

**OPTIMASI PRODUKSI ENDOKITINASE
DARI JAMUR MIKOPARASIT *TRICHODERMA REESEI***

**OPTIMIZATION OF ENDOCHITINASE PRODUCTION
FROM MYCOPARASITIC FUNGI *TRICHODERMA REESEI***

Harjono dan S.M. Widyastuti
Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada
E-mail: forstect@ugm.ac.id

ABSTRACT

The objective of the experiment was to select optimal medium composition to induce endochitinase production of Trichoderma reesei. Growing media were prepared by substitution of 0.5% colloidal chitin, 0.5% colloidal chitin and 1% Polyvinyl Pyrrolidon (PVP), 1% crab shell chitin (Sigma), 1% crab shell chitin and 1% PVP into Richard's Medium (RM). Selected bioagent T. reesei isolate 13 was grown onto the media and the specific activity of endochitinase was measured. The results showed that T. reesei grown in all media performed enzyme expression. The highest specific activity of endochitinase was detected on T. reesei grown in RM medium substituted with colloidal chitin and PVP, followed by the same fungi in RM medium substituted with crab shell chitin plus PVP, colloidal chitin and crab shell chitin alone.

Key words: endochitinase, Trichoderma reesei, mycoparasite

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan komposisi medium pertumbuhan yang paling optimal dalam menginduksi produksi endokitinase dari *Trichoderma reesei*. Medium pertumbuhan disiapkan dengan mensubstitusi sumber karbon, yaitu 0,5% koloidal kitin, 0,5% koloidal kitin + 1% Polyvinyl Pyrrolidon (PVP), 1% crab shell chitin (Sigma) dan 1% crab shell chitin + 1% PVP ke dalam medium Richard (MR). *T. reesei* isolat T13 ditumbuhkan ke dalam medium induksi tersebut dan diukur aktivitas spesifik endokitinasanya. Hasil penelitian menunjukkan *T. reesei* yang ditumbuhkan pada keempat medium induksi di atas mampu mengekspresikan endokitinase. Aktivitas spesifik endokitinase yang paling tinggi terdeteksi pada *T. reesei* yang ditumbuhkan pada MR + 0,5% koloidal kitin + PVP, diikuti MR + 0,5% koloidal kitin, MR + 1% crab shell chitin + 1% PVP dan MR + 1% crab shell chitin.

Kata kunci: endokitinase, *Trichoderma reesei*, mikoparasit

PENGANTAR

Trichoderma merupakan salah satu jamur yang potensial untuk dikembangkan sebagai agen pengendali hayati berbagai jamur patogen tular tanah. Mekanisme yang selama ini dikenal dalam pengendalian hayati adalah parasitisme, antibiosis dan kompetisi. Dari ketiga hal tersebut, mikoparasitisme merupakan mekanisme

yang paling berperan pada *Trichoderma* (Lorito, 1998). Jamur ini diketahui mempunyai kemampuan mikoparasitik terhadap jamur lain dengan menghasilkan berbagai macam enzim litik, terutama kitinase dan glukukanase (Harman *et al.*, 1993). Endokitinase *Trichoderma* mempunyai daya hambat paling tinggi terhadap perkembangan jamur patogen dibandingkan enzim litik yang lain (de La Cruz *et al.*, 1993).

Pada penelitian sebelumnya telah berhasil didapatkan *T. reesei* isolat T13 yang efektif menghambat perkembangan jamur akar *Ganoderma philippii* (Widyastuti *et al.*, 1998a), *Ganoderma* spp. (Widyastuti *et al.*, 1999) dan *Rigidoporus microporus* (Widyastuti *et al.*, 1998b). Informasi mengenai peranan endokitinase dalam penghambatan jamur patogen tersebut perlu diketahui untuk pemanfaatan *T. reesei* lebih lanjut sebagai agen pengendali hayati. Salah satu langkah awal adalah mencari kondisi medium yang paling optimal untuk produksi endokitinase *T. reesei*.

BAHAN DAN METODE

Medium. Medium Richard (MR) digunakan sebagai medium minimal mengacu pada modifikasi Harman *et al.* (1993). Dalam penelitian ini digunakan 4 macam modifikasi MR, yaitu: (A) MR + 0,5% koloidal kitin, (B) MR + 0,5% koloidal kitin + 1% *Polyvinyl Pyrrolidon* (PVP), (C) MR + 1% *crab shell chitin* (Sigma), dan (D) MR + 1% *crab shell chitin* + 1% PVP. Koloidal kitin dibuat dari *crab shell chitin* menggunakan metode Vessey & Pegg (1973) yang telah dimodifikasi.

