



BUKU AJAR
INTERAKSI TUMBUHAN, LINGKUNGAN, DAN MIKROBA

ARIEF PAMBUDI

PROGRAM STUDI BIOLOGI (BIOTEKNOLOGI)
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS AL AZHAR INDONESIA
2025

SILIKON: STATUS, PERAN, MEKANISME UPTAKE DAN TRANSPORNYA

Status Silikon bagi tanaman

Silikon (Si) merupakan unsur mineral terbanyak kedua pada lapisan kerak bumi setelah oksigen. Namun meskipun merupakan unsur yang berlimpah di tanah, sebagian besar Si di tanah berada dalam bentuk aluminosilikat yang tidak larut sehingga tidak dapat diserap secara langsung oleh tanaman (Epstein 1994; Liang *et al.* 2015). Tanaman dapat menyerap Si dalam bentuk molekul monomer netral berupa asam orthosilikat $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ pada medium dengan nilai pH dibawah 9 (Ma *et. al* 2001; Ma & Yamaji 2006). Diketahui pula, kandungan Si terlarut dalam tanah adalah pada kisaran 0,1-0,6 mM (Epstein 1999).

Pada jaringan tanaman, Si memiliki kisaran yang bervariasi pada kisaran 0,1-10% dari berat kering. Nilai ini bahkan diatas konsentrasi keseluruhan unsur hara makro esensial yang tertinggi pada unsur K dengan konsentrasi maksimal sebesar 8% dari berat kering (Tabel 1). Kandungan Si yang tinggi ini menjadi kontroversi dan perdebatan panjang, masuk dalam kategori apa unsur ini sebagai nutrisi tumbuhan (esensial, benefisial, atau toksik). Di satu sisi, rasio konsentrasi Si pada jaringan tanaman yang tinggi dibandingkan unsur lain, terpenuhinya kinetika Michaelis Menten dalam proses serapan Si, dan ditemukannya bukti kandungan anorganik Si pada tajuk memberikan kekuatan bahwa bisa jadi Si merupakan unsur esensial (Epstein 2009). Di sisi lain, beberapa peneliti tidak menganggap Si sebagai unsur yang tidak punya pengaruh dalam pertumbuhan karena kriteria yang dinyatakan Arnon & Stout (1939) mengenai hara esensial tidak dipenuhi.

Menurut Arnon & Stout (1939) suatu unsur dikategorikan sebagai unsur esensial jika (1) defisiensi unsur tersebut akan menyebabkan tanaman tidak mampu menyelesaikan siklus hidupnya, (2) defisiensi unsur tersebut menunjukkan gejala yang khas dan akan menjadi normal jika diberikan unsur tersebut, dan (3) unsur tersebut berhubungan dengan lintasan metabolisme normal, tidak hanya saat tanaman dalam keadaan tercekam. Melalui teknik hidroponik yang umum dilakukan dalam penelitian nutrisi tanaman, Si tidak pernah diperhitungkan masuk dalam komposisi larutan hara dan tidak pernah menunjukkan gejala defisiensi karena dengan kultur hara umumnya tanaman tidak mengalami cekaman. Hal yang berbeda jika penanaman dilakukan pada tanah. Takahashi *et al.* (1990) pernah mengusulkan Si sebagai senyawa esensial, dan Epstein (1999) menyatakan sebagai senyawa quasi-esensial, namun secara umum masih banyak yang meragukan Si sebagai unsur yang penting bagi tumbuhan. Akhir dari

perdebatan dan kontroversi ini pada tahun 2015 akhirnya International Plant Nutrition Institute (IPNI) memutuskan Si sebagai unsur dengan kategori beneficial.

Tabel 1. Unsur mineral pada jaringan tanaman (Epstein 1994)

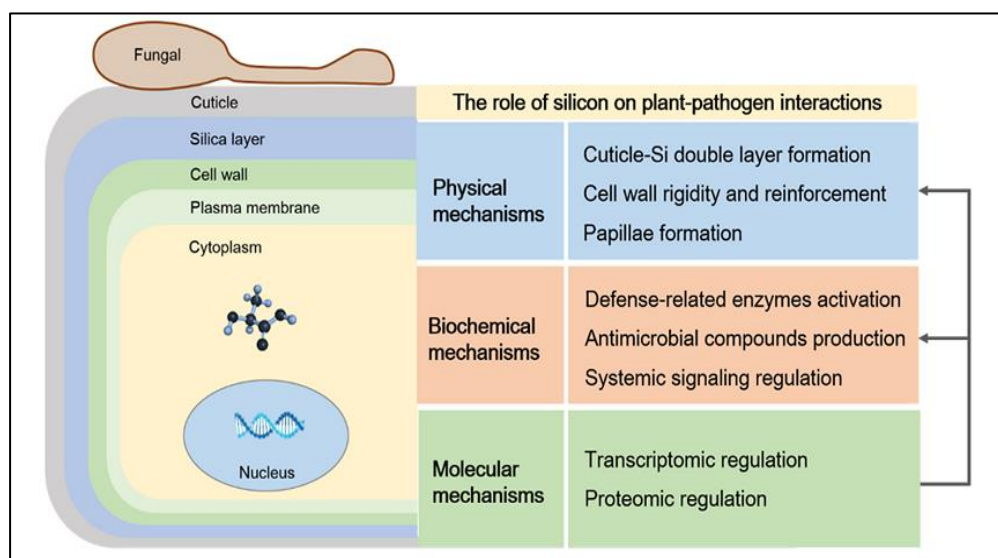
Element	Range of concentrations (dry weight basis)	Remarks
Nitrogen, %	0.5–6	Essential macronutrients
Phosphorus, %	0.15–0.5	
Sulfur, %	0.1–1.5	
Potassium, %	0.8–8	
Calcium, %	0.1–6	
Magnesium, %	0.05–1	
Iron, ppm	20–600	Essential micronutrients
Manganese, ppm	10–600	
Zinc, ppm	10–250	
Copper, ppm	2–50	
Nickel, ppm	0.05–5	
Boron, ppm	0.2–800	
Chlorine, ppm	10–80,000	
Molybdenum, ppm	0.1–10	
Cobalt, ppm	0.05–10	Essential in all nitrogen-fixing systems
Sodium, %	0.001–8	Essential for some plants; often beneficial
Silicon, %	0.1–10	
Aluminum, ppm	0.1–500	Not known to be essential; often toxic to plants on acid soils

Secara biologis, Si diketahui berperan dalam pertahanan tanaman terhadap cekaman baik biotik maupun abiotik (Ma 2004; Ma & Yamaji 2006; Liang 2008; Epstein 2009; Frew *et al.* 2018; Coskun *et al.* 2018). Tanaman dengan penambahan pasokan Si akan memiliki ketahanan lebih baik dari beberapa fungi dan bakteri patogen tular tanah seperti genus *Magnaporthe*, *Fusarium*, *Phytium*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* (Datnoff *et al.* 1997; Rodriguez *et al.* 2004; Fortunato *et al.* 2012a), serta serangga (Goussain *et al.* 2005; Ye *et al.* 2013). Sedangkan beberapa jenis pertahanan terhadap cekaman abiotik yang dipicu Si yang sudah dilaporkan direview oleh Coskun *et al.* (2018) antara lain radiasi, genangan, suhu, hipoksia, kekeringan, difisiensi nutrisi, logam berat.

Peran silikon bagi tanaman

Silikon mampu meningkatkan pertahanan tanaman dari berbagai cekaman baik biotik maupun abiotik dijelaskan melalui setidaknya 3 hipotesis (Wang *et al.* 2017) (Gambar 1). Hipotesis pertama yaitu pelindung fisik berupa penguatan dinding sel akibat terbentuknya lapisan kutikular ganda silika, penguatan selulosa dan membran sel, pembentukan papila, dan

pembentukan berbagai senyawa organik pada sel epidermis. Penguatan struktur sel ini akan mengakibatkan penghambatan penetrasi patogen akibat semakin sulit patogen melakukan degradasi enzimatik untuk menginvasi sel tanaman (Fauteux *et al.* 2005).



Gambar 1 Tiga hipotesis mekanisme peran silikon dalam peningkatan pertahanan pada tanaman (Wang *et al.* 2017).

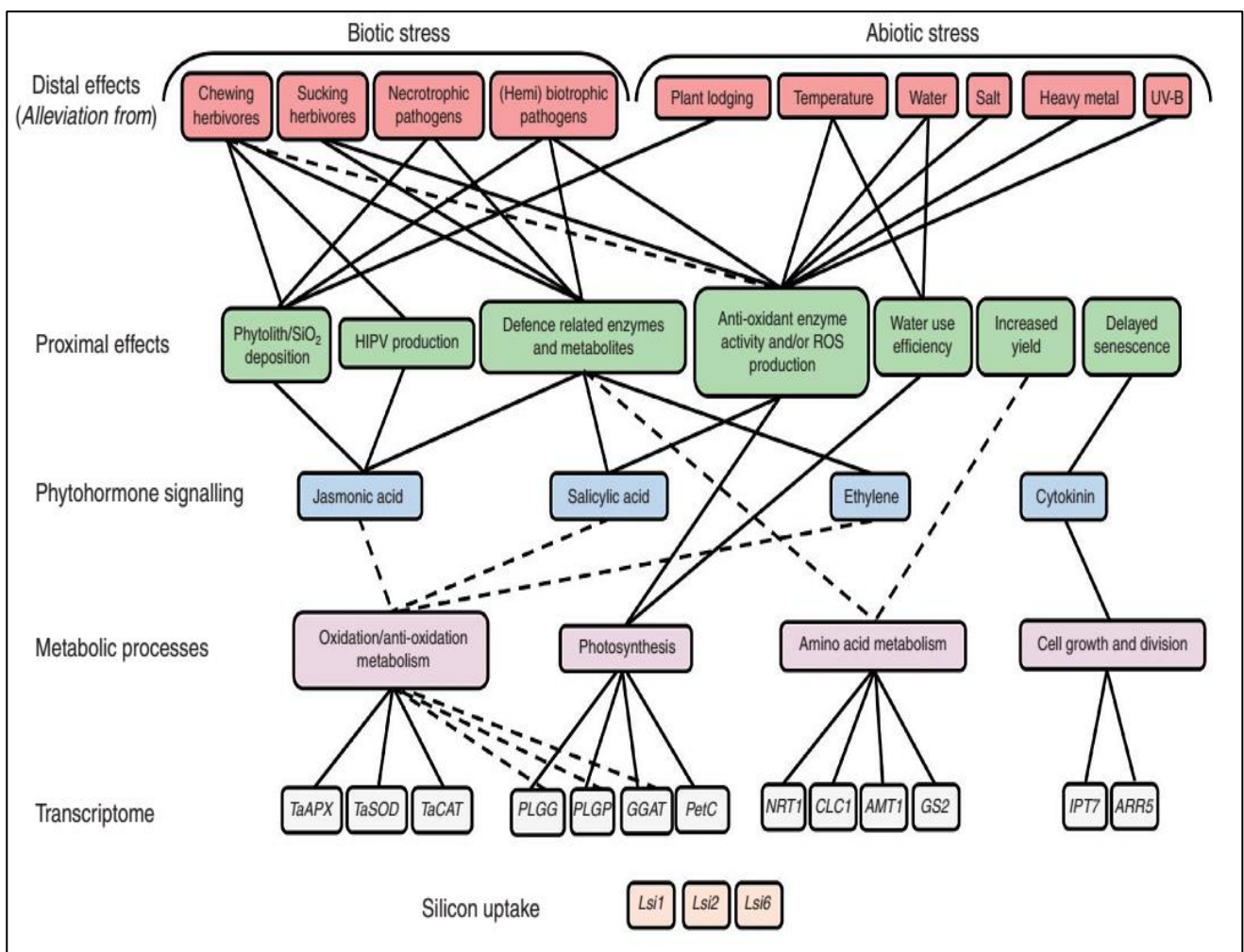
Hipotesis kedua yaitu mekanisme biokimiawi berupa peningkatan berbagai enzim pertahanan seperti polifenol oksidase, peroksidase glukonase, phenilalanin amonia lyase (Fortunato *et al.* 2012b), pembentukan senyawa-senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid (Fortunato *et al.* 2014), fitoaleksin (Rodriguez *et al.* 2004), maupun berbagai protein terkait pertahanan (Wang *et al.* 2017).

Tabel 2. Analisis sidik ragam dari beberapa parameter biokimiawi dan beberapa enzim penting pada pisang yang diberi perbedaan perlakuan Si, kultivar, dan waktu sampling yang sebagian besar menunjukkan hasil yang signifikan (Fortunato *et al.* 2012b)

Sources of variation	df	F values ^z								
		MDA	H ₂ O ₂	TSP	LTGA	PAL	PPO	POX	GLU	CHI
Silicon rate (Si)	1	0.41 ^{ns}	10.6*	22.75**	95.56**	25.54**	68.46**	30.33**	22.70**	27.47**
Cultivar (C)	1	17.38*	2.43 ^{ns}	5.77*	37.84**	0.44 ^{ns}	11.33*	2.36 ^{ns}	0.08 ^{ns}	2.12 ^{ns}
Sampling time (ST)	5	11.35*	2.42 ^{ns}	7.78*	5.35*	7.90**	0.88 ^{ns}	4.95*	1.06 ^{ns}	9.11**
Si × C	1	0.39 ^{ns}	0.01 ^{ns}	2.20 ^{ns}	15.35*	0.71 ^{ns}	1.01 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.77 ^{ns}
Si × ST	5	0.04 ^{ns}	0.00 ^{ns}	0.76 ^{ns}	0.09 ^{ns}	0.66 ^{ns}	0.80 ^{ns}	0.02 ^{ns}	0.77 ^{ns}	3.48 ^{ns}
C × ST	5	7.45*	0.13 ^{ns}	1.79 ^{ns}	3.33 ^{ns}	4.77*	16.83*	0.20 ^{ns}	0.33 ^{ns}	0.06 ^{ns}
Si × C × ST	5	0.26 ^{ns}	3.26 ^{ns}	0.88 ^{ns}	2.35 ^{ns}	0.75 ^{ns}	0.56 ^{ns}	0.54 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.68 ^{ns}

^z Levels of probability: ns = nonsignificant and * and ** = 0.05 and 0.01, respectively.

Hipotesis ketiga, yaitu mekanisme molekuler terkait proses *signalling* pembangkitan sistem pertahanan tanaman seperti banyak direview oleh Ma (2004); Epstein (2009); dan Frew *et al.* (2018). Tanaman akan merespon proses regulasi berbagai lintasan terkait fitohormon baik lintasan asam salisilat, asam jasmonat, etilen, maupun sitokinin. Mekanisme ketiga ini yang akan menyebabkan reaksi yang sifatnya sistemik pada tanaman. Tanaman yang berbeda dan bentuk cekaman yang berbeda akan memiliki pola lintasan yang khas. Perkembangan teknologi omics (transkriptomik, proteomik, hingga metabolomik), saat ini menjadi pendekatan baru untuk memperjelas peran silikon sebagai pemicu pertahanan tanaman terhadap berbagai cekaman. Berbagai bukti empiris masih perlu diperoleh untuk menjelaskan berbagai lintasan yang masih dalam tahap prediksi (Gambar 2).



Gambar 2 Hubungan jejaring lintasan peran Si terhadap berbagai cekaman. Garis putus-putus menunjukkan jalur yang masih diprediksi dan belum dibuktikan secara empiris (Frew *et al.* 2018).

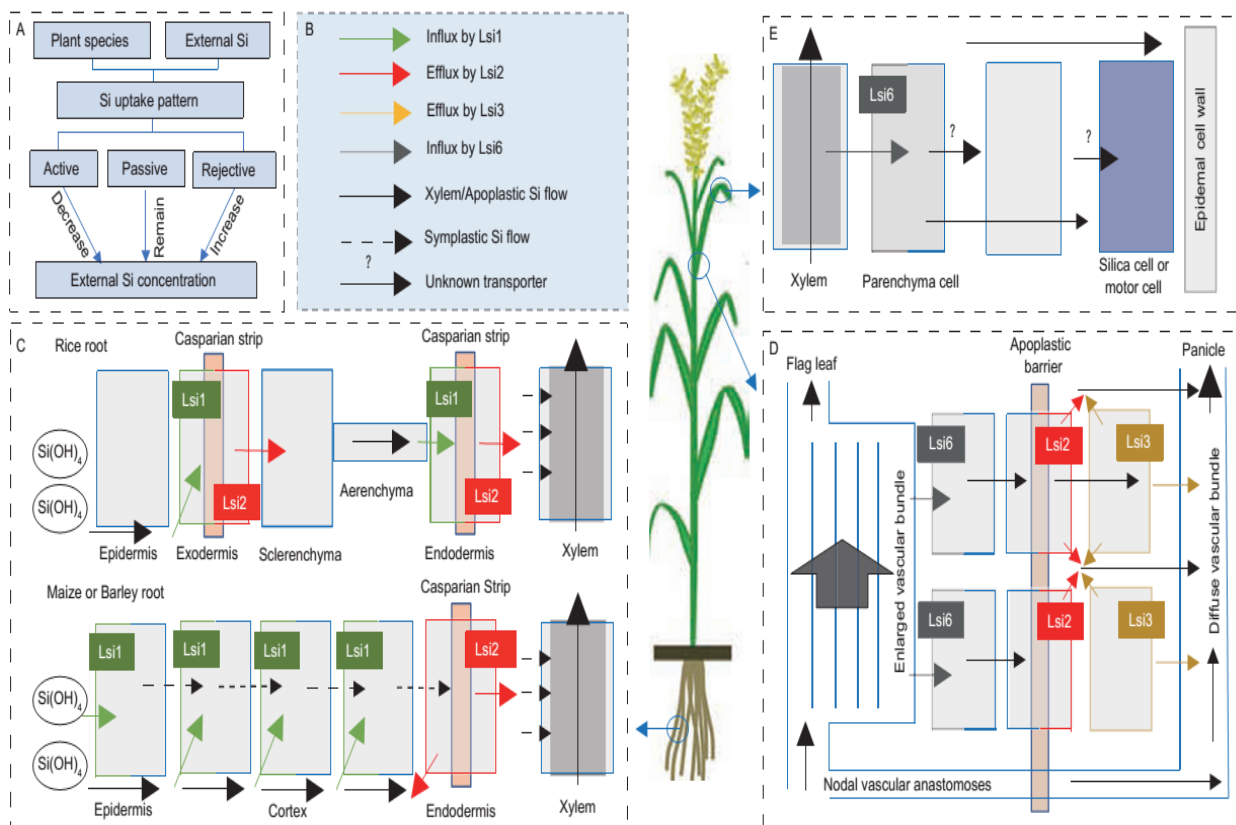
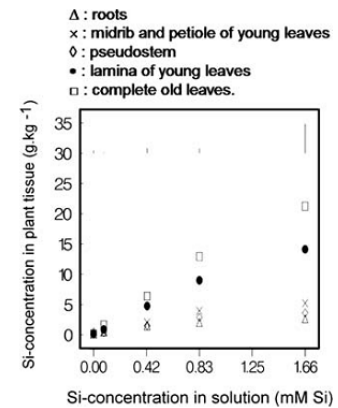
Mekanisme uptake dan transport silikon

Berbagai bukti bahwa beberapa tanaman mengalami deposisi silikon pada bagian tajuk pada beberapa tanaman menunjukkan bahwa ada kemungkinan Si diuptake secara aktif oleh tanaman. Coskun *et al.* (2018) mengelompokkan tanaman berdasarkan kemampuannya dalam mengakumulasi Si menjadi 3 kelompok, tanaman akumulator tinggi (mekanisme uptake aktif) jika kandungan Si tajuk berada pada kisaran 1,5-10% dari berat kering, tanaman akumulator menengah (mekanisme uptake pasif) jika kandungan Si tajuk pada kisaran 0,5-1,5% dari berat kering, dan tanaman akumulator rendah (mekanisme rejektif) jika kandungan Si tajuk kurang dari 0,2%.

Kelompok akumulator Si tinggi seperti famili Graminae melakukan transpor jarak dekat (dari eksternal ke xilem) melibatkan Si Transporter. Aktivitas pengambilan Si secara aktif ini dapat dihambat dengan metabolit inhibitor seperti NaCN, NaF, maupun 2,4-dinitrofenol (Liang *et al.* 2015). Si transporter (*Lsi*) pertama kali diidentifikasi (Ma *et al.* 2006) dan kemudian dikarakterisasi lebih lanjut juga pada tanaman padi (Ma & Yamaji 2015). Influx Si dari eksternal akar difasilitasi oleh *Lsi1* dan effluks dari endodermis akar menuju xilem melibatkan *Lsi2* sebagai transpor jarak dekat. Khusus pada padi, *Lsi2* juga terdapat dan memediasi effluks pada eksodermis. Selanjutnya Si akan mengalir melalui aliran xilem dengan tarikan transpirasi sebagai transpor jarak jauh. Selanjutnya saat unloading, pada bagian batang dan daun, effluks Si dari xilem melibatkan *Lsi6* dan transport menuju sink melibatkan *Lsi3*. Mekanisme effluks yang dimediasi *Lsi3* dan *Lsi6* merupakan transpor jarak dekat (Gambar 3). Pada tanaman pisang yang juga merupakan tanaman akumulator, mekanisme uptake dan transpor ini yang kemudian mampu menjelaskan mengapa akumulasi Si paling banyak di bagian daun dan petiol dewasa, disusul daun yang lebih muda, batang, dan paling rendah di akar (Henriet *et al.* 2006).

Tabel 2. Distribusi kandungan Si pada berbagai organ yang diberikan pasokan Si yang berbeda (Henriet et al. 2006).

