

PEMURNIAN DAN KARAKTERISASI ENZIM ENDOKITINASE DARI AGEN
PENGENDALI HAYATI *TRICHODERMA REESEI*

*PURIFICATION AND CHARACTERIZATION ENDOCHITINASE ENZYME FROM
BIOCONTROL AGENT TRICHODERMA REESEI*

Harjono[†]) dan S.M. Widyastuti

Fakultas Kehutanan UGM

S. Margino

Fakultas Pertanian UGM

[†])Penulis untuk korespondensi, E-mail: forstect@ugm.ac.id

ABSTRACT

This experiment was aimed to purify and characterize the endochitinase of Trichoderma reesei. Extracellular endochitinase was produced by T. reesei strain T13, a fungal biocontrol agent in colloidal chitin medium as sole carbon source. The enzyme was purified by ammonium sulfate precipitation, followed by gel filtration chromatography and chromatofocusing. The results showed that T. reesei produced endochitinase with molecular weight of 32 kDa and the activity was optimum at pH of 5,5 and temperature of 30 to 35°C.

Key words: endochitinase, Trichoderma reesei

INTISARI

Penelitian ini bertujuan untuk memurnikan dan mengkarakterisasi endokitinase dari *Trichoderma reesei*. Enzim diproduksi dengan menumbuhkan jamur agen pengendali hayati *T. reesei* isolat T13 dalam medium yang mengandung koloidal kitin sebagai sumber karbon. Langkah pemurnian enzim meliputi pengendapan amonium sulfat, kromatografi gel filtrasi dan dilanjutkan dengan kromatofocusing. Hasil penelitian menunjukkan *T. reesei* menghasilkan endokitinase dengan berat molekul 32 kDa, serta mempunyai aktivitas optimum pada pH 5,5 dan suhu 30–35°C.

Kata kunci: endokitinase, *Trichoderma reesei*

PENGANTAR

Trichoderma spp. telah diketahui mempunyai kemampuan mikoparasitik yang tinggi dalam menghambat perkembangan jamur-jamur patogen tular tanah (Lorito *et al.*, 1993a, 1993b; Lorito, 1998; Widyastuti *et al.*, 1998a, 1998b, 1999, 2001). Dalam interaksi tersebut *Trichoderma* menghasilkan enzim-enzim litik pendegradasi dinding sel jamur inang (Harman *et al.*, 1993). Endokitinase (EC 3.2.1.14) merupakan enzim yang mempunyai aktivitas litik dan antifungal

yang paling tinggi dibandingkan enzim-enzim yang lain (de La Cruz *et al.*, 1993).

Harjono & Widyastuti (2001) telah berhasil mendeteksi endokitinase yang dihasilkan oleh *Trichoderma reesei* isolat T13 dalam jumlah yang cukup banyak pada filtrat kultur, melalui optimasi komposisi medium dan kondisi pertumbuhan yang lain. Untuk mengetahui peran endokitinase *T. reesei* dalam mikoparasitisme terhadap jamur-jamur patogen, perlu dilakukan pemurnian dan karakterisasi enzim tersebut.

BAHAN DAN METODE

Mikroorganisme dan kondisi pertumbuhan. *Trichoderma reesei* isolat T13 yang dikaji dalam penelitian ini merupakan koleksi Laboratorium Perlindungan Hutan, Fakultas Kehutanan UGM. Kondisi pertumbuhan yang paling optimal dicapai menggunakan metode Harjono & Widyastuti (2001). Kultur dipanen pada hari ketujuh dan filtrat kultur disiapkan mengacu pada metode Harman *et al.* (1993).

Uji aktivitas endokitinase. Aktivitas enzim diukur menggunakan metode turbidimetri berdasarkan pengurangan tingkat kekeruhan koloidal kitin pada nilai serapan panjang gelombang 510 nm (Harman *et al.*, 1993; Tronsmo & Harman, 1993).

Uji kandungan protein total. Kandungan protein total diukur menggunakan metode Hartree-Lowry (Hartree, 1972).

