

V. DISKUSI DAN KESIMPULAN

V. 1. Diskusi

V.1.2. Produksi Kitinase

Kitinase termasuk enzim ekstraseluler, yaitu enzim yang dihasilkan di dalam sel, tetapi dikeluarkan ke medium tumbuhnya. Mikroba akan terinduksi untuk memproduksi enzim yang sesuai dengan sumber karbon yang diberikan. Oleh karena itu, untuk menginduksi *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 memproduksi enzim kitinase, maka diberikan substrat kitin sebagai sumber karbon. Kitin digunakan sebagai induser pada produksi kitinase. Menurut teori Jacob-Monod, induser mampu mengikat protein represor, sehingga protein represor menjadi tidak aktif untuk berikatan dengan gen operator. Akibatnya RNA polimerase dapat berikatan dengan gen promotor, karena letak gen promotor dengan gen operator berurutan dan akhirnya proses transkripsi dan translasi dapat berlangsung untuk menghasilkan enzim. Apabila ada represor aktif, maka represor aktif mengikat operator sedemikian rupa, sehingga RNA polimerase tidak akan dapat mengikat promotor, selanjutnya enzim atau protein yang diinginkan tidak akan terbentuk.

Isolasi enzim kitinase dilakukan dengan cara sentrifuga dalam keadaan dingin untuk memisahkan ekstrak enzim dengan sel jamur dalam media produksinya. Ekstrak enzim sebelumnya dimasukkan ke dalam lemari pendingin selama 30 menit, hal ini dilakukan karena tidak adanya sentrifuga dingin, apabila ada sentrifuga dingin, maka hal ini tidak perlu dilakukan. Hal ini dilakukan agar enzim yang dihasilkan selama waktu inkubasi tidak terdenaturasi, karena karena struktur kwarterner, tersier, dan sekunder dari enzim dapat rusak atau terdenaturasi sehingga enzim akan kehilangan fungsi biologisnya. Setelah didapat filtrat ekstrak kasar enzim, maka ekstrak kasar enzim tersebut disaring dengan menggunakan *Corning Sterile Syringe filter* 0,45 μm agar tidak ada lagi spora dan miselia jamur di dalam ekstrak kasar enzim. Miselia dari jamur dapat mengganggu aktivitas dari enzim. Selanjutnya ditambahkan 0,02% NaN_3 apabila enzim tidak langsung digunakan, hal ini dilakukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri penyebab kontaminasi.

V.1.3. Uji Aktivitas Kitinase dan Kadar Protein Media Produksi *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63

Penentuan aktivitas kitinase dari ekstrak kasar enzim dilakukan dengan menggunakan kitin koloidal. Kitin koloidal (SIGMA C-9752) adalah kitin yang telah mengalami perlakuan tambahan untuk membuang ion-ion dan kontaminan (protein, peptida dan pigmen). Penggunaan kitin koloidal sebagai substrat pada proses pengukuran aktivitas kitinase disamping lebih murni juga memiliki kelarutan yang lebih besar dibandingkan dengan kitin kulit kepiting preparatif. Karena substrat dalam bentuk koloid, enzim lebih mudah kontak dengan substrat pada permukaan yang lebih luas.

Aktivitas enzim menunjukkan kemampuan enzim mendegradasi substrat kitin menjadi N-asetilglukosamin yang dinyatakan dalam unit/ml enzim. 1 unit didefinisikan sebagai μmol gula pereduksi/menit. Sehingga semakin besar aktivitas kitinase menunjukkan besar jumlah gula pereduksi yang didegradasi per satu satuan waktu. Dari Tabel 2 dan 3 menunjukkan bahwa kemampuan kitinase dari jamur *T. asperellum* TNJ63 lebih besar dari TNC52 pada kedua tahap pemurnian yaitu Aktivitas kitinase *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 mengalami peningkatan setelah pemurnian Tahap II yaitu untuk *T. asperellum* TNC52 naik dari $(0,0058 \pm 0,0014)$ unit/ml menjadi $(0,0239 \pm 0,00619)$ unit/ml dan *T. asperellum* TNJ63 naik dari $(0,0135 \pm 0,0071)$ unit/ml menjadi $(0,0323 \pm 0,0012)$ unit/ml.

Pemurnian enzim pada Tahap I itu sendiri menggunakan *Corning Sterile Syringe Filter* $0,45 \mu\text{m}$ CA (Cat. No. 431220) dimana akan melewati filtrat dan partikel yang berukuran kecil dan sama dengan $0,45 \mu\text{m}$. Tahap ini juga sekaligus mensterilkan filtrat media produksi enzim dari zat yang dapat mengkontaminasi ekstrak kasar enzim. Pemurnian Tahap II adalah menggunakan ultrafiltrasi AMICON ULTRA $0,5 \text{ ml}$ Ultracel 10K membran Cat No. UFC501024 Lot No. R9ENO2784 yang dapat menampung protein yang berukuran 10 dalton dan melewati protein-protein kecil. Kitinase sendiri berukuran sekitar 10 dalton sehingga tertampung dalam tabung mikroultrasi tersebut. Aktivitas kitinase untuk kedua jamur mengalami peningkatan setelah proses ultrafiltrasi sekitar $0,018$ unit/ml. Hal ini dapat terjadi karena jumlah kitinase setelah pemurnian Tahap II

lebih banyak dengan faktor pemurnian 3,9 kali untuk kitinase *T. asperellum* TNC52 dan 1,5 kali untuk kitinase *T. asperellum* TNJ63. 2,3 kali untuk pemurnian Tahap I (dengan mikropor) dan 1,3 kali untuk pemurnian Tahap II (dengan ultrafiltrasi).