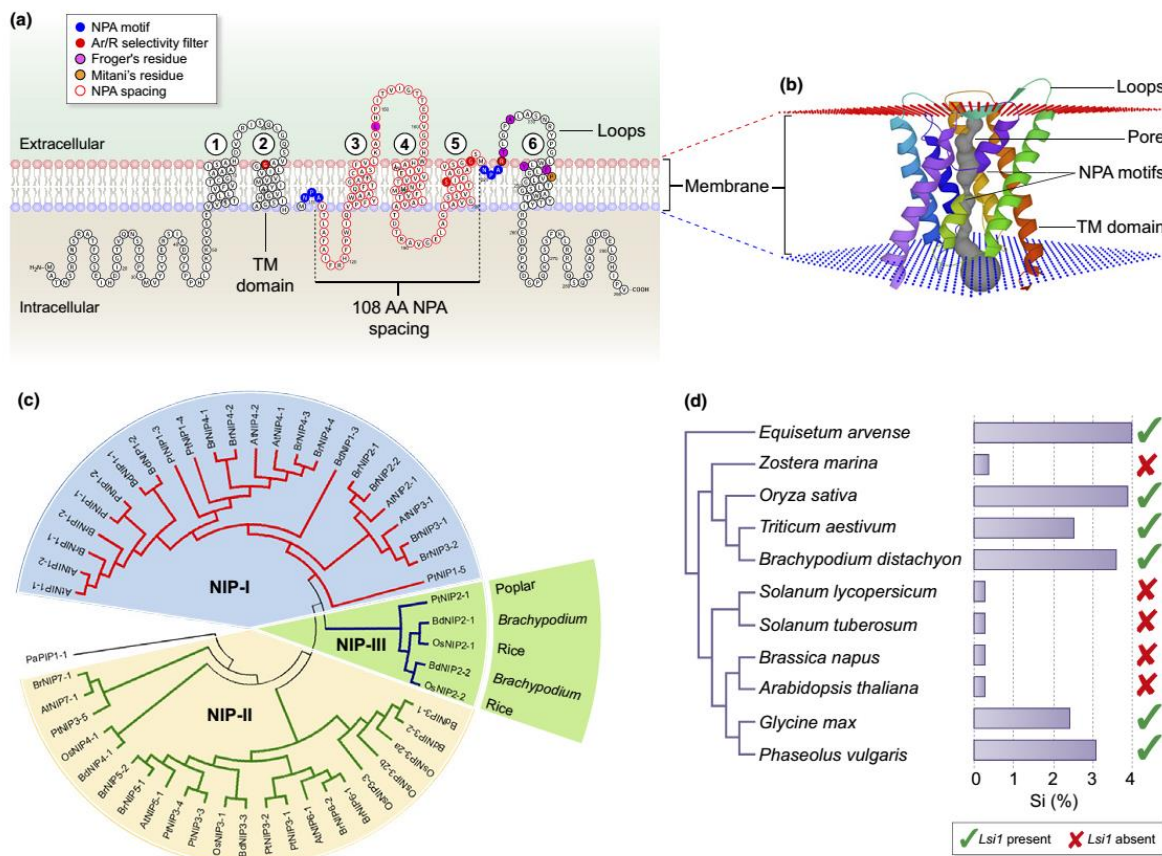
Si-conc. in nutrient solution (mM Si)	Si concentration (g kg ⁻¹ DM)					
	R	PS	y[P + M]	yLa	oLe	LSD
Grande Naine						
0	0.52	0.04	0.06	0.19	0.16	0.5
0.08	0.46	0.35	0.44	0.89	1.65	0.1
0.42	1.46	1.53	2.05	4.76	6.37	1.0
0.83	2.05	2.88	3.95	9.01	12.91	1.0
1.66	2.65	3.63	5.23	14.14	21.25	5.8
LSD ^a	0.45	0.35	0.36	0.81	6.56	
Banksii						
0.02	0.4	0.1	0.4	0.3	0.5	0.2
0.17	0.8	1.0	1.5	2.5	3.2	0.8
1.66	2.3	4.8	6.5	14.6	26.7	4.0
LSD	0.3	1.2	1.1	3.5	4.3	
Tani						
0.02	0.3	0.1	0.3	0.4	0.2	0.2
0.17	0.6	0.5	0.9	2.4	2.1	1.1
1.66	2.2	2.5	3.6	13.3	17.2	2.5
LSD	0.2	0.4	0.6	1.6	3.4	



Gambar 3 Model mekanisme uptake dan transpor Si pada beberapa tanaman famili Graminae (Ma & Yamaji 2015).

Gen yang berperan dalam transport silikon

Protein transporter Si (Lsi) disandikan oleh gen *Lsi* yang merupakan anggota superfamili MIP (Major Intrinsic Protein, yang juga dikenal sebagai Aquaporin, AQP). Secara struktur, AQP berbentuk seperti jam pasir dengan 6 domain transmembran. Transporter ini pada umumnya merupakan transporter air, namun beberapa molekul kecil juga bersifat permeabel. Motif yang spesifik mampu melalukan Si (membuat Si permeabel) pada Lsi terdapat pada 2 domain NPA (asparagin-prolin-alanin). Motif NPA ini terkonservasi. Analisis lebih lanjut pada motif NPA pada Lsi yang dimiliki dikotil dan monokotil menunjukkan bahwa tanaman yang bersifat akumulator tinggi terhadap Si spesifik tergolong dalam subfamili NIP-III. Sehingga dapat disimpulkan, bahwa tanaman yang bersifat akumulator memiliki Lsi dengan tipe NIP-III (Gambar 4). Lsi dengan tipe NIP-I dan NIP-II tidak dapat menguptake Si sebagaimana NIP-III.



Gambar 4 Struktur asam amino dan struktur protein Lsi1 beserta hubungan kekerabatannya antar tanaman yang berbeda (Coskun *et al.* 2018).

Daftar Pustaka

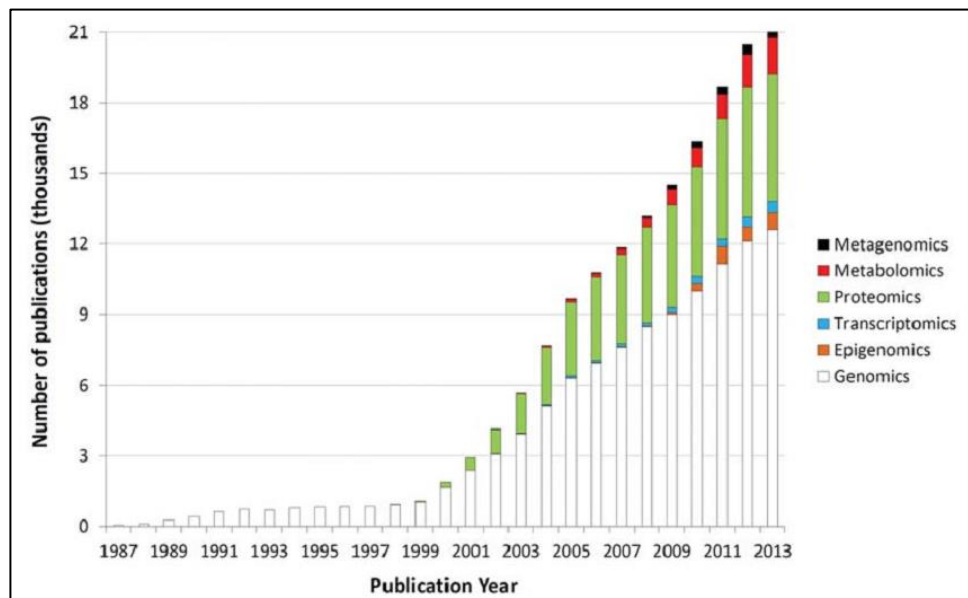
- Arnon DI, Stout PR. 1939. The essentiality of certain elements in minute quantity for plants, with special reference to copper. *Plant Physiol* 14: 371–375.
- Coskun D, Deshmukh R, Sonah H, Menzies JG, Reynolds O, Ma JF, Kronzucker HJ, Belanger RR. 2018. The controversies of silicon's role in plant biology. *New Phytologist* 1-19. doi: 10.1111/nph.15343
- Datnoff LE, Deren CW, Snyder GH. 1997. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. *Crop Protect* 16: 525-531.
- Epstein E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. *PNAS* 91: 11–17.
- Epstein E. 1999. Silicon. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50(1): 641–664. doi:10.1146/annurev.arplant.50.1.641
- Epstein E. 2009. Silicon: its manifold roles in plants. *Annals Appl Biol* 155: 155–160.
- Fauteux F, Remus-Borel W, Menzies JG, Belanger RR. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 1–6. doi: 10.1016/j.femsle.2005.06.034
- Fortunato AA, Rodrigues F, Baroni JCP, Soares GCB, Rodriguez MAD, Pereira OL. 2012a. Silicon suppresses *Fusarium* wilt development in banana plants. *J. Phytopathol.* 160, 674–679. doi: 10.1111/jph.12005
- Fortunato AA, Rodrigues FA, Nascimento KJT. 2012b. Physiological and biochemical aspects of the resistance of banana plants to *Fusarium* wilt potentiated by silicon. *Phytopathology* 102:957-966.
- Fortunato AA, Silva WL, Rodrigues FA. 2014. Phenylpropanoid Pathway Is Potentiated by Silicon in the Roots of Banana Plants During the Infection Process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 104 (6): 597-603.
- Frew A, Weston LA, Reynolds OL, Gurr GM. 2018. The role of silicon in plant biology: a paradigm shift in research approaches. *Annals Bot* 121: 1265– 1273 doi: 10.1093/aob/mcy009
- Goussain MM, Prado E, Moraes JC. 2005. Effect of silicon applied to wheat plants on the biology and probing behaviour of the greenbug *Schizaphis graminum* (Rond.) (Hemiptera: Aphididae). *Neotropic Entomol* 34: 807–813.
- Henriet C, Draye X, Oppitz I, Swennen R, Delvaux B. 2006. Effects, distribution and uptake of silicon in banana (*Musa* spp.) under optimal conditions. *Plant Soil* 287:359-374
- Liang YC, Nikolic M, Belanger R, Gong HJ, Song AL. 2015. *Silicon in Agriculture: From Theory to Practice*. Dordrecht: Springer. DOI 10.1007/978-94-017-9978-2_1
- Ma JF. 2004. Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses. *Soil Sci Plant Nutr* 50(1): 11-18.
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M, Ishiguro M, Murata Y, Yano M. 2006. A silicon transporter in rice. *Nature* 440: 688–691.
- Ma JF, Yamaji N. 2006. Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci* 11(8): 392-397. DOI: 10.1016/j.tplants.2006.06.007
- Ma JF, Yamaji N. 2015. A cooperative system of silicon transport in plants. *Trends Plant Sci* 20, 435–442.
- Ma JF, Miyake Y, Takahashi E. 2001. Silicon as a beneficial element for crop plants di dalam Datnoff LE, Snyder GH, Korndorfer GH (editors). *Silicon in Agriculture*. Elsevier: New York. Pp 17–39. doi:10.1016/s0928-3420(01)80006-9
- Rodrigues FA, McNally DJ, Datnoff LE, Jones JB, Labbé C, Benhamou N, Menzie JG, Belanger RR. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopathology* 94, 177–183. doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.2.177
- Wang M, Gao LM, Dong SY, Sun YM, Shen QR, Guo SW. 2017. Role of silicon on plant-pathogen interactions. *Front Plant Sci* 8, 701:1-14.
- Ye M, Song Y, Long J, Wang R, Baerson SR, Pan Z, Zhu-Salzman K, Xie J, Cai K, Luo S, et al. 2013. Priming of jasmonate-mediated antiherbivore defence responses in rice by silicon. *PNAS* 110: E3631–E3639.

POLA EKSPRESI GEN TERKAIT FITOHORMON

PADA TANAMAN PISANG YANG DIINFEKSI *Fusarium oxysporum cubense* (FOC)

PENDAHULUAN

Tanaman sebagai organisme non-motil akan merespon interaksi dengan lingkungannya (baik respon positif maupun negatif) dalam bentuk orkestra molekul melibatkan proses *signalling* dan transduksi sinyal. Proses ini berlanjut dalam bentuk ekspresi berbagai gen dan akumulasi metabolit tertentu. Hasil akhir metabolit tertentu umumnya digunakan sebagai gambaran status kondisi suatu tanaman. Namun, untuk bisa mencapai tahapan hingga tanaman menghasilkan dan mengakumulasi metabolit tertentu, butuh waktu dan analisis yang cukup sensitif. Seringkali sensitivitas deteksi suatu senyawa metabolit menjadi masalah dalam analisis. Hanya metabolit-metabolit dalam jumlah yang cukup besar yang dapat terdeteksi. Dan dalam interaksi yang sifatnya negatif (tanaman-patogen misalnya), seringkali kondisi tanaman sudah terlalu berat dan tidak dapat diselamatkan begitu tergambar potret status yang diamati. Sehingga, cara untuk dapat memperoleh potret status suatu tanaman secara cepat dan tepat menjadi tantangan tersendiri. Pendekatan analisis Omics dan sistem biologi berkembang untuk mencoba menjawab masalah ini. Sehingga sejak 2 dekade belakangan, trend publikasi yang berkaitan dengan omics meningkat secara signifikan (Gambar 1).



Gambar 1 Trend jumlah publikasi yang berkaitan dengan Omics berdasarkan data Pubmed (Barnett 2015).

Salah satu interaksi antara tanaman dan patogen yang hingga saat ini masih belum tuntas dipelajari dan ditangani adalah antara tanaman pisang dengan *Fusarium*. *Fusarium oxysporum cubense* (Foc) merupakan patogen yang sangat penting dalam proses produksi pisang. Cendawan ini menjadi agen penyebab penyakit layu pada tanaman karena menghalangi aliran air dan hara pada xilem dari akar menuju tajuk. *Foc* Ras1 berhasil menghancurkan kultivar unggul pisang Gros Michel dari daerah asalnya (amerika latin) yang kemudian popularitas Gros Michel digantikan oleh Cavendish yang tahan terhadap *Foc* Ras1. Namun, saat ini keberadaan cavendish juga terancam oleh hasil evolusi *Foc* Ras1 yang dikenal dengan *Foc* Ras tropis 4 (*Foc* TR4). *Fusarium* menjadi patogen penting pada tanaman pisang karena cendawan ini memiliki beberapa jenis spora aseksual dengan karakter yang berbeda: mikrokonidia yang berukuran kecil dan mampu melakukan penetrasi dari bagian akar tanaman, makrokonidia berukuran lebih besar yang umumnya mengkolonisasi permukaan tanaman yang sudah mati, serta klamidospora dengan dinding tebal dan kuat yang mampu dorman di dalam tanah hingga kisaran 10 tahun (Ploetz 2000).

Pendekatan transkriptomik dalam mempelajari interaksi pisang-fusarium sudah mulai dipelajari sejak tahun 2012 dan masih terus terjadi pengembangan analisis hasil dari output transkriptomik hingga saat ini. Penelitian-penelitian transkriptomik pisang sebelumnya banyak memberikan informasi bahwa terjadi perubahan pada tingkat transkrip pada gen-gen terkait metabolisme fenilalanin, biosintesis fenilpropanoid, metabolisme asam lemak, gen terkait penguatan dinding sel, metabolisme karbon, metabolisme asam amino, transduksi sinyal terkait hormon, dan interaksi tanaman-patogen (Wang *et al.* 2012; Bai *et al.* 2013; Li *et al.* 2013). Penelitian-penelitian tersebut dilakukan pada tanaman pisang yang sensitif dan toleran Foc dan setidaknya 2 strain Foc, yaitu Foc Ras1 dan Ras TR4. Penelitian yang lebih baru (Li *et al.* 2019) mencoba melihat pola transkrip pada pisang sekaligus melihat korelasinya dengan pola transkrip Foc TR4 sebagai upaya lebih lanjut mempelajari interaksi antara patogen-inang. Analisis dual transcript merupakan analisis transkriptomik yang digunakan pada 1 sampel tanaman yang terinfeksi oleh Foc yang dianalisis dengan dua dataset reference sequence (refseq), baik dari pihak inang maupun patogen. Pendekatan ini diharapkan mampu menggali lebih jauh mekanisme interaksi inang-patogen baik mengenai mekanisme serangan patogen maupun mekanisme pertahanan inang.

TUJUAN

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah untuk memetakan profil ekspresi gen terkait hormon pada tanaman pisang 27 dan 51 jam pasca infeksi akar tanaman oleh Foc. Dari

penelitian ini diharapkan diketahui mekanisme signalling hormon tanaman dalam merespon infeksi yang terjadi.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman dan isolat. Pisang kultivar Nongke no 1 (NK) sebagai kultivar yang relatif toleran (namun tidak resisten) dan Baxi (BX) sebagai kultivar yang sensitif terhadap Foc TR4 hasil kultur jaringan berumur 90 hari digunakan sebagai bahan tanaman untuk infeksi. Strain Foc TR4 transgenik GFP digunakan sebagai agen infeksi.

Infeksi Tanaman Pisang. Pisang dinfeksi dengan blok PDA berisi Foc TR4-GFP berumur 4-5 hari dengan terlebih dahulu melukai epidermis pisang. Akar pisang sejauh 0,5 cm kemudian dibuat preparat untuk pengamatan kolonisasi patogen dalam jaringan. Pengamatan kolonisasi Foc dalam jaringan menggunakan mikroskop laser konfokal dengan filter GFP. Analisis signifikansi kolonisasi antar kedua kultivar pisang dianalisis dengan uji t-student.

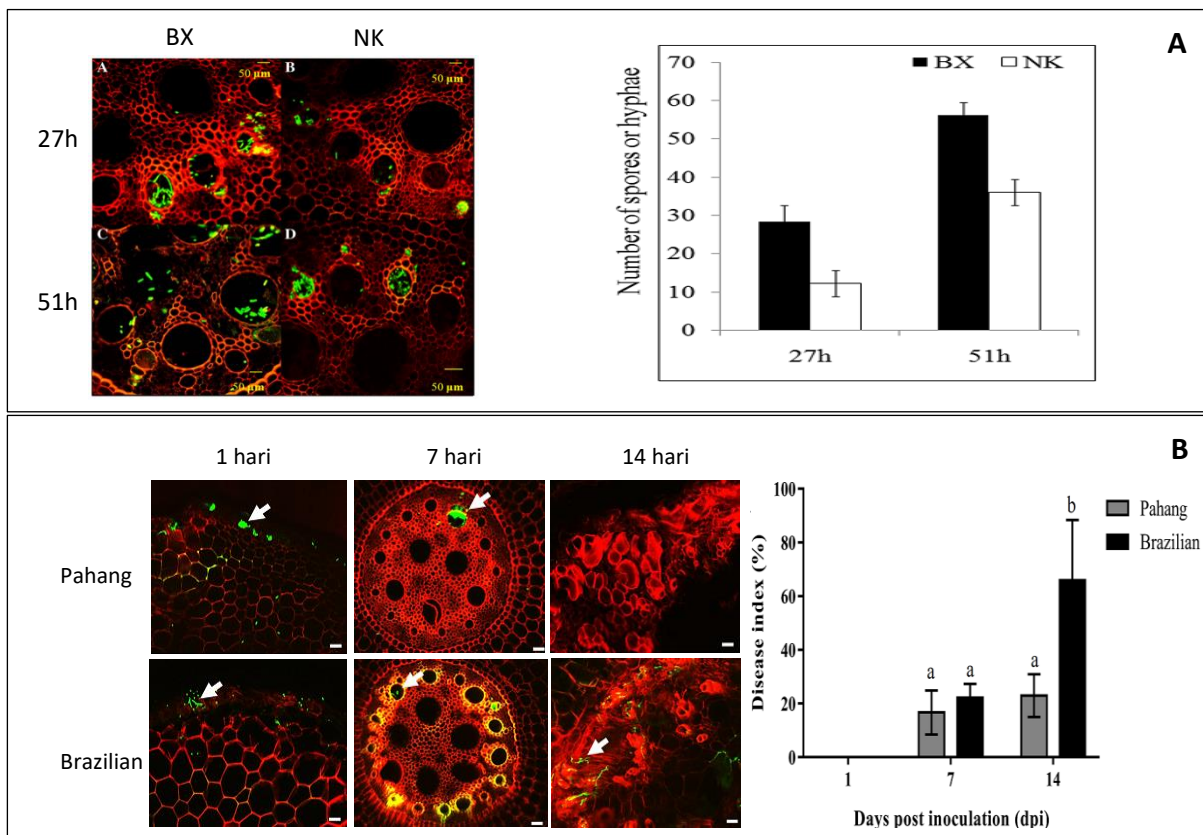
Isolasi RNA total dan RNA-seq. Sekitar 10 buah akar pisang dari tiap perlakuan digunakan sebagai sampel untuk isolasi RNA pada 2 waktu pengambilan sampel (27 dan 51 jam pasca infeksi). Isolasi 3 µg RNA dilakukan dengan RNA extraction kit (Omega, USA). Pembuatan RNA-seq library dilakukan dengan NEB Next Ultra RNA library kit for Illumina. Kualitas library dianalisis dengan Agilent Bioanalyzer. RNA library disekuen dengan platform Illumina Hi-Seq 2500.

Analisis Bioinformatika hasil RNA-seq. Output hasil RNA-seq dibersihkan dari sekuen-sekuen dengan kualitas rendah (singleton, uncalled base, dan kimera) dengan Bowtie dan TopHat, selanjutnya sekuen disejajarkan dengan refseq pisang dan Foc. Nilai Differentially Expressed Gene (DEG) diolah menggunakan CuffDiff. Analisis fungsional dilakukan dengan melakukan anotasi hasil sekuensing dengan BLASTx terhadap database NCBI NR (non redundant) protein, database KEGG, database COG, dan database Swiss-prot. Enrichment Gene Ontology (GO) hasil DEG dilakukan menggunakan GSeq R package pada program R.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kolonisasi Foc pada jaringan akar

Pengamatan histologi dan kelimpahan kolonisasi Foc pada kedua jenis kultivar menunjukkan perbedaan yang signifikan. NK sebagai tanaman yang relatif lebih tahan terhadap serangan Foc menunjukkan kolonisasi yang tidak sebanyak pada BX baik pada 27 maupun 51 jam pasca infeksi (Gambar 1). Hal ini membuktikan bahwa Foc lebih mudah melakukan penetrasi ke dalam sel BX dibandingkan NK. Hal yang sama dilaporkan oleh Zhang *et al.* (2019) yang mengamati 2 kultivar (resisten: Pahang; dan sensitif: Brazilian), bahwa tanaman yang sensitif mengalami penetrasi yang lebih jauh ke dalam jaringan dibandingkan kultivar resisten bahkan pada pengamatan yang lebih lama (hingga ke 14 hari pasca infeksi).