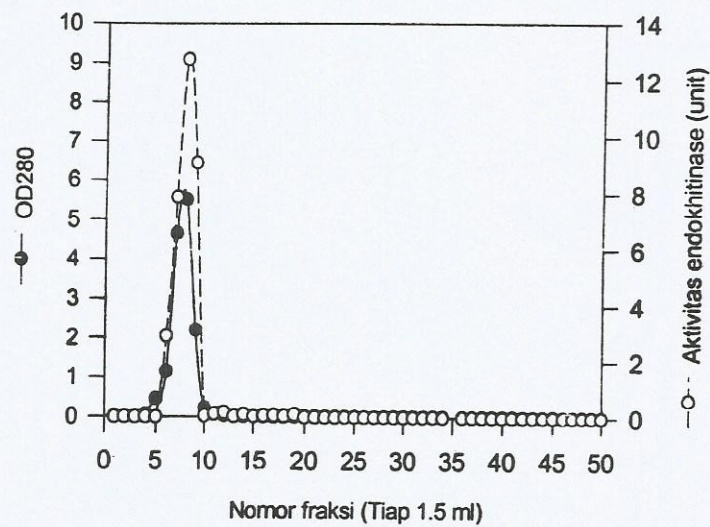
Pemurnian endokitinase. Semua langkah pemurnian dilakukan pada kondisi suhu 4°C, kecuali disebutkan lain. Filtrat kultur dipekatkan menggunakan amonium sulfat dengan tingkat kejenuhan akhir 40% (berdasarkan hasil percobaan pendahuluan), disentrifuse pada kecepatan 3.500 rpm selama 30 menit dan didialisis tiga kali, masing-masing selama 12 jam menggunakan bufer potasium fosfat 0,05 M, pH 6,7. Protein dalam dialisat dipisahkan lebih lanjut menggunakan kromatografi gel filtrasi dengan matriks Sephacryl-S300 (*Pharmacia Biotech*) (Harman *et al.*, 1993) pada kolom berukuran 1 x 20 cm (*Pharmacia Biotech*). *Start buffer* dan bufer elusi yang digunakan adalah potasium fosfat 0,05 M, pH 6,7. Fraksi dikoleksi setiap 1,5 ml dengan kecepatan alir 3 ml per jam. Fraksi-fraksi yang menunjukkan aktivitas endokitinase dikumpulkan, dipekatkan menggunakan PEG 35.000 (*Fluka*) dan selanjutnya diaplikasikan pada sistem kromatofokusing berisi matriks PBE 94 (*Pharmacia Biotech*) (Harman *et al.*, 1993) dalam kolom berukuran 1 x 20 cm

(*Pharmacia Biotech*). Kolom diekuilibrisasi dengan bufer imidazol HCl 0,025 M, pH 7,4 sebagai *start buffer*, dan dielusi dengan *Polybuffer 74* (*Pharmacia Biotech*) yang telah diencerkan dengan perbandingan 1 bagian *polybuffer* dan 8 bagian dH₂O. Fraksi dikoleksi setiap 1,5 ml dengan kecepatan alir 9 ml per jam. Fraksi-fraksi dengan aktivitas endokitinase dikumpulkan, dipekatkan dengan PEG 35.000 dan digunakan untuk karakterisasi lebih lanjut.

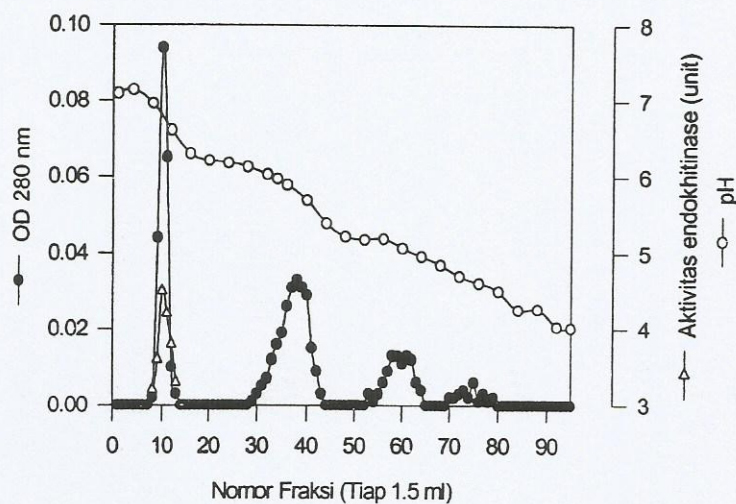
Karakterisasi endokitinase. SDS-PAGE 12,5% yang dibuat dengan mengacu pada metode dasar Laemmli (1970) digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian setiap tahap pemurnian dan untuk mengetahui berat molekul endokitinase. Protein divisualisasi dengan *Coomasive brilliant blue* (*Sigma*), sedangkan marker protein yang digunakan adalah *wide range molecular marker* (*Sigma*). Berat molekul endokitinase didapatkan dari persamaan regresi log berat molekul standart vs mobilitas relatif (rf). Suhu optimal diketahui dengan menginkubasikan enzim dan substrat pada kisaran suhu 20–80°C. Nilai pH optimal dicari pada kisaran pH 3–9 dalam larutan bufer yang merupakan campuran asam sitrat 0,05 M dan K₂HPO₄ sampai diperoleh kisaran pH yang dikehendaki (Harman *et al.*, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dialisat yang diaplikasikan ke dalam kolom gel filtrasi kromatografi hanya memberikan satu puncak protein berdasarkan serapan pada panjang gelombang 280 nm dan aktivitas endokitinasenya mengikuti pola puncak protein tersebut (fraksi 4–15). Kandungan protein total dan aktivitas endokitinase yang tertinggi terdapat pada fraksi ke-7 (Gambar 1). Hasil SDS-PAGE menunjukkan bahwa puncak tersebut ternyata masih terdiri dari beberapa pita protein (Gambar 3 lajur 3), yang berarti resolusi pemisahan kromatografi gel filtrasi yang digunakan belum optimal.