Kondisi pertumbuhan. Kondisi pertumbuhan yang digunakan pada penelitian ini merupakan modifikasi dari metode de La Cruz *et al.* (1995). Setiap 100 ml medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) dalam tabung Erlenmeyer kapasitas 250 ml diinokulasi dengan 5 ml suspensi spora *T. reesei* (konsentrasi 5×10^7 spora ml⁻¹) yang sebelumnya telah ditumbuhkan selama 7 hari pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA). Kultur diinkubasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 30°C. Setelah berumur 3 hari, kultur dipanen menggunakan sentrifuse dengan kecepatan 3.000 rpm, pada suhu 4°C selama 10 menit. Selanjutnya endapan miselium yang didapatkan dibilas 3 kali dengan air steril. Setiap kali pembilasan, endapan miselium disentrifus dengan kondisi yang sama dengan sentrifugasi

pertama. Miselium dari tiap 100 ml PDB yang telah bersih dari medium kemudian ditanam pada keempat MR yang telah dimodifikasi dan diinkubasi pada *rotary shaker* berkecepatan 150 rpm pada suhu 30°C dengan penambahan cahaya buatan dari lampu TL 20 watt selama masa inkubasi. Kurva pertumbuhan *T. reesei* dibuat berdasarkan berat kering konstan miselium yang dicuplik dari medium setiap 24 jam.

Penyiapan filtrat kultur. Filtrat kultur disiapkan mengacu pada metode Harman *et al.* (1993). Filtrat kultur yang diperoleh dipekatkan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan 40% dan didialisis menggunakan bufer potasium fosfat 0,05 M.

Aktivitas enzim dan kuantifikasi kandungan protein total. Aktivitas enzim diukur menggunakan metode turbidimetri (Harman *et al.*, 1993) berdasarkan pengurangan tingkat kekeruhan koloidal kitin pada serapan 510 nm dibandingkan kontrol (larutan koloidal kitin tanpa enzim). Kandungan protein total diukur dengan metode Hartree-Lowry (Hartree, 1972).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada percobaan awal, medium induksi diinokulasi langsung dengan spora *T. reesei*, tetapi ternyata tidak mampu tumbuh dengan baik, sehingga selanjutnya inokulasi ke dalam medium induksi dilakukan dengan miselium. Ketidakmampuan spora *T. reesei* untuk tumbuh langsung pada medium induksi diduga karena kitin merupakan sumber karbon kompleks, sehingga tidak dapat digunakan secara langsung oleh spora untuk mendukung perkembangan awalnya. Penelitian yang dilakukan oleh Manczinger & Polner (1985) menunjukkan bahwa ada hubungan spesifisitas antara substrat pertumbuhan dengan spesies *Trichoderma*. Selain itu untuk pertumbuhan dan perkembangannya, spora *Trichoderma* memerlukan prakondisi nutrisi dari lingkungan luar (Danielson & Davey, 1973).

Uji aktivitas enzim menunjukkan tidak adanya aktivitas endokitinase pada filtrat kultur yang berasal dari medium PDB dengan dekstrose sebagai sumber karbon (Tabel 1). Hal ini mendukung penelitian-penelitian sebelumnya, bahwa endokitinase merupakan enzim yang bersifat inducibel dengan adanya kitin dan atau derivatnya, serta tidak terekspresi dengan adanya glukosa dan sumber karbon lain yang lebih sederhana (Lorito, 1998).

Dari keempat medium induksi yang digunakan, medium B merupakan medium yang paling baik untuk produksi endokitinase (Tabel 1), dengan aktivitas spesifik endokitinase 0,020 unit per μg protein.

Medium D juga mampu menginduksi produksi endokitinase cukup tinggi (0,015 unit per μg protein), tetapi tidak dapat digunakan untuk mengetahui kurva pertumbuhan *Trichoderma* selama inkubasi. Hal ini disebabkan *crab shell chitin* berbentuk serbuk kasar tidak larut yang akan menimbulkan bias saat pengukuran berat kering miselium. Penambahan PVP mampu meningkatkan produksi endokitinase. Tronsmo & Harman (1993) yang memproduksi endokitinase pada *T. harzianum* juga menemukan bahwa penambahan PVP meningkatkan jumlah dan aktivitas enzim.

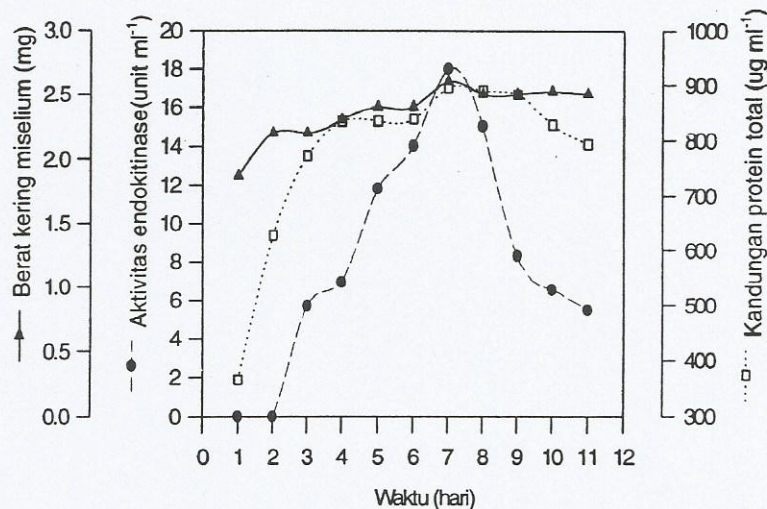
Tabel 1. Aktivitas spesifik endokitinase *T. reesei* umur 7 hari pada beberapa medium tumbuh