Gambar 1 Kolonisasi *Foc* pada kedua kultivar yang diujikan Li *et al.* (2019) (A) dan Zhang *et al.* (2019) (B).

Pola Transkriptomik Akar pada Masa Awal Infeksi

Pola umum untuk keseluruhan transkrip yang sudah diolah dengan CuffDiff menunjukkan bahwa tanaman yang lebih tahan menunjukkan nilai tingkat ekspresi yang berubah (DEG) yang lebih tinggi dibandingkan tanaman yang lebih sensitif pada 27 setelah infeksi (Tabel 1). Hal ini menjadi indikasi bahwa proses metabolisme yang terjadi pada tanaman yang lebih tahan mengalami perubahan yang lebih tinggi dibandingkan tanaman

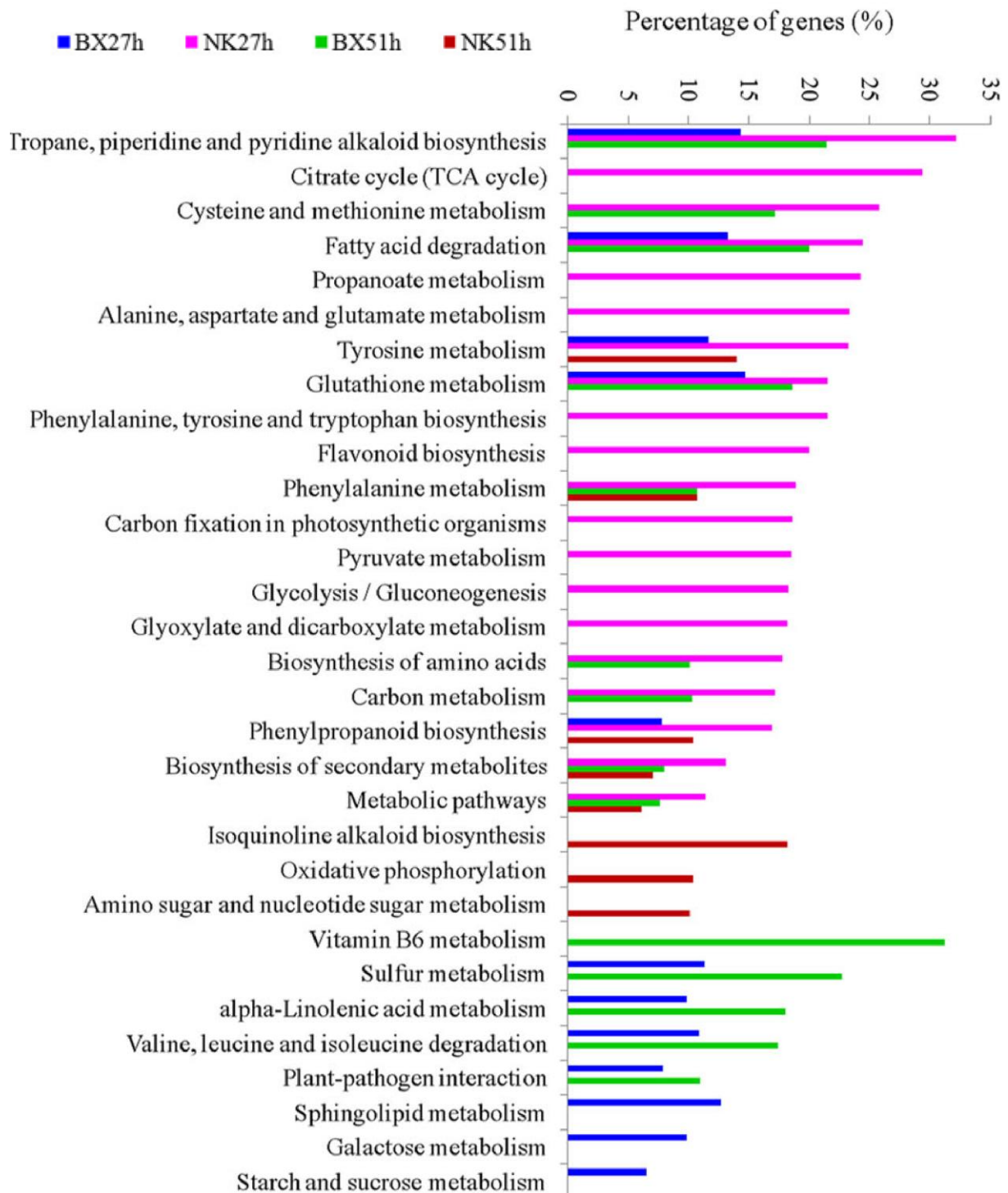
sensitif dalam merespon infeksi *Foc*. Respon tanaman tahan lebih cepat dibandingkan tanaman yang sensitif.

Tabel 1. Nilai total DEG pada tanaman pisang saat infeksi (Li *et al.* 2019)

Waktu (jam)	Jumlah DEG (gen)			
	Log 2 ^{BX/BX-MK}	Log 2 ^{NK/NK-MK}	Log 2 ^{NK/BX}	Log 2 ^{NK-MK/BX-MK}
27	1887	2322	744	1466
54	1906	2072	855	2565

Analisis Gene Ontology dan identifikasi peran lintasan metabolik (KEGG) pada kedua kultivar menunjukkan bahwa pada awal infeksi (27 jam pasca infeksi) persentase gen yang meningkat ekspresinya lebih banyak pada kultivar yang relatif tahan dibandingkan sensitif (Gambar 2). Pada 27 jam pasca infeksi, tanaman yang relatif tahan menunjukkan pola ekspresi meningkat signifikan pada 20 jenis lintasan metabolik sedangkan tanaman sensitif hanya mengalami peningkatan pada 11 jenis lintasan metaboliknya. Meskipun data ini hanya menghitung pada gen-gen yang mengalami peningkatan ekspresi diatas 2x lipat ($\text{Log } 2^{\text{inokulasi/mock}} \geq 1$). Hal ini menjadi bukti yang bahwa pada tanaman yang lebih tahan, sejak awal infeksi (27 jam) sudah terjadi *re-arrangement* dan regulasi berbagai gen merespon infeksi yang terjadi. Sebagian besar lintasan yang aktif berkaitan dengan konsevasi dan konsumsi energi (TCA, glikolisis dan glukoneogenesis, piruvat, metabolisme gliksilat, metabolisme propanoat, metabolisme karbon, metabolisme asam amino), biosintesis senyawa metabolit sekunder dan pertahanan (alkaloid, flavonoid, metabolisme fenilalanin, fenilpropanoid, metabolisme glutathion). Peningkatan biosintesis flavonoid juga dilaporkan oleh Zhang *et al.* (2019) pada tanaman pisang yang diinfeksi *Foc*.

Tanaman yang sensitif mengalami peningkatan metabolisme namun tidak sebanyak kultivar yang relatif tahan, dan tidak dominan pada mekanisme penghasilan energi, tetapi pada mekanisme pertahanan (biosintesis alkaloid, metabolisme glutathion dan tirosin, biosintesis fenilpropanoid, dan mekanisme interaksi tanaman-patogen). Zhang *et al.* (2019) juga melaporkan terjadi peningkatan secara signifikan lintasan interaksi tanaman-patogen saat *Foc* menginfeksi pisang meskipun Li *et al.* (2019) kenaikannya tidak terlalu tinggi. Penghasilan energi kemungkinan diperoleh dari pemecahan berbagai molekul simpanan seperti asam lemak, pati, dan galaktosa disamping metabolisme primer yang tetap terjadi dalam kadar yang normal (tidak meningkat diatas 2x lipat) .



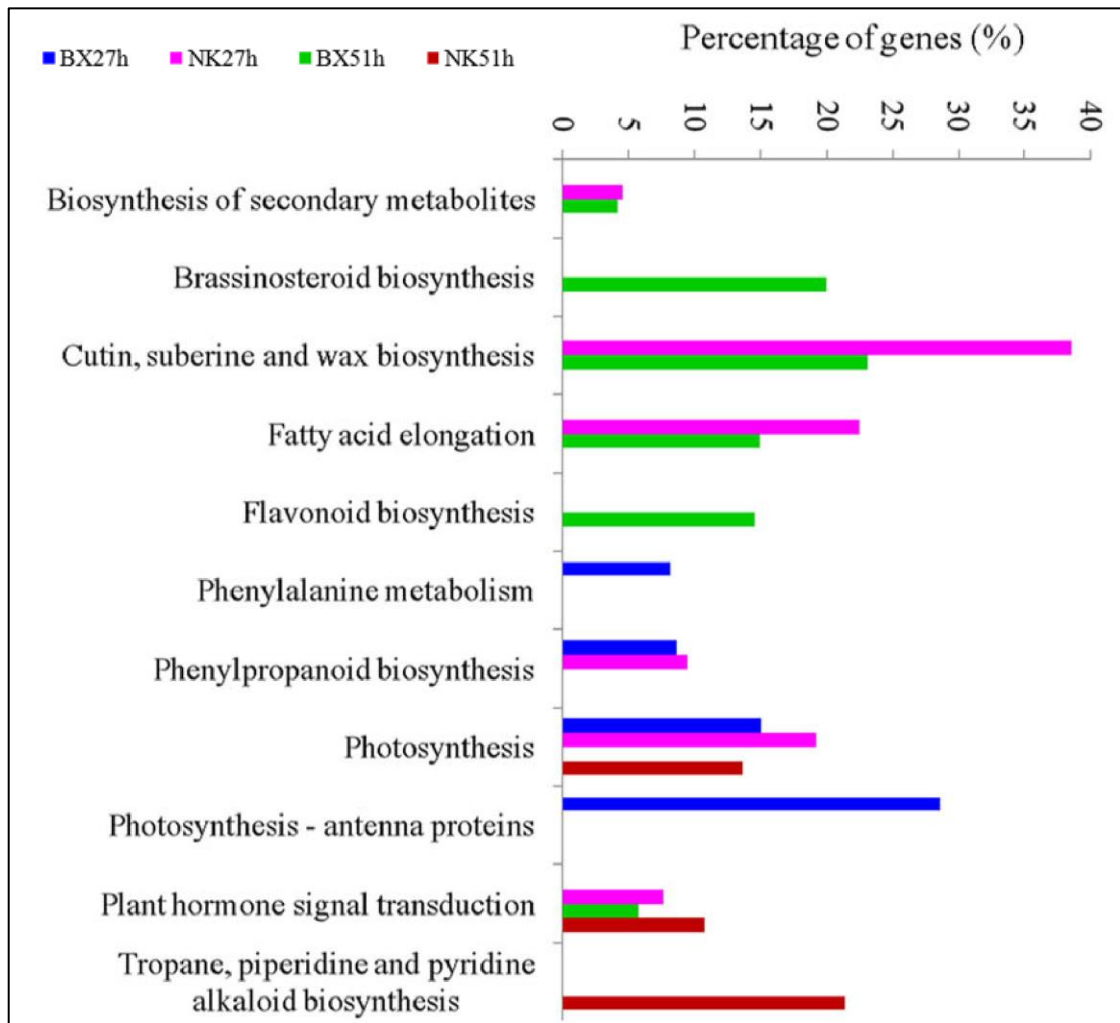
Gambar 2 Persentase gen dalam lintasan metabolik yang teridentifikasi dari aktivitas gen yang mengalami peningkatan ekspresi (*up-regulated* DGE) lebih dari 2x lipat antara tanaman yang diinokulasi *Foc* dibandingkan dengan mock (Li *et al.* 2019).

Pola proporsi ekspresi berubah saat memasuki tahap selanjutnya (54 jam pasca infeksi). Kultivar sensitif mengalami peningkatan pola ekspresi lebih tinggi (14 lintasan) dibandingkan tanaman relatif tahan (8 lintasan). Tanaman sensitif (BX) baru melakukan aktivitas penghasilan metabolit sekunder dan peningkatan interaksi tanaman-patogen setelah 54 jam pasca infeksi.

Sedangkan pada NK (relatif tahan) polanya masih ada yang sama seperti saat 27 jam, namun dengan mengurangi jumlah lintasan dan muncul lintasan baru dengan DEG tinggi yaitu yang berkaitan dengan fosforilasi oksidatif, metabolisme asam amino, lintasan terkait metabolisme sekunder masih berlangsung namun dengan tingkat ekspresi yang tidak sebanyak saat awal terjadi infeksi.

Analisis GO dari hasil KEGG untuk lintasan metabolik yang mengalami penurunan ekspresi (*down-regulated*) disajikan pada Gambar 3. Untuk kultivar yang relatif tahan (NK), pada awal infeksi terjadi penurunan secara signifikan pada lintasan akumulasi lemak permukaan (kutikula), pemanjangan asam lemak (karena terjadi peningkatan degradasi asam lemak), biosintesis fenilpropanoid (sebagian lintasan lagi meningkat), fotosintesis, beberapa transduksi sinyal terkait hormon, dan beberapa biosintesis senyawa metabolit sekunder. Untuk tanaman yang sensitif, penurunan jumlah DEG terjadi pada aktivitas reaksi terang fotosintesis dan efeknya pada proses fotosintesis dan beberapa jalur metabolisme sekunder. Hal yang menarik, saat sudah memasuki 54 jam pasca infeksi, tanaman sensitif mengalami penurunan biosintesis brasinosteroid hingga biosintesis flavonoid. Berbeda polanya dengan tanaman yang relatif tahan. Hal ini kemungkinan tanaman sudah kesulitan akibat merespon serangan yang mulai semakin parah. Karena pada awalnya tanaman tidak langsung merespon cepat dengan meningkatkan metabolisme dan menghasilkan energi, seiring dengan bertambahnya waktu dan serangan patogen, jumlah energi yang dimiliki tidak mencukupi kebutuhan yang seharusnya, sehingga beberapa lintasan yang sebenarnya penting dijalankan dalam kondisi yang minimalis atau bahkan dihentikan.

Berdasarkan pola ekspresi dan gambaran jalur metabolit yang dihasilkan, tanaman yang relatif tahan memiliki strategi dalam peningkatan aktivitas untuk menghasilkan energi pada tahap awal ekspresi, simultan dengan pengaktifan berbagai lintasan metabolisme sekunder sebagai upaya melawan infeksi saat awal proses kolonisasi patogen. Berbeda dengan tanaman yang tidak tahan yang berusaha menghadapi langsung patogen tanpa melakukan akumulasi energi dengan sudah melakukan degradasi bahan cadangan. Konservasi energi dan respon terhadap patogen sejak awal-awal infeksi sepertinya menjadi kunci dalam ketahanan tanaman menghadapi patogen.

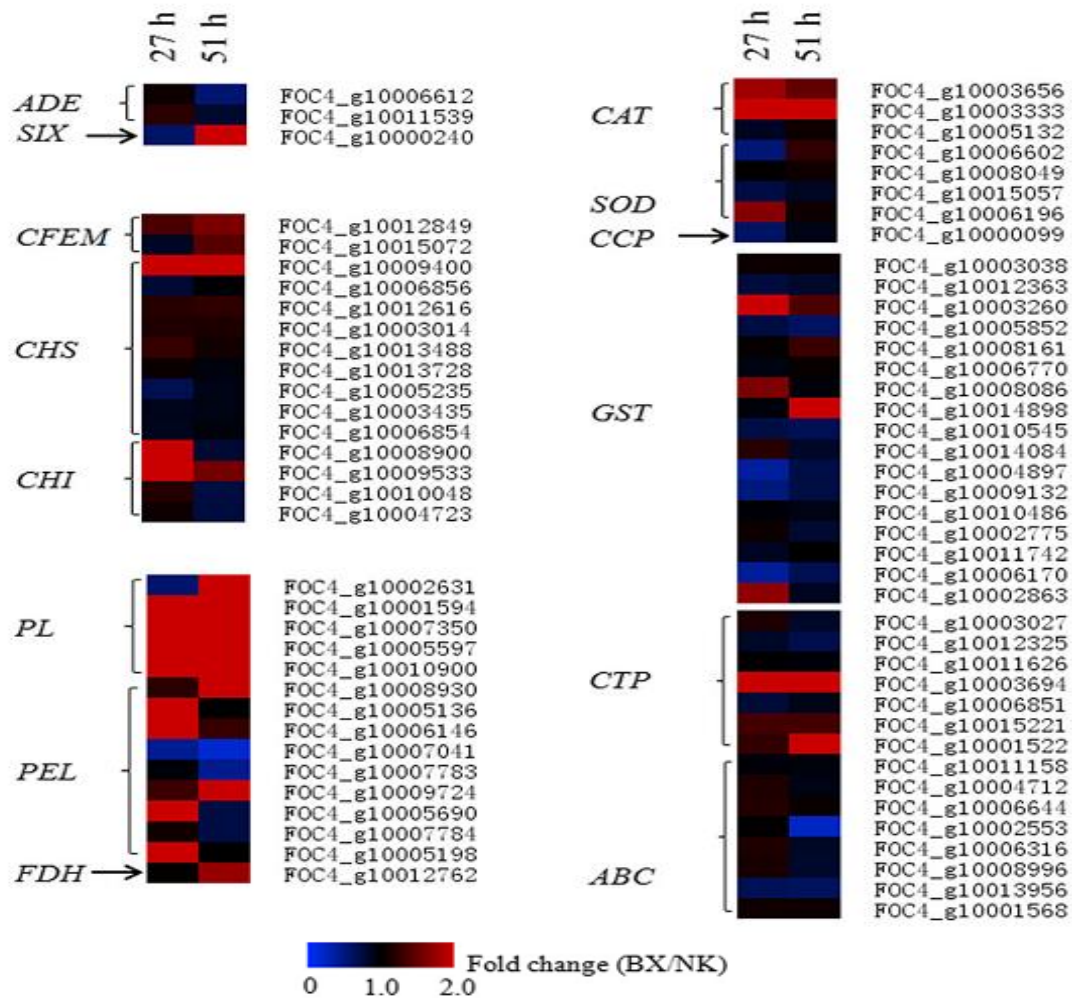


Gambar 3 Persentase gen dalam lintasan metabolik yang teridentifikasi dari aktivitas gen yang mengalami penurunan ekspresi (*down-regulated DGE*) lebih dari 2x lipat antara tanaman yang diinokulasi *Foc* dibandingkan dengan mock (Li *et al.* 2019).

Pola Ekspresi *Foc* saat Menginfeksi Pisang

Pola ekspresi *Foc* saat menginfeksi pisang pada 27 dan 54 jam pasca infeksi ditunjukkan pada Gambar 4. Setidaknya 7 gen mengalami peningkatan saat 27 jam pasca infeksi, antara lain kitinase, pektin lyase, pektat lyase, katalase, superoksida dismutase, glutathion S transferase, dan sitokrom P450. Pada masa awal infeksi, fungi melakukan proses lisis pada sel tanaman, sehingga peran beberapa enzim hidrolitik seperti kitinase, pektin dan pektat lyase menjadi penting saat fungi mencoba menginvasi inang (Niture *et al.* 2006). Beberapa enzim terkait ROS (katalase, superoksida dismutase) juga menjadi pertahanan fungi dalam menghadapi pertahanan tanaman. Memasuki 54 jam pasca infeksi, 4 gen yang masih mengalami peningkatan tingkat ekspresi, secreted in xylem protein (SIX), pektat lyase, glutathion S transferase, dan sitokrom P450. Gen SIX mengalami peningkatan menandakan

bahwa penetrasi fungsi sudah masuk ke jaringan xilem tanaman. SIX merupakan satu famili gen efektor pada *Foc* (Czislowski *et al.* 2017).



Gambar 4 Pola ekspresi gen pada fungi hasil RNA-seq (Li *et al.* 2019). ADE: Alcohol dehydrogenase transcriptional effector, SIX: Secreted in xylem protein; CFEM: CFEM domain-containing proteins, CHS: Chitin synthase, CHI: Chitinase, PL: Pectin lyase, PEL: Pectate lyase, FDH: Formate dehydrogenase, CAT: Catalase, SOD: Superoxide dismutase, CCP: Cytochrome c peroxidase, GST: Glutathione S-transferase, CTP: Cytochrome P450, ABC: ATP binding cassette superfamily.

Kesimpulan

1. Pendekatan transkriptomik dapat digunakan sebagai tools untuk menganalisis lebih detail mekanisme yang terjadi pada tanaman pasca infeksi patogen.
2. Kultivar yang relatif tahan lebih responsif dalam melakukan peningkatan metabolisme saat diinfeksi patogen dibandingkan kultivar sensitif.
3. Kultivar yang relatif tahan akan melakukan mekanisme pertahanan melalui peningkatan lintasan metabolik untuk menghasilkan energi lebih banyak, simultan dengan aktivasi mekanisme pertahanan.

4. Kultivar sensitif menghadapi serangan patogen dengan melakukan respon langsung pertahanan tanpa dengan laju lintasan metabolisme tidak setinggi kultivar yang relatif tahan.
5. *Foc* mengalami peningkatan ekspresi gen terkait aktivitas enzimatis dalam degradasi dinding sel tanaman (pektin dan pektat lyase, kitinase) juga beberapa gen terkait respon terhadap ROS pada awal infeksi, dan mulai mengeluarkan efektor berupa protein SIX seiring dengan bertambahnya waktu.