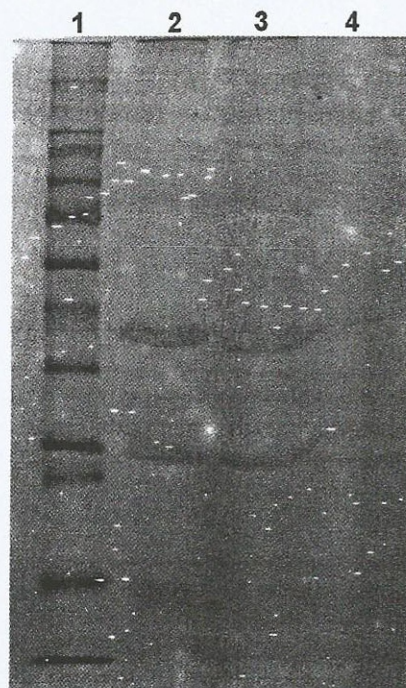
Gambar 1. Profil elusi pemurnian endokitinase menggunakan kromatografi gel filtrasi. Aktivitas tertinggi berada dalam fraksi ke-7.



Gambar 2. Profil elusi kromatofocusing. Aktivitas endokitinase hanya terdeteksi pada puncak pertama (fraksi 8-13).

Puncak tunggal dari fraksi ke-7 hasil kromatografi gel filtrasi terpisah lebih lanjut menjadi 4 puncak dominan setelah aplikasi pada sistem kromatofocusing. Uji aktivitas enzim menunjukkan hanya puncak pertama

(fraksi 8-12) yang memberikan reaksi positif (Gambar 2). Dari konfirmasi menggunakan SDS-PAGE terlihat puncak tersebut merupakan pita protein tunggal (Gambar 3 lajur 4) dengan aktivitas endokitinase.



Gambar 3. Profil protein ekstraseluler *T. reesei* pada SDS-PAGE 12,5%. Lajur 1: marker; lajur 2: filtrat kultur setelah pengendapan amonium sulfat dan dialisis; lajur 3: fraksi ke-7 hasil kromatografi gel filtrasi; lajur 4: kumpulan fraksi 8–13 hasil kromatofocusing yang merupakan enzim murni berberat molekul 32 kDa dengan aktivitas endokitinase. Jumlah protein yang diaplikasikan pada lajur 2 dan 3 adalah 5 μg protein, sedangkan pada lajur 4 adalah 1 μg protein.

Beberapa hasil penelitian sebelumnya membuktikan bahwa endokitinase merupakan isoenzim (isozim), sehingga satu jenis *Trichoderma* dapat menghasilkan berbagai macam protein dengan aktivitas endokitinase untuk mendegradasi substrat yang sama. (Harman *et al.* 1993; Lorito *et al.*, 1994; Lorito, 1998). Pada penelitian ini hanya didapatkan satu macam enzim dengan aktivitas endokitinase. Menurut Haran *et al.* (1996), respons strain *Trichoderma* dalam memproduksi enzim sangat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan tempat tumbuh.

Pemisahan dengan kromatografi gel filtrasi hanya menghasilkan tingkat

pemurnian yang rendah dibandingkan dengan hasil pengendapan amonium sulfat dan dialisis (Tabel 1). Kromatofocusing dapat mengurangi kandungan protein total dalam jumlah yang cukup banyak (kurang lebih 7,7 kali dari tahap sebelumnya), tetapi tidak terlalu mempengaruhi aktivitas endokitinase (berkurang dua kali dari tahap sebelumnya). Endokitinase murni diperoleh pada tingkat *recovery* 16,66 %, sehingga dapat dikatakan bahwa enzim ini merupakan protein yang disekresikan oleh *T. reesei* dalam jumlah relatif banyak dibandingkan dengan protein-protein yang lain.