Medium	Aktivitas spesifik endokitinase [unit (μg protein) ⁻¹] ^{**}
(A) MR + 0,5% koloidal kitin	0,011 b
(B) MR + 0,5% koloidal kitin + 1% PVP	0,020 a
(C) MR + 1% <i>crab shell chitin</i>	0,006 c
(D) MR + 1% <i>crab shell chitin</i> + 1% PVP	0,015 b
(E) PDB	*

Keterangan: * Hasil uji aktivitas enzim pada filtrat kultur

♦ Angka yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata pada Uji Beda Nyata Jujur ($\alpha = 0,05$)

* Tidak terdeteksi



Gambar 1. Hubungan antara waktu, aktivitas endokitinase dan pertumbuhan *T. reesei* pada medium B.

Produksi endokitinase tidak berhubungan dengan pertumbuhan jamur dan meningkat secara kontinu seiring dengan protein total ekstraseluler sampai hari ketujuh. Mulai hari kedelapan, aktivitas endokitinase menurun dengan cepat, sedangkan kandungan protein total ekstraseluler pada medium relatif konstan (Gambar 1). Dari profil protein pada *SDS-Page*, diketahui terjadi perubahan jenis protein dominan yang disekresikan oleh *T. reesei*, dari endokitinase digantikan oleh jenis protein lain.

KESIMPULAN

1. Komposisi medium yang paling baik untuk produksi endokitinase *T. reesei* adalah MR + 0,5% koloidal kitin + 1% PVP.
2. *T. reesei* isolat T13 memproduksi enzim endokitinase yang bersifat indusibel dengan adanya kitin atau derivatnya.
3. Aktivitas spesifik endokitinase pada filtrat kultur dicapai pada hari ketujuh.
4. Penambahan PVP mampu meningkatkan produksi endokitinase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan sebagian dana dari Proyek URGE dan SEAMEO-SEARCA *Thesis Grant*, untuk itu penulis mengucapkan terima kasih. Kepada Dr.Ir. S. Margino dan Ir. Sumardi, M.For.Sc., penulis mengucapkan terima kasih atas bantuan saran dan diskusinya.

DAFTAR PUSTAKA

Danielson, R.M. & C.B. Davey. 1973. Non-nutritional Factors Affecting the Growth of *Trichoderma* in Culture. *Soil Biol. Chem.* 5: 495-504.

de La Cruz, J., J.A. Pintor-Toro, T. Benitez & A. Liobell. 1995. Purification and Characterization of an Endo- β -1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* that is Related to its Mycoparasitism. *J. Bacteriol.* 177: 1864-1871.

de La Cruz, J., M. Rey, J.M. Lora, A. Hidalgo-Gallego, F. Dominguez, J.A. Pintor-Toro, A. Liobell & T. Benitez. 1993. Carbon Source Control on β -glucanase, Chitinase and Chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.* 159: 316-322.

Harman, G.E., C.K. Hayes, M. Lorito, R.M. Broadway, A. Di Pietro, C. Peterbauer & A. Tronsmo. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. *Phytopathology* 83: 313-318.

Hartree, E.F. 1972. Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method that Gives a Linear Photometric Response. *Anal. Biochem.* 48: 422-427.

Lorito, M. 1998. Chitinolytic Enzymes and Their Genes, p. 73-99. In Harman, G.E., and C.P. Kubicek. *Trichoderma and Gliocladium Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Application*. Taylor and Francis, London.

Manczinger, L. & G. Polner. 1985. Cluster Analysis of Carbon Source Utilization Patterns of *Trichoderma* Isolates. *Sys. Appl. Microbiol.* 9: 214-217.

Tronsmo, A. & G.E. Harman. 1993. Detection and Quantification of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, Chitobiosidase and Endochitinase in Solutions and on Gels. *Anal. Biochem.* 208: 74-79.

Vessey, J.C. & G.F. Pegg. 1973. Autolysis and Chitinase Production in Cultures of *Verticillium albo-atrum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 60: 133-143.

Widyastuti, S.M., Sumardi, A. Sulthoni & Harjono. 1998a. Pengendalian Hayati Penyakit Akar Merah pada Akasia dengan *Trichoderma*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia* 4 (2): 65-72.

Widyastuti, S.M., Sumardi & N. Hidayati. 1998b. Kemampuan *Trichoderma* spp. untuk Pengendalian Hayati Jamur Akar Putih pada *Acacia mangium* secara *in vitro*. *Bul. Kehut.* 36: 24-38.

Widyastuti, S.M., Sumardi & Harjono. 1999. Potensi Antagonistik Tiga *Trichoderma* spp. terhadap Delapan Penyakit Akar Tanaman Kehutanan. *Bul. Kehut.* 41: 2-10.