Daftar Pustaka

- Bai TT, Xie WB, Zhou PP, Wu ZL, Xiao WC, Zhou L, Sun J, Ruan XL, Li HP. 2013. Transcriptome and expression profile analysis of highly resistant and susceptible banana roots challenged with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *PLoS One*. 2013;8(9):e73945.
- Barnett M, Young W, Cooney J, Roy N. 2015. Metabolomics and Proteomics, and What to Do with All These 'Omics': Insights from Nutrigenomic Investigations in New Zealand. *J nutrigenetics nutrigenomics*. 7. 274-282. 10.1159/000381349.
- Czislowski E, Fraser-Smith S, Zander M, O'Neil WT, Meldrum RA, TranNguyen LTT, Batley J, Aiken EAB. 2017. Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene transfer. *Mol Plant Pathol* 19(5):1155–71.
- Li C, Shao J, Wang Y, Li W, Guo D, Yan B, Xia Y, Peng M. 2013. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics*. 14(851): 1 -16.
- Li W, Wang X, Li C, Sun J, Li S, Peng M. 2019. Dual species transcript profiling during the interaction between banana (*Musa acuminata*) and the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics* 20(1): 1-16. doi:10.1186/s12864-019-5902-z
- Niture SK, Kumar AR, Pant A. 2006. Role of glucose in production and repression of polygalacturonase and pectate lyase from phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme*, NCIM 1276. *World J Microb Biot* 22(9):893–9.
- Ploetz RC. 2000. Panama disease: a classic and destructive disease of banana. *Plant Health Progress* 65(3):18–22. <https://doi.org/10.1094/PHP-2000-1204-01-HM>
- Wang Z, Zhang J, Jia C, Liu J, Li Y, Yin X, Xu B, Jin Z. 2012. De novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* tropical race 4 infection. *BMC Genomics* 13:650
- Zhang L, Cenci A, Rouard M, Zhang D, Wang Y, Tang W, Zheng SJ. 2019. Transcriptomic analysis of resistant and susceptible banana corms in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. *Sci Rep* 9, 8199. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44637-x>

DINAMIKA EKSPRESI TANAMAN PISANG TERKAIT FITOHORMON

PASCA INFEKSI *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*)

PENDAHULUAN

Infeksi patogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), khususnya strain Tropical Race 4 (TR4) merupakan faktor pembatas penting pada produksi pisang. Patogen ini bersifat lethal pada beberapa kultivar komersial pisang seperti cavendish brazil (Baxi) yang secara statistik memberikan andil 45% bagi produksi pisang dunia (Ploetz 2015). Berbagai upaya dilakukan untuk mengatasi masalah infeksi *Foc*, namun semua masih berada pada tahapan penelitian yang belum dapat diterapkan untuk mengatasi masalah di lapangan. Salah satu pendekatan yang dilakukan adalah eksplorasi sifat ketahanan pisang dari spesies pisang liar dan turunannya (kerabatnya). Salah satu spesies yang menunjukkan resistensi terhadap infeksi *Foc* TR4 adalah *Musa yunnanensis* (Li *et al.* 2015).

Resistensi pisang terhadap infeksi *Foc* TR4 sudah mulai dilaporkan sejak tahun 1990an (Beckman 1990). Resistensi ditandai dengan deposisi produksi senyawa fenolik dan lignin, enzim-enzim terkait penguatan dinding sel (De Ascensao & Dubbery 2000; De Ascensao & Dubbery 2003), serta meningkatnya senyawa fenolik yang berasosiasi dengan dinding sel (van den Berg *et al.* 2007). Perkembangan teknologi NGS menambah pengetahuan mengenai berbagai gen yang meningkatkan kemampuan pertahanan pisang melalui regulasi dan *signalling* pada lintasan asam salisilat, asam jasmonat, dan etilen (Li *et al.* 2012; Wang *et al.* 2012; Li *et al.* 2013; Li *et al.* 2017; Li *et al.* 2019). Pemberian asam salisilat eksogen memberikan respon pada resistensi pisang sensitif (BX) terhadap infeksi *Foc* TR4 (Wang *et al.* 2015).

Kajian metabolomik pada pisang dalam ekspresinya terhadap infeksi *Foc* masih belum banyak dilaporkan. Analisis metabolomik dikonfirmasi dengan transkriptomik dan analisis ekspresi pada beberapa gen kunci pada jalur biosintesis fitohormon dapat membantu menerangkan mekanisme pertahanan pada tanaman pisang (sensitif dan toleran/resisten), khususnya akibat infeksi *Foc* TR4. Hal ini menjadi dasar dalam upaya mengontrol serangan *Foc* TR4 pada pisang.

TUJUAN

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah memotret respon pertahanan tanaman pisang terhadap infeksi *Foc* TR4 melalui pendekatan metabolomik, biokimiawi, dan konfirmasi dari aspek transkriptomik khususnya yang terkait dengan biosintesis fitohormon.

BAHAN DAN METODE

Bahan Tanaman dan isolat. Pisang subgrup cavendish, kultivar Baxi (BX) sebagai kultivar yang sensitif dan *Musa yunnanensis* (YN), kerabat pisang liar keturunan subspecies *Musa acuminata* sebagai kultivar resiten terhadap *Foc* TR4 hasil kultur jaringan berumur 90 hari digunakan sebagai bahan tanaman untuk infeksi. Strain *Foc* TR4 transgenik GFP digunakan sebagai agen infeksi.

Infeksi Tanaman Pisang. Pisang dinfeksi dengan blok PDA berisi *Foc* TR4-GFP berumur 4-5 hari dengan terlebih dahulu melukai epidermis pisang. Sebagai kontrol (mock) digunakan blok PDA tanpa kultur *Foc* TR4-GFP.

Analisis Metabolomik. Akar tanaman dari tiap perlakuan (infeksi dan mock) dari masing-masing 6 tanaman diambil secara bersamaan sebanyak kurang lebih 100 mg, kemudian digerus dengan bantuan N_2 cair kemudian diekstrak dengan 800 μ L metanol 70% (v/v) dan disonikasi selama 10 menit (Li *et al.* 2017). Selanjutnya sampel disentrifugasi 12000g selama 10 menit dan supernatan diambil untuk analisis. Analisis metabolomik menggunakan HPLC Q-TOF-MS (Agilent). Hasil mentah kromatografi cair diproses dengan Mass-Hunter Qualitative Analysis software dan identifikasi MS dilakukan dengan database metabolit METLIN.

Uji kandungan fitohormon dan fenol total. Isolasi asam salisilat dan metil jasmonat dilakukan dengan prosedur yang dipaparkan Yang *et al.* (2005) menggunakan LC-MS. Asam absisat, sitokinin, Auksin, dan Giberelin mengikuti Li *et al.* (2015) menggunakan LC-MS/MS. Fenol total diukur dengan spektrofotometri menggunakan metode Folin-Ciocalteu pada panjang gelombang 765 nm

Isolasi RNA total dan analisis ekspresi. Untuk keperluan qPCR, isolasi RNA pada 3 waktu pengambilan (3, 27, dan 51 jam pasca infeksi) dilakukan dengan CTAB (Ruan *et al.* 2011). Sintesis cDNA dilakukan pada 1,5 μ g RNA total dengan FastQuant RT kit. Reaksi qPCR dilakukan menggunakan beberapa gen terkait fitohormon dari database genom pisang. Nilai ekspresi relatif dihitung dengan persamaan $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen 2012) menggunakan kontrol internal β -actin dan GAPDH. Untuk transkriptomik, sekitar 10 buah

akar pisang dari tiap perlakuan digunakan sebagai sampel untuk isolasi RNA pada 2 waktu pengambilan sampel (27 dan 51 jam pasca infeksi). Isolasi 3 µg RNA dilakukan dengan RNA extraction kit (Omega, USA). Pembuatan RNA-seq library dilakukan dengan NEB Next Ultra RNA library kit for Illumina. Kualitas library dianalisis dengan Agilent Bioanalyzer. RNA library disekuen dengan platform Illumina Hi-Seq 2500 (Li *et al.* 2019).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis Metabolomik

Dinamika beberapa metabolit terkait fitohormon pada 3 waktu pengambilan sampel untuk 2 kultivar pisang yang diujikan disajikan pada Tabel 1. Data tersebut difilter dari data mentah berdasarkan kriteria perbedaan signifikan $P < 0.05$, dengan nilai $VIP > 1$. Terdapat 8 metabolit yang terdeteksi yang merupakan metabolit pada lintasan asam salisilat, (SA) (2 metabolit), lintasan jasmonat (JA) (2 metabolit), lintasan ABA (2 metabolit), sitokinin (1 metabolit), dan auksin (1 metabolit). Pada tanaman sensitif (BX) terlihat lintasan SA dan JA mengalami penghambatan pada awal infeksi dibandingkan dengan tanaman resisten. Tanaman sensitif baru mengalami peningkatan jumlah metabolik setelah 27 jam pasca infeksi. Pola ini berbeda dengan tanaman resisten yang sudah mengalami peningkatan mulai dari 3 jam pasca infeksi dan tetap meningkat selama proses infeksi.

ABA menunjukkan pola yang menurun pada awal infeksi baik pada tanaman sensitif maupun resisten, namun sedikit meningkat pada 27 jam pasca infeksi pada tanaman sensitif, dan justru menurun pada tanaman resisten selama proses infeksi. Sedangkan ABA glukosa ester kontras memiliki pola yang berbeda antara kedua kultivar (meningkat pada kultivar sensitif dan menurun pada kultivar resisten). Dari kedua kelas fitohormon (SA dan JA, dengan ABA) memiliki pola yang saling berkebalikan pada tanaman resisten.

Tabel 1 Metabolit terkait fitohormon yang terdeteksi oleh LC Q-TOF-MS pada tanaman pisang. Nilai perubahan dihitung berdasarkan perbandingan antara tanaman yang diinfeksi dengan Mock (Li *et al.* 2017)

VIP ^b	RT (min) ^c	Mass	Name	Fold changes (BX)			Fold changes (YN)		
				3 h	27 h	51 h	3 h	27 h	51 h
1.713	4.710	138.032	Salicylic acid	0.62↓	1.82↑	0.74↓	3.01↑	2.13↑	1.20↑
2.049	4.442	166.027	Formylsalicylic acid	0.65↓	1.32↑	0.52↓	1.61↑	1.26↑	1.43↑
1.889	5.020	388.173	β-D-glucopyranosyl-11-hydroxyjasmonic acid	0.60↓	2.09↑	2.06↑	1.33	0.56↓	1.47↑
1.208	10.130	224.142	Methyl jasmonate	0.91↓	1.21↑	1.12	1.24	0.83↓	1.89↑
1.578	4.520	264.137	Absciscic acid	0.85↓	1.11↑	1.02	0.95↓	0.73↓	0.81↓
1.710	5.930	426.189	Absciscic acid glucose ester	1.84↑	1.85↑	2.70↑	0.48	0.38↓	0.22↓
1.394	2.950	219.111	Zeatin (transzeatin)	1.17	1.27	1.04	0.86↓	1.38↑	0.91
1.812	4.431	204.090	Tryptophan	1.48↑	0.62↓	1.66↑	0.75↓	3.76↑	0.46↓

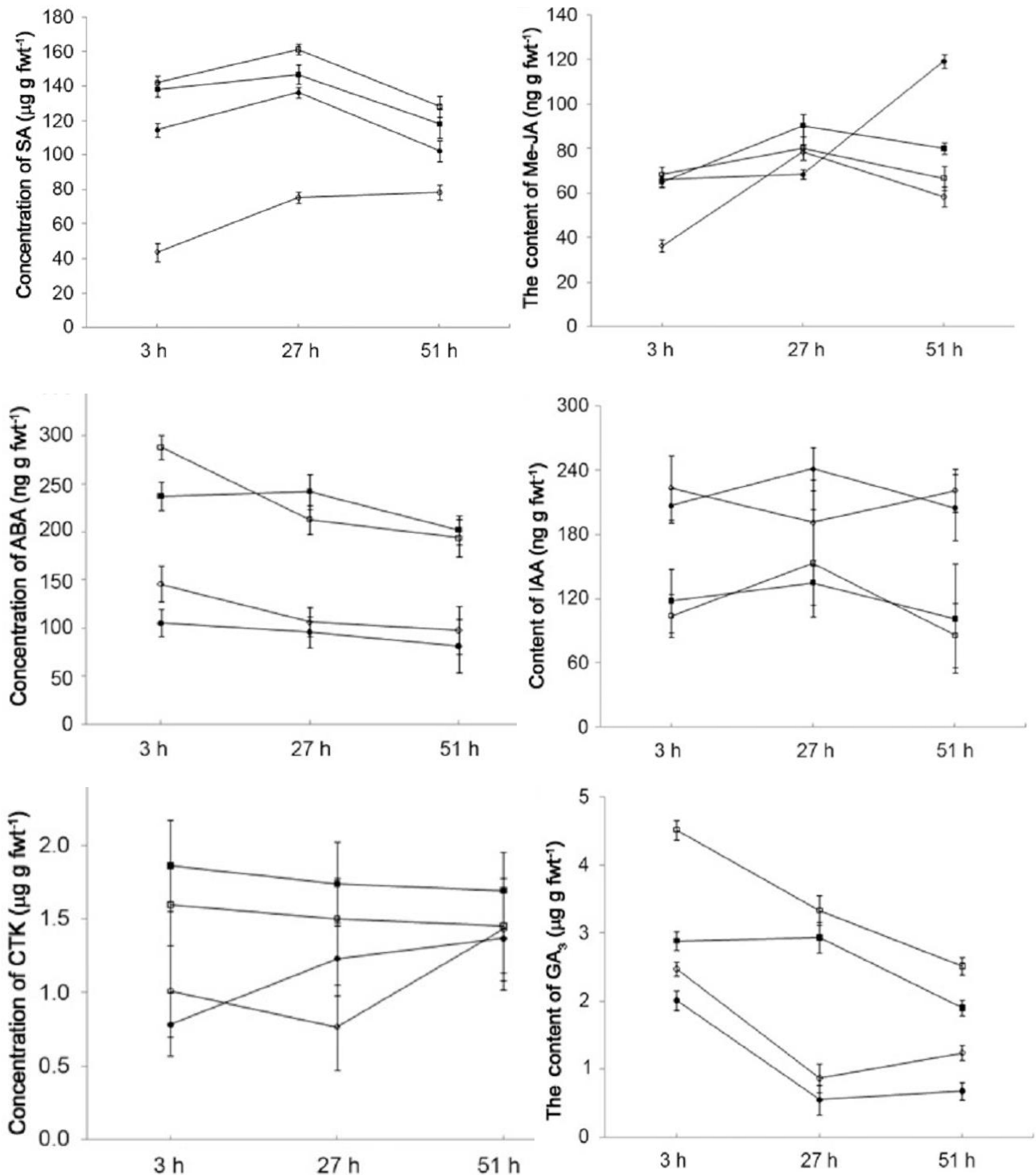
^a Fold change was the peak area ratio of the *F. oxysporum* f. sp. *cubense*-inoculated banana over the mock-inoculated banana according to the results of high-performance liquid chromatography. BX = BaXi and YN = *Musa yunnanensis*. Up and down arrows indicate significant increasing and decreasing, respectively ($P < 0.05$).

^b VIP = variable importance in the projection (>1).

^c Retention time.

Konsentrasi Fitohormon dan Senyawa Fenolik

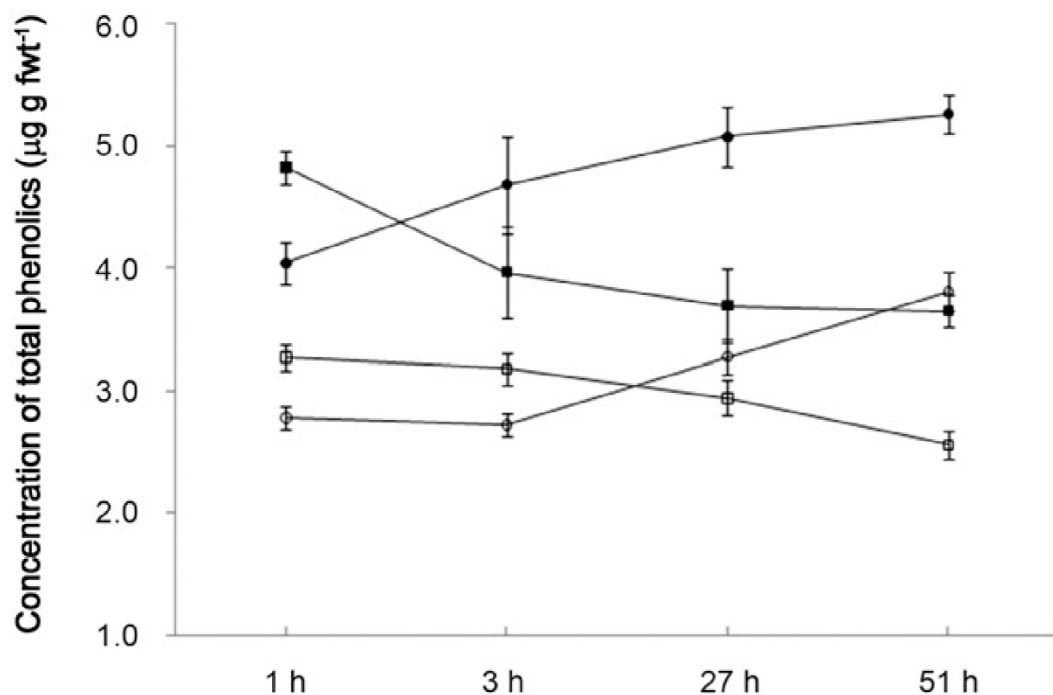
Konsentrasi beberapa fitohormon jaringan pada kedua kultivar dan 3 waktu yang berbeda disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1 Konsentrasi 6 fitohormon pada pisang sensitif (BX: kotak hitam infeksi, kotak putih mock), dan resisten (YN: lingkaran hitam infeksi, lingkaran putih mock) (Li et al. 2017).

Untuk SA, tanaman sensitif mengalami penurunan kandungan setelah diinfeksi, sedangkan tanaman resisten mengalami peningkatan kandungan. Sedangkan JA, mengalami peningkatan signifikan pada tanaman resisten setelah 51 jam. Kandungan ABA memiliki pola yang menurun setelah diinfeksi pada tanaman resisten, dan sebaliknya meningkat pada tanaman yang sensitif. Kandungan IAA pada tanaman sensitif memiliki pola yang berlawanan dengan tanaman resisten. CTK memiliki pola yang meningkat pasca infeksi, namun tidak signifikan berbeda polanya dengan tanaman resisten. 5 macam fitohormon menunjukkan pola yang terkonfirmasi baik berdasarkan analisis kandungan maupun pola hasil metabolomik.

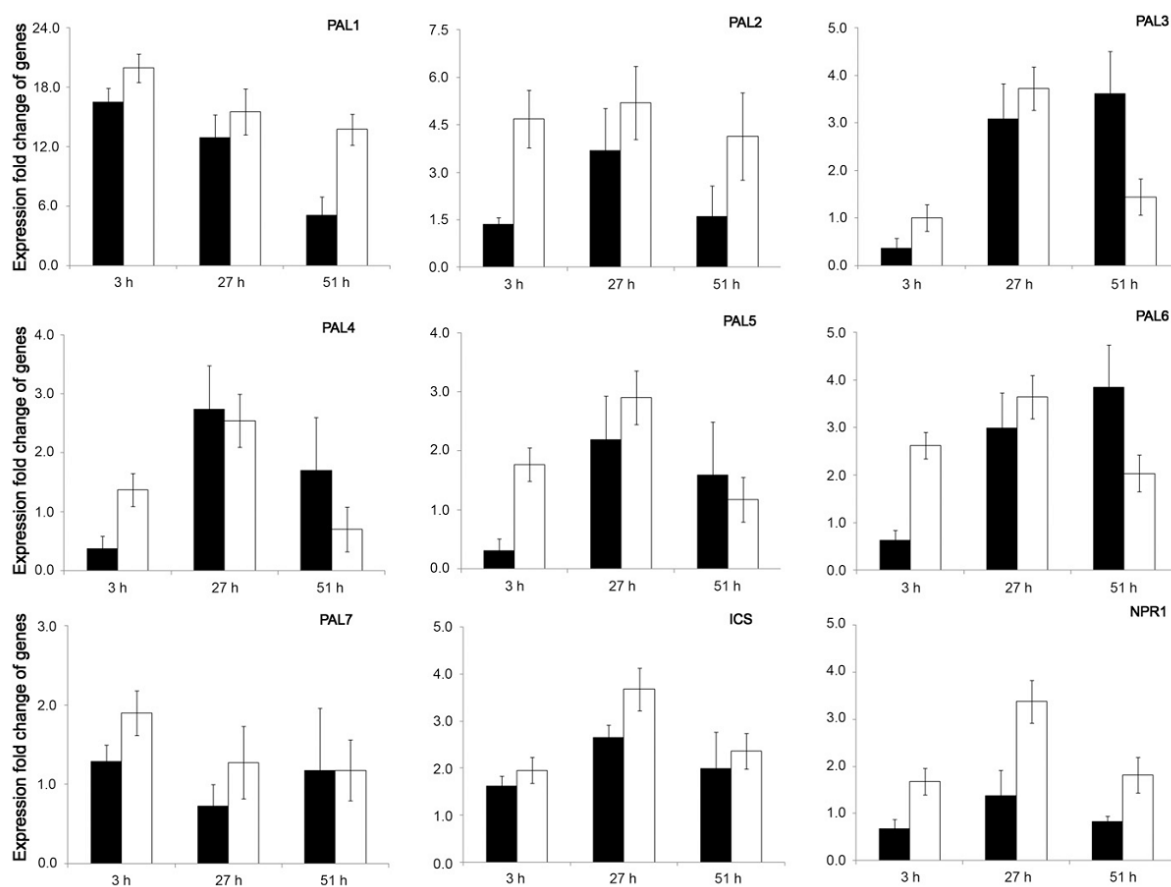
Kandungan senyawa fenolik total disajikan pada Gambar 2. Pola akumulasi fenolik memang menunjukkan bahwa infeksi memicu konsentrasi senyawa fenolik lebih tinggi. Untuk kultivar resisten, tingkat akumulasi lebih tinggi dibandingkan dengan kultivar sensitif dan polanya meningkat seiring pertambahan waktu, berbeda dengan pola akumulasi pada tanaman sensitif yang menurun seiring pertambahan waktu.



Gambar 2 Konsentrasi senyawa fenolik total pada kedua kultivar pisang (BX: kotak hitam infeksi, kotak putih mock), dan resisten (YN: lingkaran hitam infeksi, lingkaran putih mock) (Li et al 2017).