Tabel 1. Rekapitulasi purifikasi endokitinase dari 1 liter filtrat kultur *T. reesei* a)

Langkah pemurnian	Protein total (mg)	Aktivitas endokitinase (unit) ^{b)}	Aktivitas spesifik (unit mg ⁻¹)	Tingkat pemurnian	Recovery (%)
Pengendapan amonium sulfat dan dialisis	806,90	13.070	16,20	1,00	100,00
Sephacryl-S300	228,35	13.070	19,22	1,19	33,59
Kromato-fokusing	29,68	2.178	73,36	4,52	16,66

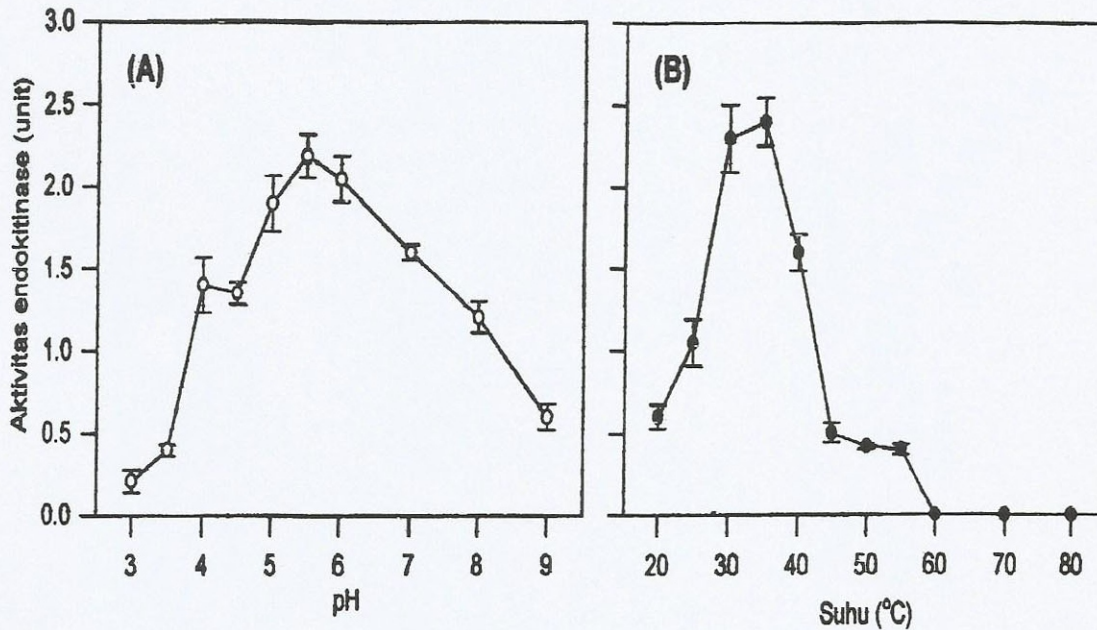
Keterangan: a) Data berasal dari satu kali rangkaian proses pemurnian. Jamur ditumbuhkan pada medium induksi yang mengandung 0,5% koloidal kitin sebagai sumber karbon utama dan dipanen pada umur 7 hari.

b) Satu unit enzim = jumlah enzim yang diperlukan untuk mereduksi 5% turbiditas (kekeruhan) koloidal kitin.

Pita protein tunggal pada gambar 3 lajur 4 diketahui mempunyai berat molekul 32 kDa berdasarkan kalibrasi persamaan regresi berat molekul protein standar. Lorito (1998) mengklasifikasikan enzim-enzim kitinolitik yang dihasilkan oleh *Trichoderma* menjadi dua kelompok besar, yaitu: kelompok I, yang meliputi enzim-enzim dengan berat molekul 60–70 kDa atau lebih (CHIT102, CHIT64, CHIT72 dan CHIT73), yang semuanya merupakan β -N-asetilglukosamidinase; dan kelompok II, yang merupakan enzim-enzim dengan berat molekul rendah (CHIT52, CHIT41, CHIT40, CHIT37, CHIT33, CHIT31 dan CHIT28), yang hampir semuanya merupakan endokitinase. Berdasarkan pembagian tersebut, endokitinase *T. reesei* termasuk enzim kelompok II, dan tidak menutup kemungkinan enzim tersebut

mempunyai berat molekul yang sama dengan CHIT31 atau CHIT33. Perbedaan protokol pemisahan sangat menentukan hasil karakterisasi enzim yang diisolasi (Haran *et al.*, 1995; Lorito, 1998).

