genes to Proteins*. New York: Jones and Bartlett Learning.
- Tuhuteru, S., Hehanusa, M. L. dan Raharjo, S.H.T. 2012. Pertumbuhan dan Perkembangan Anggrek *Dendrobium anosmum* Pada Media Kultur In Vitro Dengan Beberapa Konsentrasi Air Kelapa. *Agrologia*, Vol. 1 (1), April 2012, Hal. 1-12
- Van Loon L. C., Baker, P. A. H. M. and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic Resistance Induced by Rhizosphere Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36: 453-458
- Vidhyasekaran, P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defense mechanism*. Marcel Dekker. New York. 553 p
- Wahyuni, E. T., Dewi, S., Raharjo, S., Siswanta, D. 2019. Kajian Metode foto-Fenton untuk Penurunan Konsentrasi Ion Logam Berat Pb(II) dan Cu(II) dalam Larutan Secara Simultan dan Sinergi. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 22 (5): 192-199
- Wedge, D.E. and Elmer, W.H. 2008. *Fusarium Wilt of Orchids*. *ICOGO Bull.* 2 (3): 161-168.
- Widyas. 2009. *Analisis Risiko Anggrek Phalaenopsis pada PT Ekakarya Graha Flora di Cikampek, Jawa Barat*. Fakultas Ekonomi dan Manajemen, Institut Pertanian Bogor. Bogor. [Skripsi].
- Wilberta, N., Sonya, N. T. dan Lydia, S. H. R. 2021. Analisis Kandungan Gula Reduksi Pada Gula Semut Dari Nira Aren Yang Dipengaruhi pH Dan Kadar Air. *BIOEDUKASI (Jurnal Pendidikan Biologi)*. 12(1): 101.
- Winarsih, S. 2007. Pengaruh bahan organik pada pertumbuhan *Gliocladium virens* dan daya antagonisnya terhadap *Fusarium oxysporum* secara in-vitro. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian Indonesia*. Edisi Khusus, No. 3: 386 – 390.
- Wu, P. H., Huang, D. D. and Chang, D. C. N. 2011. Mycorrhizal symbiosis

enhances *Phalaenopsis* orchid's growth and resistance to *Erwinia chrysanthemi*. *African J. Biotech.* 10:10095-10100.

Yasmin, Z. F., Aisyah, S. I. dan Sukma, D. 2018. Pembibitan (Kultur Jaringan hingga Pembesaran) Anggrek *Phalaenopsis* di Hasanudin Orchids, Jawa Timur. *Buletin Agrohorti.* 6(3): 430–439

Zulianti, F dan Zuraidah. 2022. Identifikasi Jenis Tumbuhan Anggrek di Kawasan Luthu Lamweu Kabupaten Aceh Besar. *Prosiding Seminar Nasional Biotik* (2022): 424 -431