Pola Ekspresi Gen

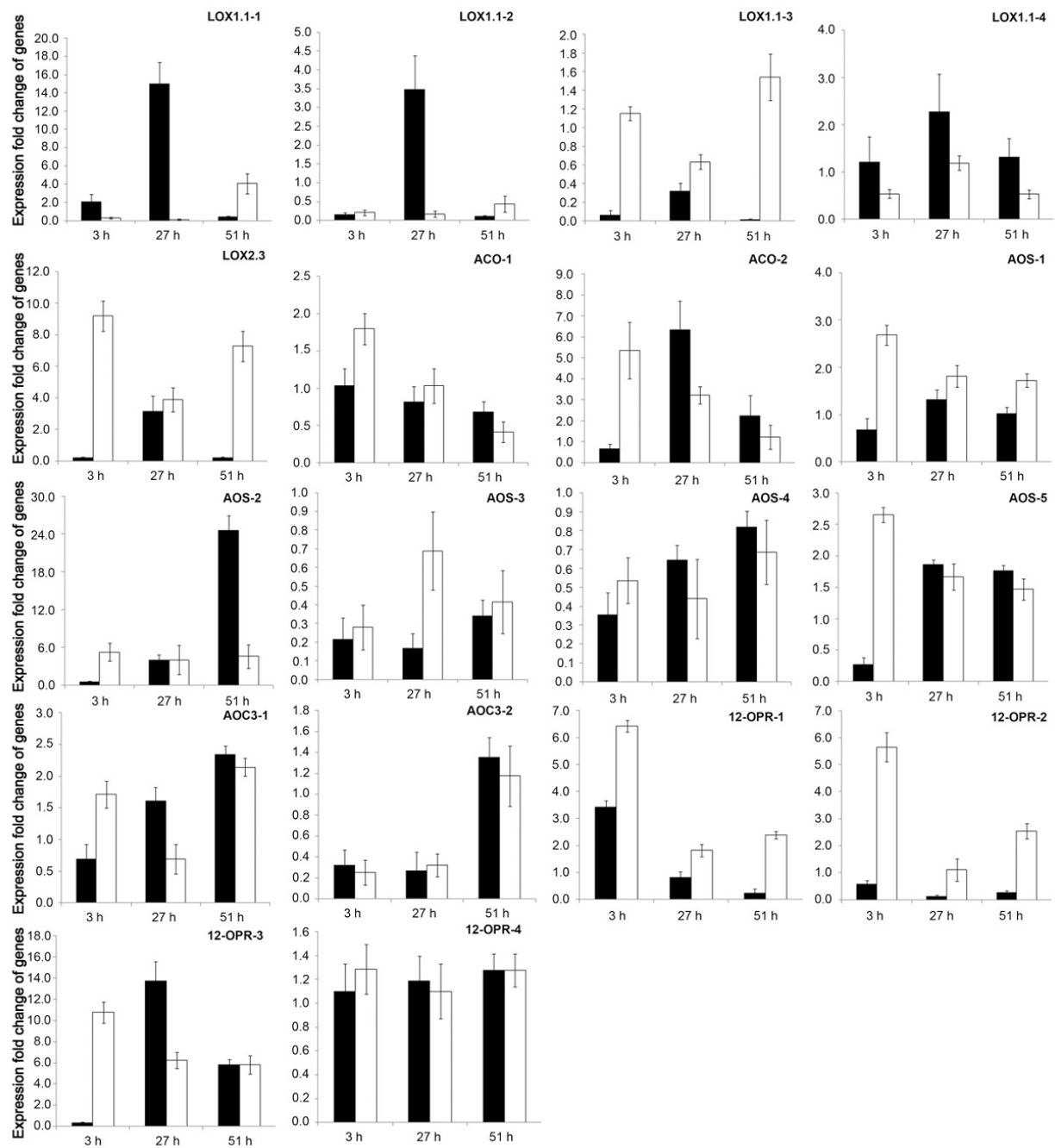
Pola ekspresi gen terkait lintasan biosintesis asam salisilat menunjukkan pola yang secara umum lebih tinggi pada kultivar resisten dibandingkan dengan sensitif. Dari jalur biosintesis asam salisilat, diujikan 3 kelompok gen: PAL (7 gen), ICS (1 gen), dan NPR (1 gen). PAL mengkatalisis reaksi fenilalanin menjadi asam sinamat sebagai salah satu intermediet biosintesis asam salisilat. Sedangkan ICS mengkatalis perubahan korismat menjadi isokorismat sebagai salah satu prekursor biosintesis asam salisilat. ICS berperan juga sebagai feedback inhibitor jika konsentrasi asam salisilat sudah cukup tinggi (Tamaoki 2008). Sedangkan NPR berperan dalam signalling lanjutan asam salisilat pada mekanisme pertahanan tanaman.



Gambar 3 Pola ekspresi dengan qPCR gen-gen kunci dalam biosintesis asam salisilat. Bar hitam merupakan tanaman sensitif, bar putih untuk tanaman resisten. PAL = phenylalanine ammonia lyase, ICS = isochorismate synthase, and NPR1 = nonpathogenesis-related protein 1 (Li et al. 2017).

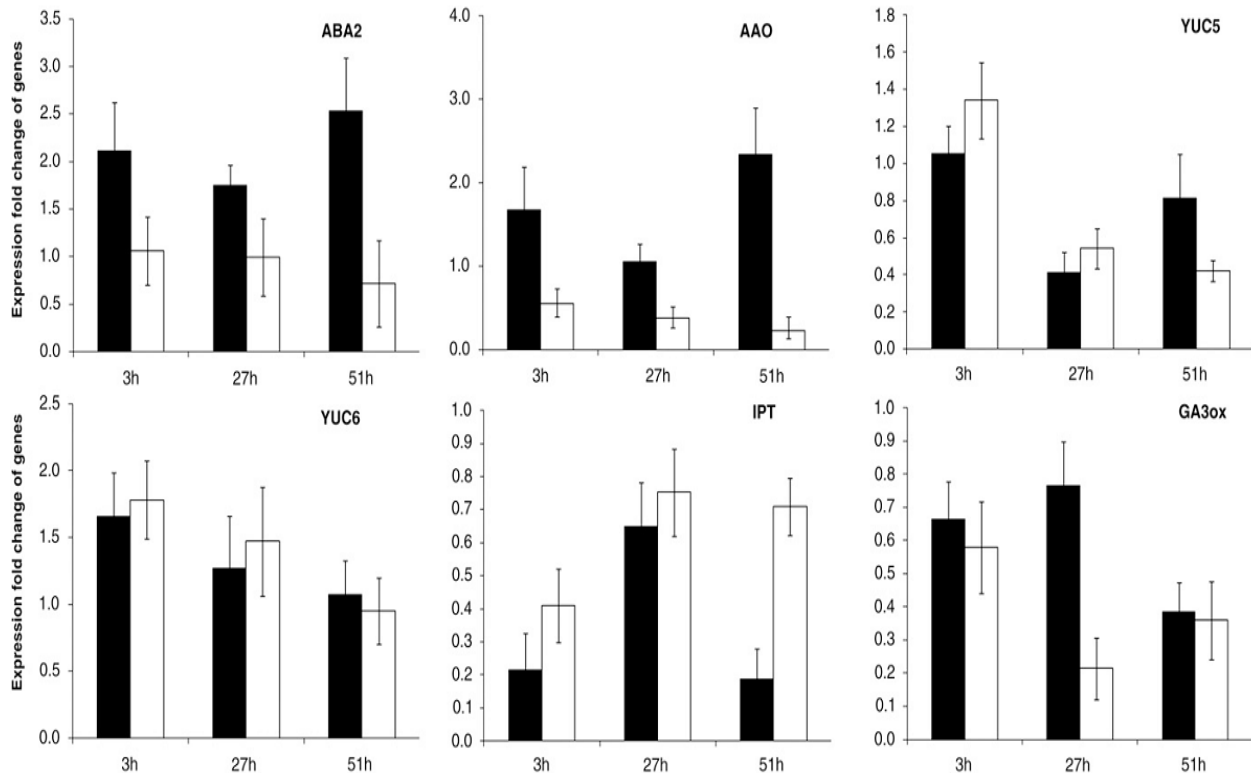
Ekspresi gen terkait asam jasmonat dilakukan pada 18 gen yang berperan dalam biosintesis: kelompok gen Lox (5 gen), ACO (2 gen), AOS (5 gen), AOC (3 gen), OPR (4 gen). Secara umum, keseluruhan gen (kecuali Lox1.1-1; Lox1.1-2; Lox1.1-4) menunjukkan peningkatan ekspresi secara signifikan pada tanaman yang resisten. Lox, AOC, dan AOS

berperan dalam proses biosintesis di dalam kloroplas, sedangkan OPR berperan dalam proses reaksi di peroksisom (Dave & Graham 2012).



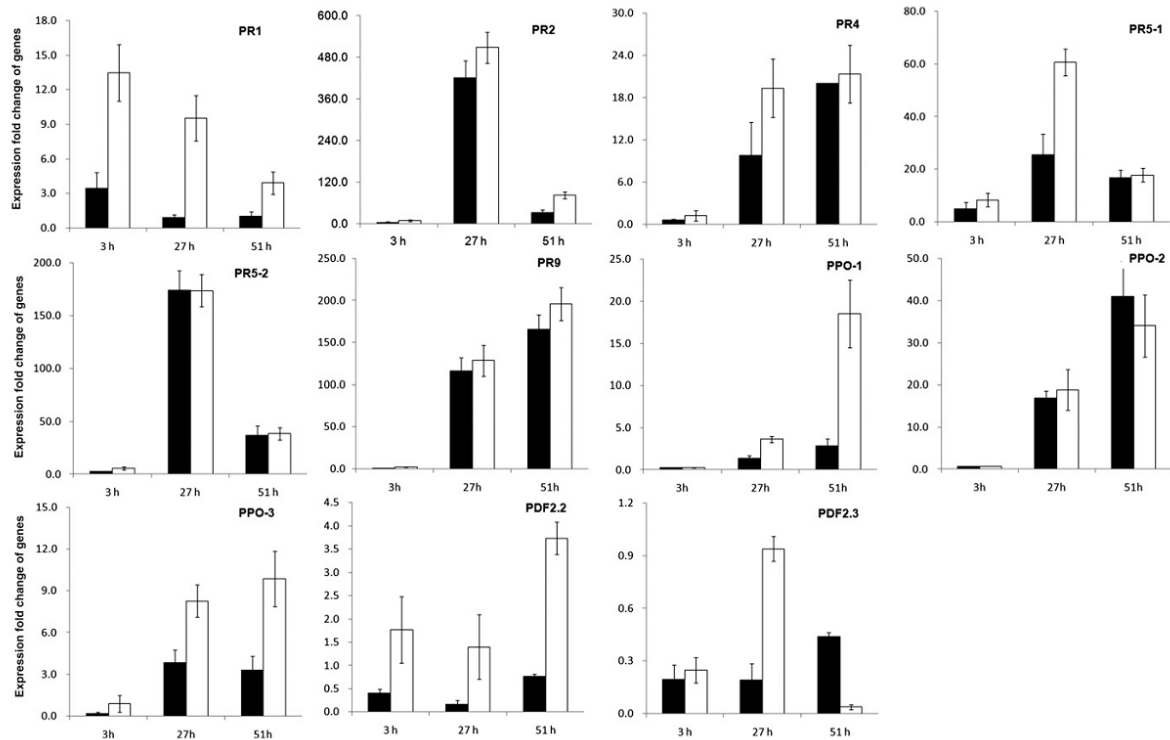
Gambar 4 Pola ekspresi dengan qPCR gen-gen kunci dalam biosintesis asam jasmonat. Bar hitam merupakan tanaman sensitif, bar putih untuk tanaman resisten. LOX = lipoxygenase, ACO = acyl-CoA oxidase, AOS = allene oxide synthase, AOC = allene oxide cyclase, and 12-OPR = 12-oxophytodienoate reductase (Li et al. 2017).

Ekspresi gen terkait biosintesis ABA (ABA2 dan AAO) menunjukkan pola yang lebih rendah pada tanaman resisten (Gambar 5). Hal ini terkonfirmasi juga dari hasil metabolomik. Sedangkan gen terkait IAA (YUC5 dan YUC6) terlihat perbedaan antara kedua kultivar tanaman namun tidak signifikan, begitu juga dengan sitokinin (IPT).



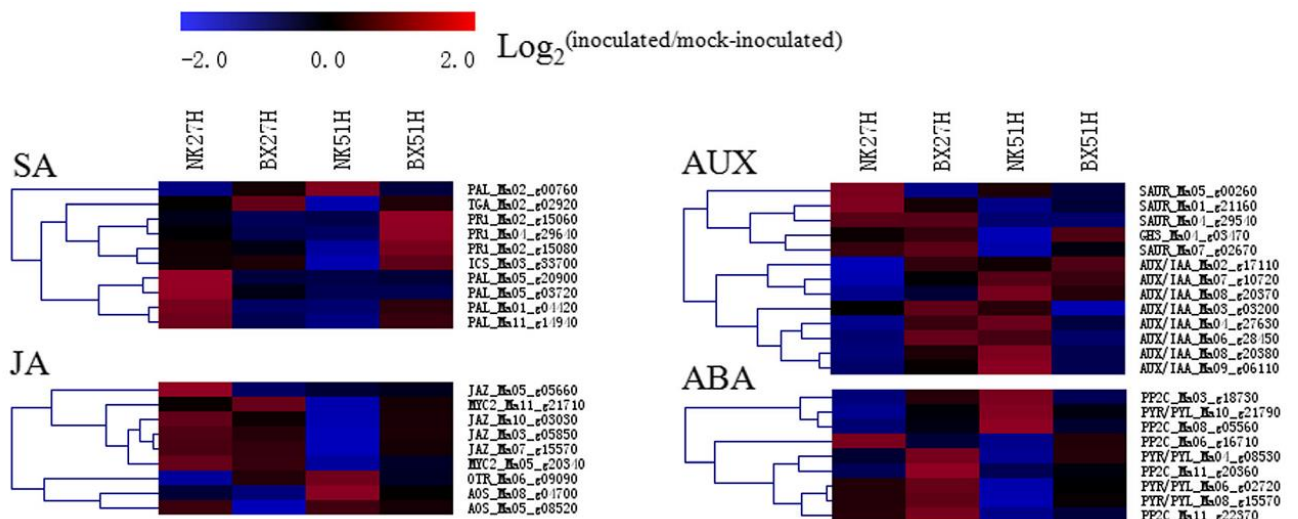
Gambar 5 Pola ekspresi dengan qPCR gen-gen kunci dalam biosintesis ABA, Auksin, sitokinin, dan giberelin. Bar hitam merupakan tanaman sensitif, bar putih untuk tanaman resisten. ABA2 = xanthoxin dehydrogenase, AAO = abscisic aldehyde oxidase, YUC = flavin monooxygenase, IPT = isopentenyltransferase, and GA3ox = 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Li et al. 2017).

Pola ekspresi gen-gen pertahanan kelompok Pathogenesis Related (PR), Polifenol oksidase (PPO), dan defensin like protein (PDF) secara umum menunjukkan pola yang lebih tinggi pada tanaman resisten dibandingkan sensitif (Gambar 6). Hal ini mengindikasikan bahwa tanaman kultivar resisten dapat bersifat resisten terhadap infeksi *Foc* karena tingginya ekspresi gen-gen pertahanan tersebut, yang bisa disebabkan keberadaan fitohormon yang berkaitan dengan pertahanan (terutama lintasan SA dan JA).



Gambar 6 Pola ekspresi dengan qPCR PR, PPO, dan PDF. Bar hitam merupakan tanaman sensitif, bar putih untuk tanaman resisten. PR1 = pathogenesisrelated gene 1, PR2 = endo-(1,4)-b-glucanase, PR4 = endochitinase, PR5 = thaumatin, PR9 = peroxidase, PPO = polyphenol oxidase, and PDF2.2 and 2.3 = defensin-like (Li et al. 2017).

Pola transduksi sinyal pada 4 lintasan fitohormon menunjukkan pola yang juga sejalan dengan hasil ekspresi. Lintasan SA dan ABA menunjukkan ekspresi yang rendah pada tanaman sensitif seiring dengan pertambahan waktu (Gambar 7).



Gambar 7 Profil ekspresi dengan transkriptomik (RNAseq) pada 2 waktu yang berbeda pada tanaman sensitif dan relatif tahan (Li et al. 2019).

KESIMPULAN

1. Tanaman sensitif mengalami penghambatan lintasan metabolik terkait SA sejak awal proses infeksi, kontras dengan tanaman resisten. Hal ini terkonfirmasi pula pada kadar SA dan hasil ekspresi gen dengan qPCR serta RNAseq.
2. Kandungan dan konsentrasi ABA mengalami pola yang berkebalikan dengan SA, dan juga terkonfirmasi dari hasil metabolomik, kandungan ABA dan hasil ekspresi dengan qPCR serta RNAseq.
3. Gen-gen pertahanan (PR, PPO, dan PDF) secara umum mengalami peningkatan pada tanaman resisten dibandingkan dengan tanaman sensitif

Daftar Pustaka

- Beckman CH. 1990. Host responses to the pathogen. Pages 93-105 in: Fusarium Wilt of Banana. R. C. Ploetz, ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- de Ascensao ARDCF, Dubery IA. 2000. Panama disease: Cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race four. *Phytopathology* 90:1173-1180.
- de Ascensao ARFDC, Dubery IA. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytochemistry* 63:679-686.
- Li CY, Deng GM, Yang J, Viljoen A, Jin Y, Kuang RB, Zuo CW, Lv ZC, Yang QS, Sheng O, Wei YR, Hu CH, Dong T, Yi GJ. 2012. Transcriptome profiling of resistant and susceptible Cavendish banana roots following inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4. *BMC Genomics* 13:374
- Li C, Shao J, Wang Y, Li W, Guo D, Yan B, Xia Y, Peng M. 2013. Analysis of banana transcriptome and global gene expression profiles in banana roots in response to infection by race 1 and tropical race 4 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *BMC Genomics* 14:851.
- Li WM, Dita M, Wu W, Hu GB, Xie JH, Ge XJ. 2015. Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 in banana wild relatives. *Plant Pathol.* 64:1061-1067.
- Li W, Wang X, Li C, Sun J, Li S, Peng M. 2019. Dual species transcript profiling during the interaction between banana (*Musa acuminata*) and the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *BMC Genomics* 20(1): 1-16. doi:10.1186/s12864-019-5902-z
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2012. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$ method. *Methods* 25, 402-408.
- Ploetz RC. 2015. Fusarium wilt of banana. *Phytopathology* 105:1512-1521
- Ruan, M. B., Li, W. B., Yu, X., and Peng, M. 2011. Rapid isolation of high-quality RNA from high-phenol-, polysaccharide plants. *Chin. J. Trop. Crops* 32:1704-1707.
- van den Berg N, Berger DK, Hein I, Birch PRJ, Wingfield MJ, Viljoen A. 2007. Tolerance in banana to *Fusarium* wilt is associated with early up-regulation of cell wall-strengthening genes in the roots. *Mol. Plant Pathol.* 8:333-341. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00389.x
- Wang Z, Jia C, Li J, Huang S, Xu B, Jin Z. 2015. Activation of salicylic acid metabolism and signal transduction can enhance resistance to *Fusarium* wilt in banana (*Musa acuminata* L. AAA group, cv. Cavendish). *Funct. Integr. Genomics* 15:47-62.
- Wang Z, Zhang J, Jia C, Liu J, Li Y, Yin X, Xu B, Jin Z. 2012. De novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 infection. *BMC Genomics* 13:650.
- Yang, W. M., Liu, X. Q., Wang, C. T., and Sheng, R. L. 2005. Endogenous hormones content determination by chromatography of rice seedlings. *J. Wuhan Univ. Sci. Eng.* 18:61-64.

ANALISIS METAGENOMIK MIKROBA ENDOFITIK AKAR TANAMAN PISANG PADA LAHAN YANG TERINFEKSI *Fusarium oxysporum cubense* (Foc)

PENDAHULUAN

Salah satu penyakit tanaman pisang yang belum dapat ditangani secara tuntas adalah layu *Fusarium* yang disebabkan infeksi cendawan tular tanah *Fusarium oxysporum cubense* (Foc). Selain bersifat parasit pada tanaman, patogen ini juga dapat hidup secara saprofit dan dapat bertahan hidup dalam waktu yang lama di tanah bahkan dalam kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Kemampuan bertahan spora Foc dalam kondisi ekstrim dimungkinkan karena Foc mampu membentuk klamidospora yang berdinding tebal. Akibatnya, kontrol serangan Foc sampai saat ini belum pernah dilaporkan berjalan secara efektif, mengingat metode utama yang banyak digunakan adalah menggunakan zat kimiawi (fungisida) yang tidak ramah lingkungan dan tidak dapat menjangkau secara efektif klamidospora yang ada di dalam tanah.

Pertumbuhan tanaman erat kaitannya dengan dengan mikroba yang tumbuh pada daerah rhizosfer. Mikroba tanah ini ada yang berperan negatif seperti patogen, ada juga yang berperan positif seperti mikroba pemacu pertumbuhan. Tanah banyak berperan dalam mempengaruhi status dan produktivitas tanaman karena berkaitan dengan daur hara dalam tanah, merespon cekaman lingkungan, dan mampu menginduksi pertahanan terhadap serangan fitopatogen (Massart *et al.* 2015). Tanaman mampu menarik mikroba tanah untuk mengkolonisasi daerah perakaran, bahkan mengkolonisasi dan melakukan simbiosis pada jaringan tanaman. Proses interaksi ini selalu diawali dengan *signalling* dan sekresi eksudat akar. Mikroba yang hidup dan berasosiasi dalam jaringan tanaman dikenal sebagai mikroba endofitik (Chotulo *et al.* 2018).