Uji aktivitas endokitinase *T. reesei* pada pH yang bervariasi menunjukkan bahwa kisaran pH optimum enzim ini relatif lebar dengan aktivitas tertinggi dicapai pada pH 5,5 (Gambar 4A). Enzim-enzim endokitinase yang dihasilkan oleh *Trichoderma* umumnya mempunyai pH optimal pada kisaran asam, yaitu 4,0–5,5 (Lorito, 1998). Kisaran suhu optimal endokitinase *T. reesei* relatif sempit, yaitu yaitu 30–40°C (Gambar 4B). Lorito (1998) melaporkan bahwa endokitinase *T. harzianum* dengan berat molekul 33 kDa mempunyai kisaran suhu optimal 45–50°C dan tahan terhadap pemanasan.



Gambar 4. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas endokitinase. (A) Nilai pH optimal dicapai pada 5,5. (B) Suhu optimum dicapai pada kisaran 30–40°C. Masing-masing titik pengamatan menggunakan konsentrasi protein 20 µg/ml. Bar eror menggambarkan standar deviasi rata-rata dua ulangan percobaan.

KESIMPULAN

Endokitinase *Trichoderma reesei* mempunyai berat molekul 32 kDa dengan kisaran suhu optimal 30–40°C dan pH optimum 5,5.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan sebagian dana dari Proyek Beasiswa S-2 URGE dan SEAMEO-SEARCA Thesis Grant. Untuk itu penulis mengucapkan terima kasih.

DAFTAR PUSTAKA

- de La Cruz, J., M. Rey, J.M. Lora, A. Hidalgo-Gallego, F. Dominguez, J.A. Pintor-Toro, A. Llobell & T. Benitez. 1993. Carbon Source Control on β -glucanase, Chitinase and Chitinase from *Trichoderma harzianum*. *Arch. Microbiol.* 159: 316–322.
- Haran, S., H. Schickler, A. Oppenheim & I. Chet. 1995. New Components of the Chitinolytic System of *Trichoderma harzianum*. *Mycol. Res.* 99: 441–446.
- Haran, S., H. Schickler, A. Oppenheim & I. Chet. 1996. Differential Expression of *Trichoderma harzianum* Chitinases during Mycoparasitism. *Phytopathology* 86: 980–985.

- Harjono & S.M. Widyastuti. 2001. Optimasi Produksi Endokitinase dari Jamur Mikoparasit *Trichoderma reesei*. *J. Perlin. Tan. Ind.* 7 (1): 55–58.
- 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 Linier Photometric Response. *Anal. Biochem.* 48: 422–427.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during The Assembly of The Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lorito, M., G.E. Harman, C.K. Hayes, R.M. Broadway, A. Tronsmo, S.L. Woo & A. Di Pietro. 1993a. Chitinolytic Enzymes Produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal Activity of Purified Endochitinase and Chitobiosidase. *Phytopathology* 83: 302–307.
- Lorito, M., A. Di Pietro, C.K. Hayes, S.L. Woo & G.E. Harman. 1993b. Antifungal, Synergistic Interaction between Chitinolytic Enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Phytopathology* 83: 721–728.
- Lorito, M., C.K. Hayes, A. Di Pietro, S.L. Woo & G.E. Harman. 1994. Purification, Characterization and Synergistic Activity of A Glucan 1,3- β -glucosidase and An *N*-acetyl- β -glucosamidinase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 84: 398–405.
- Lorito, M. 1998. Chitinolytic Enzymes and their Genes, p. 73–99. In Harman, G.E. & C.P. Kubicek (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Application*. Taylor and Francis, London.
- Tronsmo, A. & G.E. Harman. 1993. Detection and Quantification of *N*-acetyl- β -D-glucosamidinase, Chitobiosidase and Endochitinase in Solution and on Gels. *Anal. Biochem.* 208: 74–79.
- Widyastuti, S.M., Sumardi, A. Sulthoni & Harjono. 1998a. Pengendalian Hayati Penyakit Akar Merah pada Akasia dengan *Trichoderma*. *J. Perlin. Tan. Ind.* 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.
- Widyastuti, S.M., Sumardi & P. Sumantoro. 2001. Efektivitas *Trichoderma* spp. sebagai Pengendali Hayati terhadap Tiga Patogen Tular Tanah pada Beberapa Jenis Tanaman Kehutanan. *J. Perlin. Tan. Ind.* 7 (2) : 98–107.