Beberapa jenis mikroba tanah yang hidup bebas dan endofitik dapat berperan sebagai agen biokontrol terhadap patogen karena mampu berkompetisi dengan mikroba patogen tersebut (Kaushal *et al.* 2017). Pengamatan yang dilakukan Kaushal *et al.* (2020) menunjukkan ada kecenderungan tanaman pisang sensitif Foc yang ditumbuhkan dengan asosiasi tanaman lain menunjukkan gejala non-simtomatik (tidak terserang) sementara tanaman pisang lain di sekitarnya menunjukkan gejala simtomatik (terserang). Effendi *et al.* (2019) juga melaporkan bahwa terdapat perbedaan komposisi mikroba rhizosfer tanah pada tanaman pisang yang terindikasi terserang Foc dengan tanah sekitarnya yang tidak menunjukkan gejala pada tanaman pisang di lokasi industri perkebunan pisang. Dengan beberapa laporan tersebut, maka

menjadi sebuah hipotesis bahwa keberadaan komunitas mikroba tertentu dapat menentukan kondisi kesehatan tanaman dan perkembangan penyakit. Lebih khusus lagi dari mikroba tanah, mikroba tanah endofitik yang mampu mengkolonisasi dalam jaringan tanaman diduga mampu melakukan kontak langsung dengan patogen khususnya *Foc*. Untuk membuktikan hipotesis tersebut, dilakukan analisis secara metagenomik pada komunitas mikroba endofitik akar tanaman pisang. Analisis metagenomik merupakan teknik dasar ekologi molekuler yang memungkinkan menganalisis genom kolektif bakteri atau mikroba lain dari sampel lingkungan (Ravin *et al.* 2015), tanpa harus melakukan kultur pada mikroba tersebut.

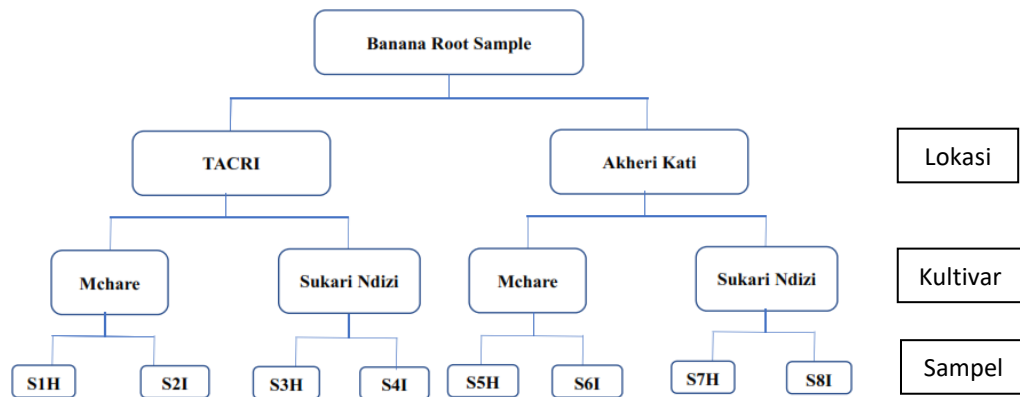
TUJUAN

Menganalisis profil mikroba endofitik pada akar tanaman pisang menggunakan pendekatan metagenomik dan membandingkan antara jaringan akar pisang yang terserang (simtomatik) dan tidak terserang (non-simtomatik).

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel dan isolasi DNA. Bahan yang digunakan sebagai sampel adalah akar tanaman pisang dewasa berumur tanam 8 tahun sejak penanaman awal dari 2 kultivar sensitif (Mchare dan Sukari Ndizi), 2 lokasi yang berbeda (TACRI, Kilimanjaro dan Akheri Kati, Tanzania), serta pada 2 keadaan (terserang: simtomatik, dan tidak terserang: non-simtomatik). Akar tanaman diambil pada kedalaman 15-30 cm yang langsung melekat dengan bonggol dari 3 titik setiap tanaman. Dari tiap lokasi dibuat komposit sampel jaringan akar dari 3 tanaman dan 5 lokasi setiap kebun. Teknis pengambilan sampel dijelaskan pada Gambar 1. Isolasi DNA jaringan dilakukan dengan Kit isolasi DNA tanaman (Zymo, USA).

Amplifikasi gen 16S rDNA dan pembuatan library untuk Genotyping by sequencing. Gen yang diamplifikasi adalah dari DNA hasil isolasi adalah daerah hipervariabel V3-V4 dari gen ribosomal DNA menggunakan primer 460F/R. Selanjutnya amplicon fragmen daerah V3-V4 diamplifikasi kembali dengan menggunakan primer indeks i5 dan i7 sebagai adapter dalam proses *sequencing by synthesis* Illumina untuk menghasilkan library amplicon. Library disintesis menggunakan Nextera XT Index Kit (Illumina) dan dimurnikan sesuai protokol dari Illumina (Steward *et al.* 2018).



Gambar 1 Pengambilan dan identifikasi sampel yang digunakan dalam penelitian (Kaushal *et al.* 2020)

Sekuensing dan assembly hasil sekuensing 16S. Library ampikon disekuen dengan metode *paired-end sequencing*. Data hasil sekuensing dirakit (di-assembly) menggunakan program FLASH pada package QIIME dalam dengan kriteria overlap minimum sepanjang 10 bp. Hasil pembacaan yang bersifat kimera dibuang dengan menggunakan algoritma usearch61. Hasil pembacaan dan assembly yang memiliki tingkat kesamaan diatas 97% kemudian dikelompokkan dengan algoritma UCLUST untuk membentuk representasi satuan taksonomi (Operation Taxonomy Unit, OTU).

Sekuensing metagenom (Shotgun metagenomic sequencing). 200ng gDNA hasil isolasi langsung dibuat menjadi library untuk sekuensing menggunakan Kit Truseq Nano DNA Library Prep kit (Illumina) dengan fragmentasi fisik gDNA lalu ligasi dengan adapter pada 8 sampel yang diujikan (4 simptomatik dan 4 non-simptomatik). Proses sekuensing dilakukan dengan metode *paired-end sequencing* (Francis *et al.* 2013). Proses ini dilakukan untuk mengetahui total keseluruhan gen yang terdapat pada keseluruhan sampel.

Assembly metagenom dan prediksi gen. *Assembly de novo* dari hasil output dengan kualitas yang bagus dilakukan dengan program metaSPAdes (Francis *et al.* 2013). Analisis statistik scaffold hasil assembly dilakukan dengan Perl scripts. Hasil scaffold yang diperoleh digunakan sebagai input untuk prediksi gen menggunakan Prodigal (v2.6.3). Data hasil prediksi gen akan digunakan dalam analisis taksonomi dan fungsional metagenomik.

Klasifikasi taksonomik. Data hasil whole metagenom sequencing diklasifikasikan menggunakan program Kaiju. Sekuen ditranslasikan dalam 6 kemungkinan reading frame dan diprediksi asam aminonya hingga bertemu dengan stop kodon. Fragmen asam amino kemudian disortir dan dihitung skor BLOSUM62 (dengan mode: Greedy). Sekuen asam amino hasil skor

yang baik kemudian disejajarkan dengan database referensi protein in NCBI (non-redundant) dengan algoritma Burrow-Wheller Transform (BWT).

Anotasi Fungsional Gen. Anotasi dilakukan dengan program COGNIZER menggunakan beberapa database: COG, KEGG, Pfam, GO, dan FIGfams. Asosiasi lintasan metabolik dan OTUs disajikan dalam bentuk heatmap.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Umum Amplikon Hasil Sekuensing

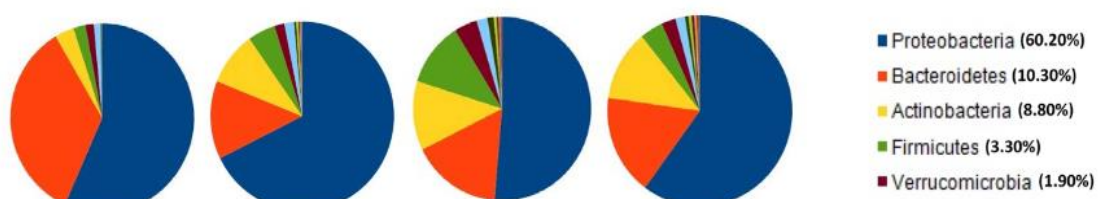
Gambaran umum hasil sekuensing disajikan pada Tabel 1. Diperoleh rata-rata ukuran fragmen sepanjang 312 bp dengan total pembacaan sebesar 13,97 Gb bp yang kemudian diidentifikasi sebagai 21897 spesies (OTU), sedangkan dari hasil prediksi gen berhasil diidentifikasi sebanyak 573.271 gen.

Tabel 1. Gambaran umum hasil sekuensing pada 8 sampel yang diujikan (Kaushal *et al.* 2020)

Lokasi	Kultivar	Sampel	Kondisi	Total Reads	Total Reads non Kimera	Jumlah OTUs	Jumlah OTU tanpa singleton
TACRI	McHare	S1H	Non-simptomatik	349670	308784	15426	6571
		S2I	Simptomatik	381417	337074	11779	5561
	Sukari Ndizi	S3H	Non-simptomatik	278606	242504	14909	6782
		S4I	Simptomatik	307503	281162	10044	5311
Akheri Kati	McHare	S5H	Non-simptomatik	544149	464508	16699	7450
		S6I	Simptomatik	457699	385006	19223	8747
	Sukari Ndizi	S7H	Non-simptomatik	222216	199861	8243	4867
		S8I	Simptomatik	467607	414864	15901	7811
TOTAL						81021	21897

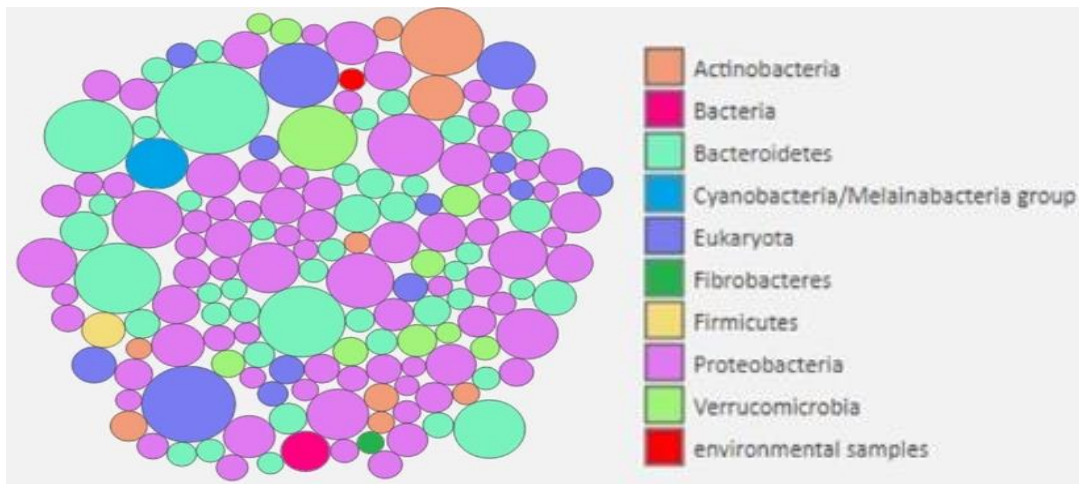
Komposisi Mikroba Endofitik yang Berasosiasi dengan Akar

Secara umum, komposisi mikroba endofitik secara keragaman dan kelimpahan lebih tinggi pada sampel jaringan simtomatik (27.430 OTU) dibandingkan non simtomatik (25.670 OTU) dengan kelompok filum Proteobacteria konsisten dominan, diikuti Bacterioidetes, dan Actinobacteria pada semua lokasi dan kondisi (Gambar 2). Anggota dari Proteobacteria bervariasi secara kelimpahan antara jaringan yang simtomatik dan non-simtomatik, namun semuanya konsisten untuk ordo Flavobacteriales, Rhizobiales, Pseudomonadales, Burkholderiales, dan Firmicutes. Dominannya filum Proteobacteria, Bacterioidetes, dan Actinobacteria pada keseluruhan lokasi dan kondisi dapat menjadi indikasi bahwa kelompok filum ini merupakan kelompok yang memang teradaptasi di dalam jaringan tanaman pisang.



Gambar 2 Komunitas mikroba endofitik dari hasil sekuensing gen 16S pada jaringan akar pisang baik pada tanaman yang simptomatik maupun non-simptomatik (Kaushal *et al.* 2020).

Sekuensing dengan shotgun metagenomik gDNA total juga menunjukkan pola yang hampir sama untuk kelompok filum dominan yang terdeteksi. Lima filum dominan yang terdeteksi antara lain Proteobacteria, Bacterioidetes, Eukaryota, Actinobacteria, dan Verrucomicrobia. Jika dipilih 3 teratas, maka akan konsisten dengan hasil sekuensing 16S, yaitu Proteobacteria, Bacterioidetes, dan Actinobacteria. Filum Eukaryota sebagai urutan ketiga terbesar tidak diperhitungkan karena kemungkinan besar berasal dari gen tanaman pisang sebagai inang atau patogen Foc yang menyerang tanaman. Shotgun sekuensing dilakukan untuk memotret kondisi kelimpahan dan keragaman gen pada suatu sampel lingkungan. Dari hasil shotgun akan diperoleh gen apa saja yang banyak terdeteksi, dan apakah gen tersebut berasal dari organisme yang sama atau tidak dapat ditentukan. Semakin banyaknya lingkaran yang dihasilkan menunjukkan semakin beragamnya jenis organisme yang diinterpretasikan melalui jumlah OTU, dan semakin besar ukuran lingkaran menunjukkan semakin tingginya kelimpahan setiap organisme.



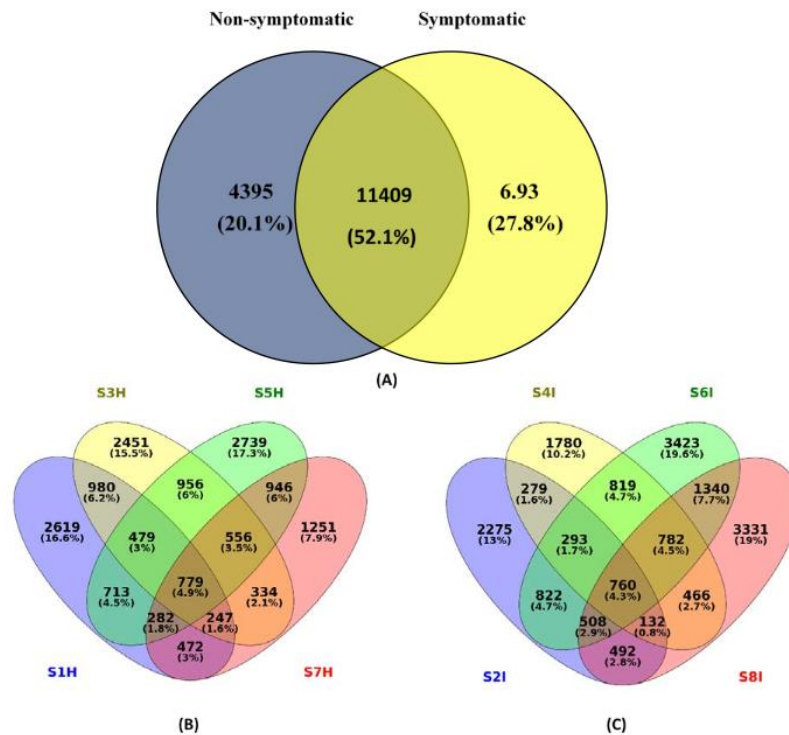
Gambar 3 Profil komunitas organisme yang terdeteksi dari *shotgun sequencing* (Kaushal *et al.* 2020)

Komunitas Mikroba Endofitik pada Keadaan Simtomatik dan Non-simtomatik

Mapping dan distribusi OTU pada kedua kondisi (simtomatik dan non-simptomatik) dilakukan dengan membuat diagram venn dari sampel mana ditemukannya OTU. Dari analisis tersebut sebanyak 52,1% atau 11.409 OTU ditemukan pada keadaan dua keadaan (simtomatik dan non-simptomatik) dengan dominasi dari kelompok Filum Proteobacteria dan Bacteroidetes (92,4%) serta Actinobacteria (dengan Ordo dominan Actinomycetales dan Streptomycetales) sebesar 9,3%. Actinobacteria dikenal sebagai kelompok filum bakteri yang mampu menghasilkan senyawa metabolit yang mampu menghambat pertumbuhan fitopatogen.

OTU khas pada kondisi tanaman terserang sebesar 27,8%, lebih besar dibanding jumlah OTU yang ditemukan khas pada tanaman yang tidak menunjukkan gejala terserang, sebesar 20,1% (Gambar 4). Keberadaan mikroba yang khas pada kondisi tidak terserang (non-simtomatik) bisa menjadi fokus untuk mencari agens antagonistik potensial bagi *Foc*. Meskipun kondisi tanah terinfeksi, namun kondisi tanaman tidak menunjukkan gejala serangan. Jika dirunut pada tingkat transkriptomik tanaman pisang, akan dapat diprediksi gen mana saja yang ekspresinya berubah akibat keberadaan mikroba endofitik sehingga tanaman tidak menunjukkan kondisi merana akibat infeksi *Foc*. Dari total 4395 OTU spesifik yang ditemukan pada kondisi non simtomatik, dapat difokuskan lagi potensi biokontrol pada 779 OTU yang terdapat pada keseluruhan lokasi sampling yang teridentifikasi masuk dalam Filum Proteobacteria (genus *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Devosia*, *Paenibacillus*), Filum Actinobacteria (famili Streptomycetaceae). *Devosia* diketahui merupakan salah satu bakteri simbiosis fiksasi Nitrogen yang masuk dalam ordo Rhizobiales. Sedangkan *Pseudomonas*

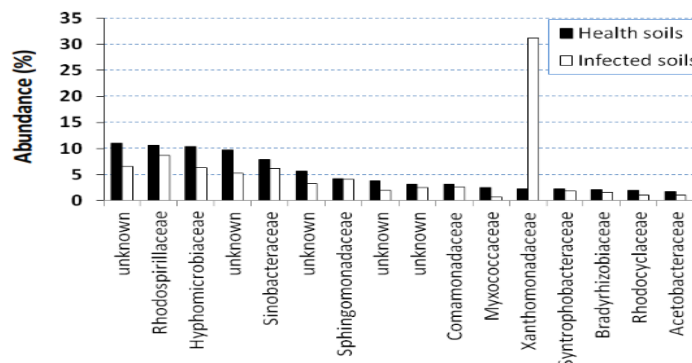
diketahui mampu menghambat patogen karena mampu memicu resistensi patogen secara sistemik (Tian *et al.* 2007; Kaushal & Wani 2016). Manipulasi beberapa bakteri kelompok seperti *Pseudomonads*, *Streptomyceae*, dan kelompok *Paenibacillus* pada daerah rhizosfer dapat menjadi salah satu strategi untuk menghambat patogenesitas mikroba fitopatogen meskipun patogen tersebut ada di tanah.



Gambar 4 Distribusi OTU yang ditemukan pada tanaman pisang terinfeksi *Foc* dengan kondisi simtomatik dan non-simtomatik (A), Distribusi OTU khusus pada kondisi yang non-simtomatik (B), dan pada kondisi simtomatik (C). Sampel TACRI: S1H, S2I (Mchare); S3H, S4I (Sukari Ndizi), dan sampel Akheri Kati: S5H, S6I (Mchare); S7H, S8I (Sukari Ndizi).

Keberadaan OTU yang khas hanya ditemukan pada kondisi simtomatik dan secara proporsi lebih besar dibandingkan yang khas non-simtomatik menunjukkan indikasi bahwa dalam proses infeksi dan serangan *Foc*, gejala layu dan serangan tidak hanya disebabkan infeksi tunggal oleh *Foc*, tetapi dipengaruhi juga infeksi sekunder oleh mikroba lain yang bersifat oportunistik. Dari data metagenomik terlihat bahwa 6093 OTU spesifik dan sebanyak 760 OTU ditemukan pada keseluruhan lokasi sampling yang didominasi oleh ordo Rhizobiales, Flavobacteriales, dan Anteromonadales. Variasi bakteri endofit tertentu di dalam jaringan dapat menentukan apakah infeksi yang dilakukan *Foc* menjadi semakin berat atau bahkan mereda. Hal yang sama juga terjadi pada komunitas bakteri rhizosfer (non-endofit) yang menunjukkan pola dominan pada bakteri patogen oportunistik di lokasi tanah terserang *Foc* (Effendi *et al.* 2019). Famili Xanthomonadaceae menunjukkan kelimpahan yang signifikan

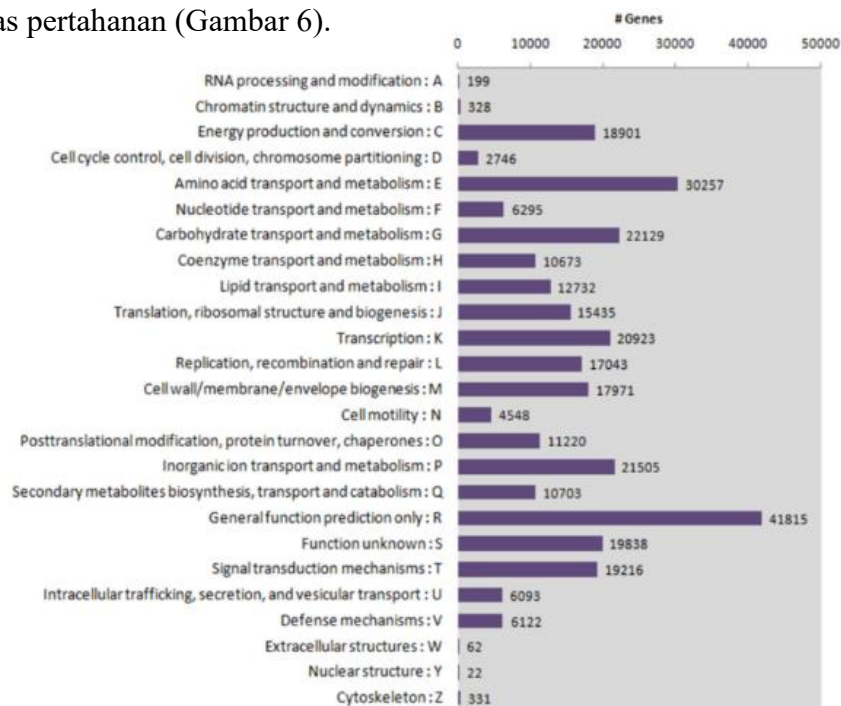
berbeda pada rhizosfer pisang (simtomatik) yang terinfeksi *Foc* dibandingkan rhizosfer pisang yang terlihat sehat (non-simtomatik) (Gambar 5).



Gambar 5 Profil 16 famili bakteri kelompok Proteobacteria pada rhizosfer pisang terinfeksi dan tidak terinfeksi *Foc* (Effendi *et al.* 2019).

Anotasi Gen Fungsional Data Metagenomik

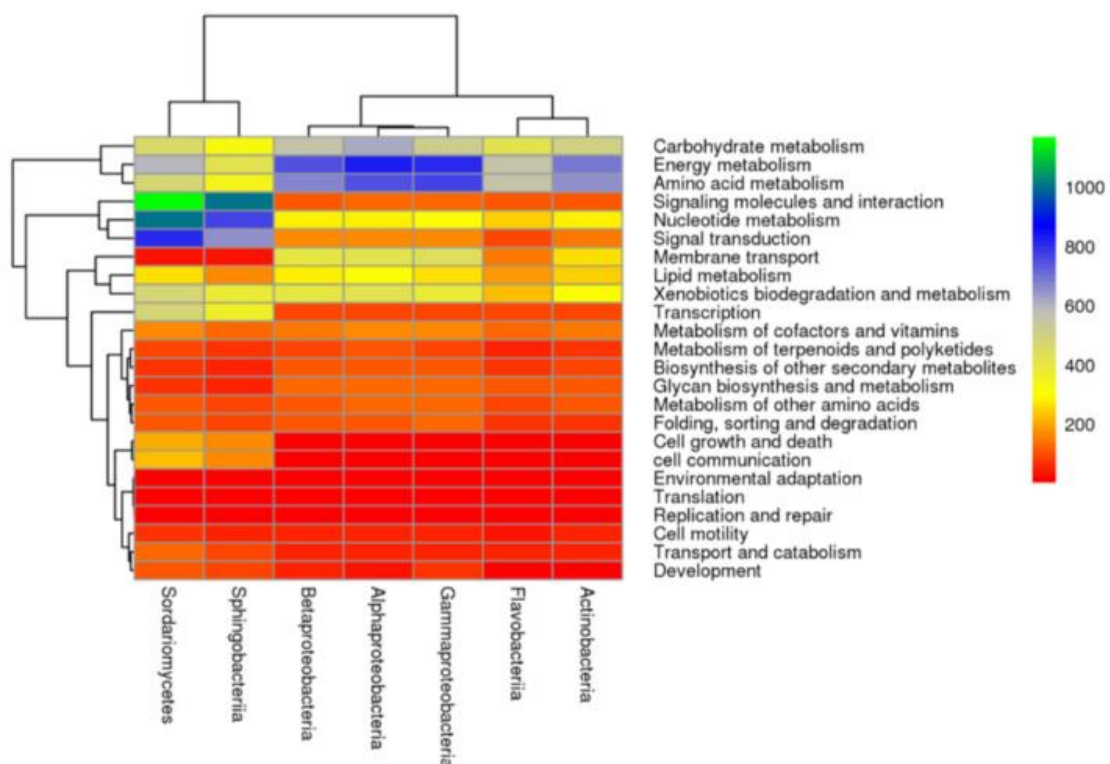
Analisis fungsional yang dilakukan pada data metagenomik akar pisang menunjukkan beberapa kategori fungsi gen teramati dalam proporsi yang cukup tinggi. Beberapa diantaranya adalah konversi energi, metabolisme karbohidrat, protein dan asam amino, RNA, dan DNA, termasuk aktivitas pertahanan (Gambar 6).



Gambar 6 Distribusi gen yang teranotasi dalam database Cluster of Orthologous Group of protein (COG) dari hasil shotgun sequencing (Kaushal *et al.* 2020).

Hubungan antara beberapa taksa mayor dan fungsi gen yang berhasil dianotasi disajikan pada Gambar 7. Beberapa kelompok gen teranotasi berkaitan dengan patogenitas (metabolisme karbohidrat, energi, asam amino, lipid, signalling, transduksi sinyal, biodegradasi xenobiotik, dan beberapa kelas lainnya. Pada kondisi sampel simtomatik, teridentifikasi juga beberapa gen

yang terkait dengan degradasi dinding sel inang. Beberapa diantaranya berhubungan dengan enzim pendegradasi oligosakarida dan sebagian kecil enzim endo- β -1,4-xylanase dan poligalakturonase. Fase awal fitopatogen (misalnya *Foc*) menyerang, akan terjadi sekresi sejumlah enzim pendegradasi dinding sel (petkinase, xilanase, dan selulase) yang akan menghasilkan lignoselulosa yang digunakan juga sebagai pertahanan tanaman dari invasi mikroba. Bakteri-bakteri endofit dapat melakukan pemecahan lignoselulosa yang menyebabkan mereka mampu masuk ke dalam sel akar tetapi tidak menghasilkan simptom negatif seperti pada kasus non simptomatik, atau bahkan menyebabkan infeksi sekunder yang justru akan memperparah kondisi bagi inang. Semua tergantung jenis mikrobanya.



Gambar 7 Heatmap beberapa taksa mayor dan gen fungsional yang teranotasi dari hasil sekuensing (Kaushal *et al.* 2020).

KESIMPULAN

- Proteobacteria, Bakterioidetes, dan Aktinobacteria merupakan 3 Filum yang dominan ditemukan sebagai mikroba endofit pada akar tanaman pisang berdasarkan analisis metagenomik baik dengan sekuen 16S maupun shotgun sequencing.
- Perbandingan komunitas endofit akar antara kondisi simptomatik dan non-simptomatik mengungkap keberadaan Ordo Pseudomonales dan Actinomycetales (famili

Streptomycetaceae) yang potensial sebagai agen biokontrol penghasil senyawa antagonistik.

- Manipulasi beberapa mikroba menguntungkan mampu mengurangi potensi patogen tular tanah menginfeksi tanaman atau memberi efek non-simtomatik pada tanaman.
- Analisis metagenomik endofitik dapat digunakan sebagai pendekatan untuk mempelajari mekanisme serangan patogen pada tanaman dan hubungan interaksi antara inang dengan mikroba.

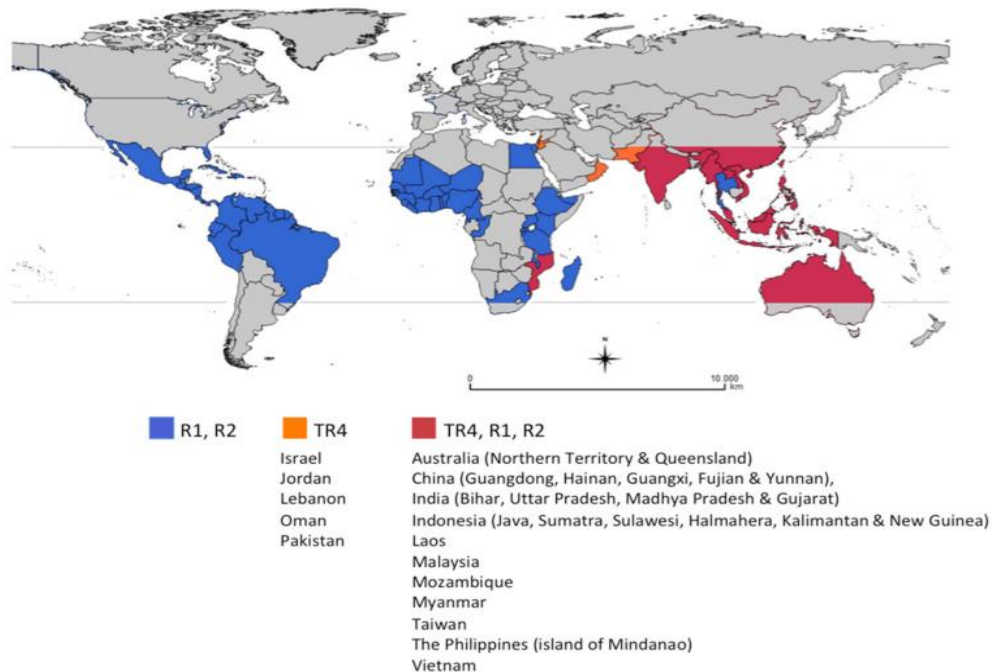
DAFTAR PUSTAKA

- Chutulo EC, Chalannavar RK. 2018. Endophytic mycoflora and their bioactive compounds from *Azadirachta indica*: A comprehensive review. *J. Fungi* 4(42).
- Effendi Y, Pambudi A, Pancoro A. 2019. Metagenomic analysis of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense-infected soil in banana plantation, Sukabumi, Indonesia. *Biodiversitas* 20: 1939-1945.
- Francis OE, Bendall M, Manimaran S, Hong C, Clement NL, Castro-Nallar E, Snell Q, Schaalje GB, Clement MJ, Crandall KA, et al. 2013. Pathoscope: Species identification and strain attribution with unassembled sequencing data. *Genome Res.* 23: 1721–1729.
- Kaushal M, Kumar A, Kaushal R. 2017. *Bacillus pumilus* strain YSPMK11 as plant growth promoter and biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum*. *3 Biotech* 7(90).
- Kaushal M, Mahuku G, Swennen R. 2020. Metagenomic insight of the root colonizing microbiome associated with symptomatic and non-symptomatic bananas in *Fusarium* wilt infected fields. *MDPI Plant* 9(263): 1-18.
- Kaushal M, Wani SP. 2016. Plant-growth-promoting rhizobacteria: Drought stress alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann. Microbiol.* 66: 35–42.
- Mallon CA, Poly F, Le Roux X, Marring I, van Elsas JD, Salles JF. 2015. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities. *Ecology* 96: 915–926.
- Massart S, Perazzolli M, Höfte M, Pertot I, Jijakli MH. 2015. Impact of the omic technologies for understanding the modes of action of biological control agents against plant pathogens. *Biocontrol* 60: 725–746.
- Ravin NV, Mardanov AV, Skryabin KG. 2015. Metagenomics as a tool for the investigation of uncultured microorganisms. *Russ J Genet* 51: 431-439
- Stewart RD, Auret MD, Warr A, Wiser AH, Press MO, Langford KW, Liachko I, Snelling TJ, Dewhurst RJ, Walker AW, et al. 2018. Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nat. Commun* 9(870)
- Tian BY, Yang JK, Zhang KQ. 2007. Bacteria used in biological control of plant-parasitic nematodes: Populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiol. Ecol* 61: 197–213.

PROFIL SMALL RNA (sRNA) AKAR PISANG CAVENDISH YANG TERINFEKSI *Fusarium oxysporum cubense* (Foc) RAS 1 DAN RAS TROPIS 4

PENDAHULUAN

Fusarium oxysporum cubense (Foc) merupakan patogen penting tanaman pisang yang hingga saat ini belum dapat diatasi. Pada pertengahan tahun 1950-an Foc Ras1 (R1) memusnahkan kultivar pisang yang saat itu populer, Gros Michel baik di pusat produksinya di Amerika tengah dan selatan, maupun sebagian Afrika (Dita *et al.* 2018). Musnahnya kultivar Gros Michel akibat pandemi R1 memicu dikembangkan kultivar unggulan baru yang tahan R1, Cavendish. Hingga saat ini, Cavendish mampu menggantikan posisi Gros Michel sebagai kultivar yang paling populer di dunia. Namun, Foc juga mengalami ko-evolusi membentuk ras-ras baru seperti Ras2, dan Ras4 tropis. Foc Ras Tropis 4 (TR4) dikenal sebagai ras yang paling ganas karena belum ada pisang komersial yang tahan terhadap serangannya. Diperkirakan, keberadaan Cavendish dalam beberapa dekade ke depan akan musnah oleh serangan TR4. Asia Tenggara khususnya Indonesia merupakan salah satu hotspot pusat persebaran ras TR4 (Gambar 1).



Gambar 1 Pusat sebaran *Foc* di dunia (Dita *et al.* 2018).

Salah satu pendekatan yang dilakukan untuk mengatasi serangan Foc TR4 adalah dengan mempelajari interaksi yang terjadi antara pisang dan patogen. Selain mempelajari berbagai gen (dalam bentuk transkrip mRNA yang merupakan daerah coding penyandi protein) yang teregulasi akibat infeksi Foc (Li *et al.* 2019), pendekatan lain juga dilakukan dengan mempelajari transkrip non-coding yang berperan sebagai regulator dalam proses ekspresi gen

(Li *et al.* 2017; Fei *et al.* 2019). Salah satu daerah non-coding yang dipelajari dan berperan sebagai regulator adalah small RNA (sRNA). Small RNA merupakan molekul pendek non-coding berukuran 20-26 nukleotida yang berperan sebagai regulator dalam proses biologis pada eukariot, khususnya dalam merespon kondisi cekaman lingkungan, baik biotik maupun abiotik (Fei *et al.* 2019). Molekul sRNA dikelompokkan menjadi 2 kelas, yaitu mikro RNA (miRNA) dan small interfering RNA (siRNA). Kedua kelas sRNA ini berperan dengan cara menginduksi *silencing* gen melalui mekanisme RNAi (RNA interference) yang dapat terjadi pada transcriptional gene silencing (TGS) maupun post-transcriptional gene silencing (PTGS). Interferensi sRNA saat TGS terjadi melalui penghambatan pada daerah promotor baik saat proses pengenalan oleh RNAPolimerase atau bahkan sebelumnya dengan menginduksi metilasi DNA dan mengganggu remodeling kromatin histon. Sedangkan interferensi sRNA saat PTGS terjadi pada daerah coding DNA sehingga menghalangi RNA polimerase untuk melakukan transkripsi, meskipun tidak ada halangan saat mengakses promotor (Castel & Martienssen 2013).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada hubungan antara jumlah ekspresi sRNA dengan respon tanaman terhadap patogen. Ekspresi miR393, miR160, dan miR167 dilaporkan meningkat dan menurunkan ekspresi gen-gen terkait proses *signalling* auksin pasca infeksi *Pseudomonas syringae* pada *Arabidopsis* (Fahlgren *et al.* 2007). Overekspresi miR306a-5p menunjukkan peningkatan kerentanan tembakau dari infeksi *Phytophthora nicotianae* sebagai akibat dari terhambatnya ekspresi growth regulating factor (GRF) (Chen *et al.* 2015). Pada tomat resisten yang terinfeksi *Fusarium*, miR482f dan miR5300 mengalami penghambatan sehingga targetting pada gen-gen terkait imunitas dengan motif NB-LRR tidak terganggu sehingga tanaman tidak menunjukkan gejala seperti tanaman yang rentan (Ouyang *et al.* 2014). Profiling sRNA pada pisang khususnya dalam keadaan infeksi Foc masih belum banyak dilakukan, sehingga masih perlu banyak dieksplorasi.

TUJUAN

Membandingkan profil sRNA (miRNA) pada akar pisang cavendish yang diinfeksi Foc R1 dan TR4 melalui analisis deep sequencing, memetakan (memprediksi) profil tersebut pada gen yang menjadi target, serta menganalisis fungsi miRNA tersebut dalam regulasi hubungan pisang-Foc.

BAHAN DAN METODE

Bahan tanaman dan kultur cendawan. Planet pisang Cavendish kultivar Williams hasil kultur jaringan digunakan sebagai bahan tanaman. Kultur diaklimatisasi pada media tanam (Baker 1957) selama total 12 minggu dengan pencahayaan bertahap hingga menjadi bibit berukuran tinggi 15 cm. Foc yang digunakan (R1 dan TR4) ditumbuhkan terlebih dahulu dari stok miselium terliofilisasi pada 1/2S PDA selama 10 hari pada suhu 24°C dalam keadaan gelap.

Inokulasi dan pengambilan sampel jaringan. Inokulasi cendawan pada pisang dilakukan dengan metode millet carrier (Smith *et al.* 2008). 50 gram biji millet jepang diinokulasi dengan blok miselium berukuran 5x5 mm². Penanaman pisang dilakukan dengan pot ANOVA 40 mm dengan tanah 150 gram di dasar pot, 50 gram millet yang telah dinokulasi, dan 150 gram tanah lagi di bagian atas. Sebagai kontrol (mock), millet tanpa inokulasi yang digunakan pada bagian lapasan tengah dengan proporsi yang sama. Proses inokulasi dilakukan pada lokasi terkarantina, Daerah Northern Territory untuk perlakuan TR4 dan Brisbane untuk perlakuan R1. Proses percobaan dilakukan pada 3 ulangan biologis dengan masing-masing ulangan terdiri dari 5 tanaman. Total terdapat 4 perlakuan: TR4_C (mock), TR4_I (infeksi), R1_C (mock), dan R1_I (infeksi). Tanaman ditumbuhkan selama 28 hari. Setelah 28 hari dilakukan pemanenan jaringan akar pada tiap perlakuan dan ulangan, dilakukan pembersihan dari sisa tanah, dan segera dibekukan dengan nitrogen cair, lalu disimpan pada -80°C sebelum diproses untuk isolasi RNA. 5 tanaman untuk tiap ulangan di-*pool* menjadi 1 sampel untuk isolasi RNA.

Isolasi RNA dan deep sequencing. Isolasi RNA dilakukan dengan Masterpure Plant RNA purification kit (Epibio Inc.) sesuai protokol produsen. Library sRNA dibuat dengan Truseq small RNA Library Preparation kit (Illumina), dan sekuensing dilakukan secara single-end dengan target 50 bp menggunakan platform Illumina HiSeq2500. Dari sampel yang diisolasi dilakukan pembacaan untuk total 12 miRNA library (4 perlakuan, 3 ulangan).

Analisis bioinformatika. Pengolahan awal hasil output deep sequencing dilakukan dengan membuang adapter dengan FASTX-toolkit (Gordon & Hannon 2010). Hasil reads dengan panjang 18-32 bp yang digunakan dalam proses selanjutnya. Proses pensejajaran dilakukan dengan program SCRAM (Fletcher *et al.* 2018) menggunakan sekuen referensi *Musa acuminata* DH-Pahang dari database pisang CIRAD. Sekuen referensi Foc merujuk database ensembl (Guo *et al.* 2014). Saat proses alignment, data hasil reads dinormalisasi dengan model read align per million reads.

Identifikasi miRNA dan prediksi gen target. Package software MiRDeep2 (Friendlander *et al.* 2012) digunakan untuk identifikasi miRNA dan potensi novel miRNA.

miRNA dicocokkan dengan database MiRBase dengan ketentuan tidak ada mismatch pada 18 basa awal, dan maksimum 2 mismatch untuk basa selanjutnya. Hasil reads yang memenuhi kriteria tersebut kemudian di-*mapping* dengan data sekuen genom pisang. Nilai reads dengan nilai p-value <0.05 diidentifikasi sebagai novel miRNA. Prediksi gen target miRNA dilakukan dengan program psRNATarget (Dai *et al.* 2018), selanjutnya disubmit ke program Blast2Go untuk menganalisis gen ontologi.

Validasi dengan qPCR. RNA total hasil isolasi di awal dilakukan pemurnian dari DNA dengan Turbo RNase-free DNase I (invitrogen). Selanjutnya 500 ng RNA total dikonversi menjadi miRNA cDNA dengan miScript Plant RT kit (Qiagen). Proses qPCR dilakukan dengan Rotor-Gene Q Platform (Qiagen) menggunakan QuantiTect SYBR Green PCR mastermix. Untuk validasi ekspresi prediksi gen target, dilakukan sintesis cDNA dengan SensiFast cDNA synthesis kit (Bioline) mengikuti protokol produsen. qPCR prediksi gen target dilakukan dengan SensiFAST SYBR no ROX mix (bioline). Dilakukan 2 ulangan teknis untuk tiap perlakuan uji ekspresi prediksi gen. Uji ekspresi miRNA menggunakan miR399 sebagai gen referensi internal, dan untuk uji ekspresi prediksi gen target menggunakan L2 sebagai gen referensi internal. Nilai ekspresi relatif antara miRNA dan gen target dihitung dengan persamaan:

$$RE = PE_{target}^{(-Ct\ target)}/PE_{Reference}^{(-Ct\ reference)}$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Umum Hasil Sekuensing

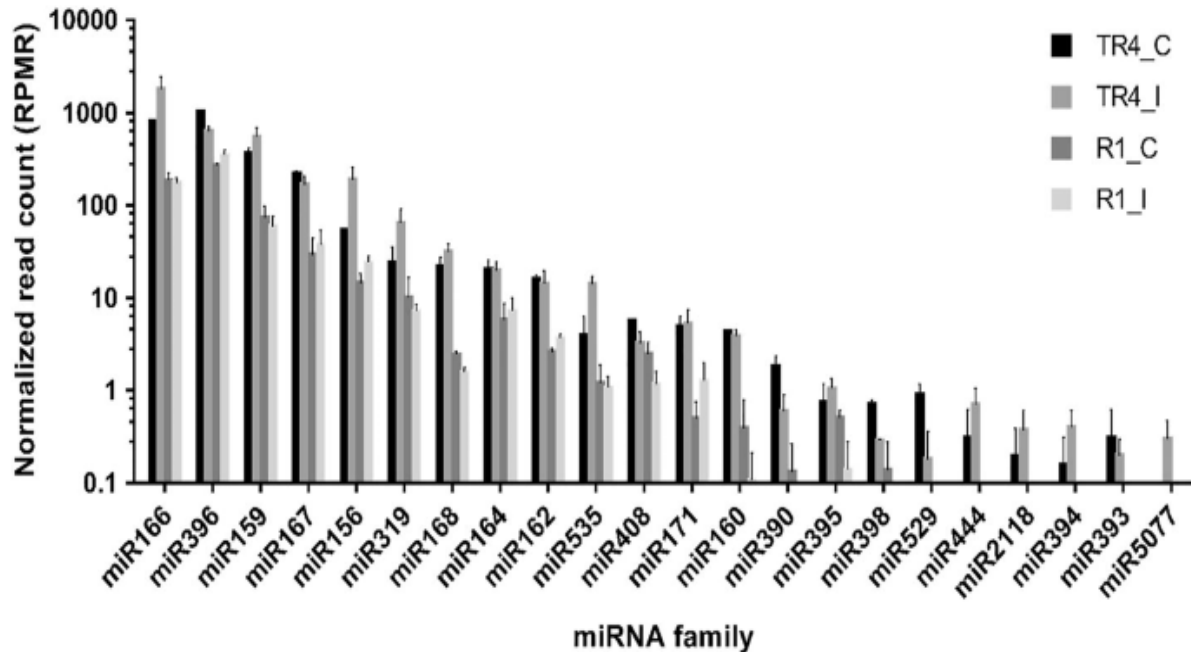
Hasil deep sekuensing pada 12 library miRNA yang diproses memberikan output data sebesar 12,21 Gb data mentah. Nilai rata-rata reads dengan kualitas baik setelah dilakukan pembuangan adapter dan filter data awal untuk tiap perlakuan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata hasil reads dengan kualitas yang baik setelah *pra-processing* (Fei *et al.* 2019)

Lokasi	Sampel	Perlakuan	Reads dengan Kualitas Baik
Northern Territory	TR4_C	Mock (kontrol)	2.869.477
	TR4_I	Infeksi	3.438.027
Brisbane	R1_C	Mock (kontrol)	2.112.927
	R1_I	Infeksi	2.262.496

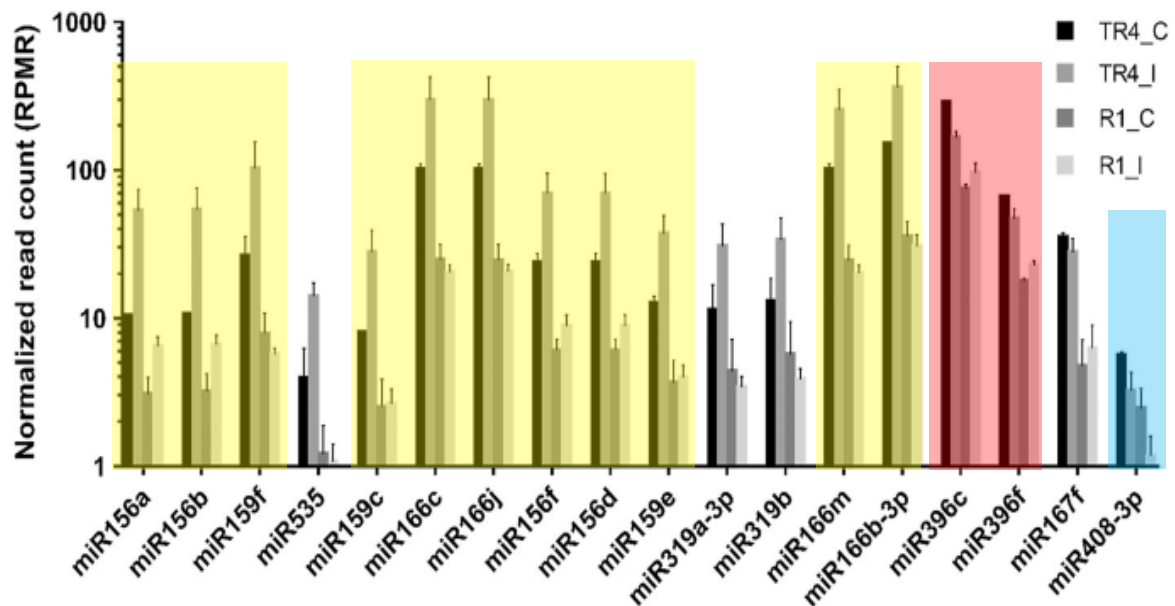
Identifikasi miRNA berdasarkan koleksi database

Berdasarkan koleksi database miRBase, total keseluruhan reads dari 12 library yang disekuon menunjukkan miRNA terdistribusi dalam 22 famili miRNA yang sudah ada di database (Gambar 2). Famili miR166, miR396, dan miR159 menunjukkan ekspresi tertinggi pada keseluruhan perlakuan.



Gambar 2 Plot hasil reads sekuensing pada tiap perlakuan pada 22 famili miRNA yang diketahui dari database berdasarkan normalisasi reads per million reads (RPM) (Fei *et al.* 2019).

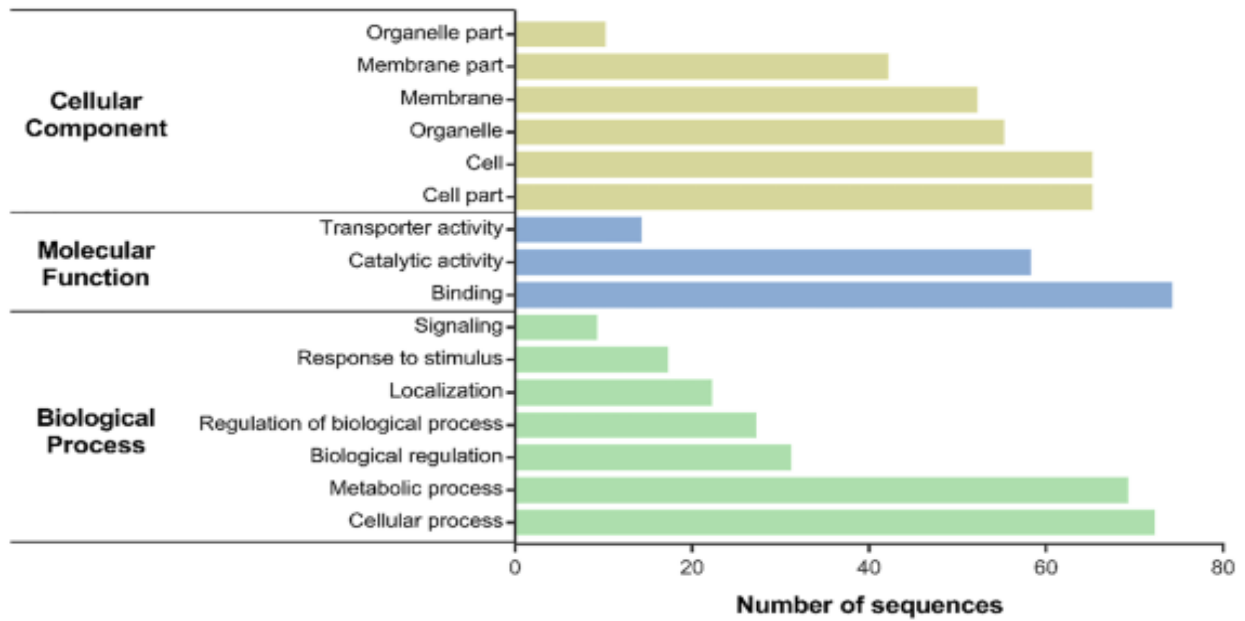
Untuk mengetahui peran miRNA yang terespon pada akar, dilakukan analisis ekspresi diferensial antara kontrol dan perlakuan infeksi.pada keseluruhan famili miRNA yang diketahui. Perbedaan ekspresi antara inokulan R1 (kontrol dan perlakuan) memiliki nilai ekspresi diferensial yang lebih kecil dibandingkan inokulan TR4 (kontrol dan perlakuan) (Gambar 3). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman yang diinfeksi dengan ras TR4 menunjukkan perubahan regulasi pada tingkat transkrip yang lebih besar dibandingkan dengan saat diinfeksi oleh ras R1. Selain itu, ekspresi miR396 (c dan f) khas mengalami penurunan pada infeksi yang dilakukan TR4, sedangkan miR408-3p tereduksi pada saat diinfeksi oleh R1 maupun TR4. Secara keseluruhan, miR156, miR159, dan miR166 menunjukkan perbedaan yang signifikan secara konsisten antara tanaman pisang kontrol dan yang diinfeksi baik oleh R1 maupun TR4.



Gambar 3 Ekspresi diferensial miRNA pada tiap kelompok perlakuan. Peningkatan ekspresi yang lebih tinggi pada TR4 (infeksi dan mock) dibandingkan R1 (infeksi dan mock) (Fei *et al.* 2019).

Prediksi gen target dari miRNA

Total miRNA yang telah teridentifikasi (279) dan novel miRNA (365) kemudian dilihat prediksi target gen yang diregulasinya menggunakan program psRNATarget yang selanjutnya dianalisis fungsi gen tersebut melalui analisis gene ontology. Hasil prediksi gen target dan perannya (fungsional gen) dapat dikelompokkan menjadi 3 kategori, yaitu komponen seluler (terdiri atas 6 fungsi), fungsi molekuler (3 fungsi), dan fungsi biologis (7 fungsi) (Gambar 4).

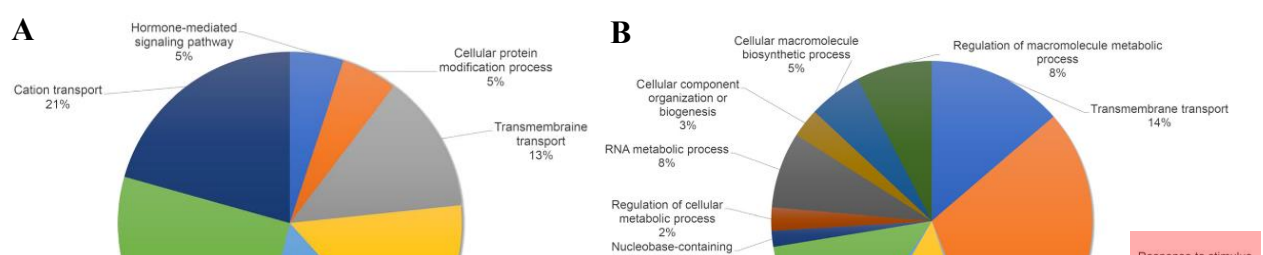


Gambar 4 Analisis fungsi gen berdasarkan Gene Ontology yang menjadi target miRNA yang teridentifikasi dari database yang sudah ada (Fei *et al.* 2019).

Meskipun perbedaan kategori dan kelompok fungsi gen yang ditarget antara miRNA yang telah diketahui dari database dibandingkan dengan novel miRNA yang berhasil diprediksi hanya sedikit (Tabel 1), namun distribusi yang terjadi di dalam kategori dan kelompok ‘proses biologis’ terlihat berbeda antar kedua kelompok miRNA tersebut. Kelompok miRNA novel lebih beragam dalam menyasar gen target, yang ditandai dengan lebih banyaknya fraksi fungsi gen target (Gambar 5). Selain itu, kelompok miRNA yang sudah diketahui dari database memiliki persentase tertinggi pada fungsi regulasi transkripsi DNA template sebesar 25%, sedangkan untuk kelompok miRNA novel persentase tertinggi pada fungsi merespon stimulus sebesar 30%. Hal ini menjadi indikasi bahwa telah terjadi proses regulasi miRNA dan ekspresi gen target sebagai respon tanaman pisang terhadap infeksi *Foc*.

Tabel 2. Perbedaan jumlah kelompok fungsi gen dalam kategori fungsional gen yang dianalisis

Kategori fungsi Gen	miRNA diketahui (kelompok)	miRNA novel (kelompok)
Komponen Seluler	6	7
Fungsi Molekuler	3	3
Proses Biologis	7	7

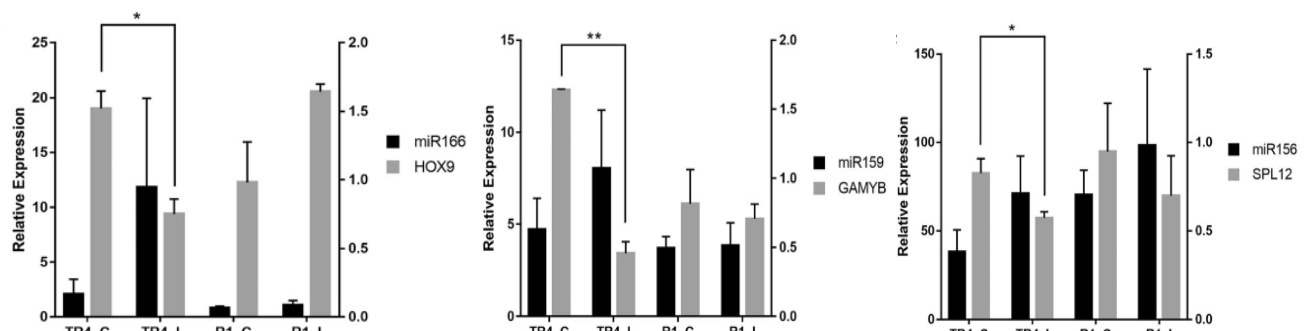


Gambar 5 Distribusi fungsi gen target berdasarkan gene ontology pada kategori “proses biologis” pada miRNA yang sudah diketahui dari database (a), dan novel miRNA (B) (Fei *et al.* 2019).

Validasi ekspresi miRNA dan gen target

Proses validasi antara ekspresi miRNA dan ekspresi gen target dilakukan dengan analisis q(RT)-PCR. 3 famili miRNA dengan nilai ekspresi diferensial yang konsisten antara kontrol dan perlakuan infeksi berdasarkan hasil sekuensing yang dipilih adalah miR159, miR156, dan miR166. Sebagai kontrol internal miRNA digunakan miR399 yang berdasarkan Muthasamy *et al.* (2015) merupakan miRNA dengan tingkat ekspresi yang konstan pada seluruh organ tanaman pisang dan kondisi stres maupun tidak. Sedangkan untuk kontrol internal gen target digunakan gen *L2* sesuai dengan hasil penelitian sebelumnya (Podevin *et al.* 2012). Berdasarkan hasil mapping miRNA pada refseq transkrip pisang, diperoleh bahwa gen *HOX9*, *GAMYB*, dan *SPL12* berturut-turut merupakan target dari miR166, miR159, dan miR156.

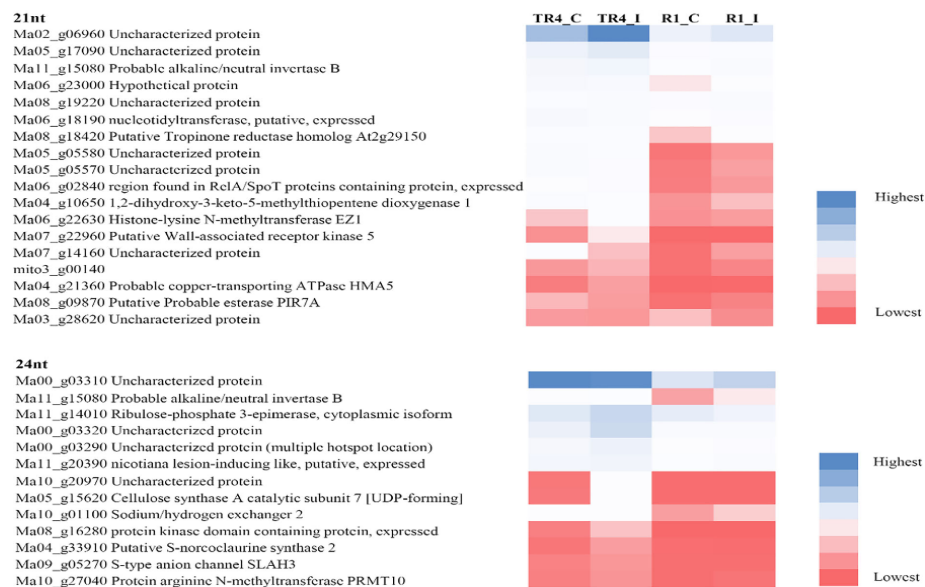
Hasil qPCR menunjukkan profil yang konsisten dengan hasil *deep sequencing* (Gambar 6). Gen *HOX9* mengalami penurunan ekspresi akibat tingginya ekspresi miR166 terutama pada infeksi yang dilakukan oleh TR4 sebagai ras yang agresif terhadap Cavendish, sedangkan pola ekspresi saat diinfeksi R1 tidak menunjukkan penghambatan ekspresi *HOX9* akibat tidak adanya peningkatan miR166. Pola ekspresi *GAMYB* juga menunjukkan hal yang sama dengan *HOX9* bahkan dengan tingkat signifikansi yang lebih tinggi saat diinfeksi oleh TR4 dan terlihat bedanya juga dengan saat diinfeksi oleh R1. Gen *SPL12* pola ekspresinya juga memiliki kesamaan dengan pola *HOX9* pada saat diberi infeksi TR4 dan R1, namun hanya infeksi TR4 yang menunjukkan perbedaan signifikan antara kontrol dan perlakuan. Dari ketiga miRNA yang diujikan, terlihat bahwa miR159 memiliki peran yang paling signifikan terhadap kerentanan pisang terhadap TR4.



Gambar 6 Validasi q(RT)-PCR pada 3 miRNA terpilih beserta prediksi gen targetnya (Fei *et al.* 2019). Tanda * menunjukkan signifikansi pada p-value < 0.05 dan ** pada p-value < 0.01.

Eksplorasi respon siRNA dalam merespon infeksi *Foc*

Eksplorasi lebih lanjut dari peran siRNA endogen yang merespon infeksi *Foc* pada pisang dilakukan dengan memetakan (*mapping*) library sRNA dari hasil deep sequencing pada sekuen referensi genom pisang yang memiliki intron dan UTR. Distribusi jumlah reads hasil dari sekuensing yang match sepanjang 21 dan 24 nukleotida dideteksi dan dibandingkan antar perlakuan (infeksi dan mock) dan disajikan dalam bentuk heatmap (Gambar 7).



Gambar 7 Peningkatan jumlah reads siRNA pada taraf kesamaan 21 dan 24 nukleotida pada genom pisang untuk keseluruhan perlakuan (Fei *et al.* 2019).

Jumlah reads terbanyak pada 21 dan 24 nukleotida menunjukkan protein yang belum dikarakterisasi (belum diketahui). Hal ini menunjukkan bahwa belum banyak bisa diketahui protein apa yang paling berperan dalam regulasi sRNA dalam kaitannya dengan respon pisang terhadap *Foc* dari studi yang dilakukan Fei *et al.* (2019). Fei *et al.* (2019) menduga untuk yang berukuran 21 nukleotida merupakan sekuen yang terdapat pada intron yang berperan dalam metilasi DNA, sedangkan untuk sekuen 24 nukleotida diprediksi sebagai hc-siRNA (heterochromatin si-RNA) yang berperan dalam remodelling kromatin. Namun dugaan ini masih harus dibuktikan lebih lanjut. Secara keseluruhan, terdapat perbedaan pola respon

tanaman saat terinfeksi R1 dan TR4, menunjukkan bahwa memang ada pola yang berbeda pada saat dua ras Foc menginfeksi. Sedangkan perbedaan pada kontrol bisa jadi disebabkan kondisi lokasi penanaman yang berbeda yang secara ekologis juga pasti akan berbeda.

KESIMPULAN

- Diperoleh 112 miRNA yang tergolong dalam 22 famili miRNA berdasarkan database miRBase dari keseluruhan library yang dikonstruksi dari akar pisang.
- Analisis ekspresi diferensial miRNA menunjukkan perbedaan signifikan pada 3 miRNA: miR156, miR159, dan miR166 pada kontrol dan pisang terinfeksi.
- Analisis fungsional gen target miRNA menunjukkan perbedaan pada kategori proses biologis dan terdapat cukup besar persentase miRNA novel yang berperan dalam respon terhadap stimulus.
- Validasi hasil qPCR pada 3 miRNA (miR166, miR159, dan miR156) dengan target gennya (*HOX9*, *GAMYB*, dan *SPL12*) konsisten dengan hasil sekuensing.
- Eksplorasi siRNA pada genom refseq pisang menunjukkan pola yang berbeda antara pisang terinfeksi dan kontrol dan ada pola yang berbeda pada TR4 dan R1, namun protein yang paling berperan masih belum diketahui.

DAFTAR PUSTAKA

- Castel SE, Martienssen RA. 2013. RNA interference (RNAi) in the nucleus: roles for small RNA in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet.*;14:100–12.
- Chen L, Luan Y, Zhai J. 2015. Sp-miR396a-5p acts as a stress-responsive genes regulator by conferring tolerance to abiotic stresses and susceptibility to *Phytophthora nicotianae* infection in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 34:2013–25.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX. 2018. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res* 46:w49–w54.
- Dita M, Barquero M, Heck D, Mizubuti ESG and Staver CP (2018) Fusarium Wilt of Banana: Current Knowledge on Epidemiology and Research Needs Toward Sustainable Disease Management. *Front. Plant Sci.* 9:1468. doi: 10.3389/fpls.2018.01468
- Fahlgren N, Howell MD, Kasschau KD, Chapman EJ, Sullivan CM, Cumbie JS, et al. 2007; High-throughput sequencing of Arabidopsis microRNAs: evidence for frequent birth and death of miRNA genes. *PLoS One.* 2:e219.
- Fei, S., Czislawski, E., Fletcher, S. *et al.* 2019. Small RNA profiling of Cavendish banana roots inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and tropical race 4. *Phytopathol Res* 1, 22. <https://doi.org/10.1186/s42483-019-0029-3>
- Fletcher SJ, Boden M, Mitter N, Carroll BJ. 2018. SCRAM: a pipeline for fast index-free small RNA read alignment and visualization. *Bioinformatics* 34:2670–2.
- Gordon A, Hannon G. 2010. Fastx-toolkit. FASTQ/A short-reads pre-processing tools. https://hannonlabcshtedu/fastx_toolkit.
- Guo L, Han L, Yang L, Zeng H, Fan D, Zhu Y, et al. 2014. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease. *PLoS One* 9:e95543.
- Li W, Wang X, Li C, Sun J, Li S, Peng M. 2019. Dual species transcript profiling during the interaction between banana (*Musa acuminata*) and the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *BMC Genomics* 20(1): 1-16. doi:10.1186/s12864-019-5902-z

- Muthusamy M, Uma S, Backiyarani S, Saraswathi MS. 2015. Computational prediction, identification, and expression profiling of microRNAs in banana (*Musa* spp.) during soil moisture deficit stress. *J Hortic Sci Biotechnol.* 89:208–14.
- Ouyang S, Park G, Atamian HS, Han CS, Stajich JE, Kaloshian I, et al. 2014. MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog* 10:e1004464
- Podevin N, Krauss A, Henry I, Swennen R, Remy S. 2012. Selection and validation of reference genes for quantitative RT-PCR expression studies of the non-model crop *Musa*. *Mol Breed* 30:1237–52.
- Smith LJ, Smith MK, Tree D, O’Keefe D, Galea VJ. 2008. Development of a small-plant bioassay to assess banana grown from tissue culture for consistent infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Australian Plant Pathol.* 37:171–9.