Kadar protein enzim ditentukan dengan metode Lowrey pada panjang gelombang 750 nm. Aktivitas spesifik enzim menunjukkan suatu ukuran kemurnian enzim. Semakin tinggi aktivitas spesifik enzim maka semakin tinggi juga tingkat kemurnian enzim tersebut. Aktivitas spesifik diperoleh dari aktivitas enzim dibagi dengan kadar protein yang dikandungnya.

Nilai kadar protein dan aktivitas spesifik kitinase *T. asperellum* TNC52 adalah 23,6145 mg protein dan 0,0159 unit untuk pemurnian Tahap I dan 3,1265 mg protein dan 0,0621 unit enzim untuk pemurnian Tahap II. Untuk kitinase *T. asperellum* TNJ63 memberikan nilai kadar protein dan aktivitas spesifik berturut-turut 20,2752 mg protein dan 0,0479 unit untuk pemurnian Tahap I dan 4,0356 mg protein dan 0,0720 unit untuk pemurnian Tahap II. Kadar protein dan aktivitas spesifik kedua jamur ini mengalami penurunan karena pemurnian Tahap II hanya melewatkan protein yang berukuran 10 dalton.

V.1.4. Uji antagonistik *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 terhadap beberapa jamur patogen tanaman

Kemampuan *Trichoderma* sp. untuk melindungi tanaman melibatkan beberapa mekanisme yang terkait dengan sifat biokimia spesies tersebut. Semua galur *Trichoderma* sp. merupakan fungi biokontrol efektif, akan tumbuh semakin baik di sekitar perakaran tanaman yang sehat, sehingga terjadi simbiose mutualistik antara fungi biokontrol dengan tanaman yang dilindungi. Mekanisme penyerangan terhadap patogen tanaman antara lain adalah melalui proses mikoparasitisme yang melibatkan produksi berbagai enzim (biokatalis) hidrolitik (Lorito *et al.*, 1993; Brunner *et al.*, 2003, Brunner *et al.* 2005, Suarez *et al.* 2004), dan sekresi senyawa antifungi, antibakteri, antinematoda (Vinale *et al.* 2006, Dong *et al.* 2005).

Mikoparasitisme sebagai salah satu mekanisme penyerangan fungi biokontrol terhadap fungi patogen, dipengaruhi kemampuan fungi biokontrol

menghasilkan enzim hidrolitik. Salah satu enzim yang penting tersebut adalah kitinase (Lu *et al.*, 2004, Viterbo *et al.* 2001). Kitin merupakan komponen penting dari dinding sel beberapa fungi patogen, sehingga kitinase yang diproduksi fungi biokontrol berfungsi mendegradasi dinding sel fungi patogen. Kitinase tersebut berdifusi ke dinding sel fungi patogen dan mematahkan atau melubangi dinding sel fungi patogen tersebut. Proses ini akan diikuti pelilitan fungi biokontrol pada miselia fungi patogen dan sekresi senyawa peptide kecil yang disebut peptaibol, yang akan melubangi membran sel fungi patogen (Harman *et al.*, 2004).

Beberapa fungi patogen menyerang tanaman perkebunan seperti *Ganoderma boninense* adalah fungi yang menyerang tanaman kelapa sawit, *Fusarium* sp. adalah fungi yang menyerang pisang, dan *Rhizoctonia solani* adalah fungi yang menyerang tanaman kapas, tembakau, dan timun. Oleh karena itu *T. asperellum* TNC52 dan TNJ63 diujikan aktivitas antagonistik terhadap ketiga fungi patogen di atas. Dari uji tersebut, terlihat bahwa ketiga fungi patogen mengalami penghambatan tumbuh. Hal mendukung adanya aktivitas kitinase yang didapatkan pada tahap sebelumnya.

V.1.5. Uji antijamur *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 terhadap beberapa jamur patogen tanaman

Uji antijamur memerlukan produksi kitinase dalam jumlah cukup besar. Hingga akhir Desember 2009, kitinase masih dalam tahap produksi yang diikuti pemurnian Tahap I dan Tahap II. Sehingga data antijamur belum bisa dilaporkan. Data tersebut akan dimasukkan pada publikasi hasil penelitian ini di jurnal terakreditasi nasional.

V.2. Kesimpulan

Jamur biokontrol *Trichoderma asperellum* TNC52 dan TNJ63 galur lokal Riau koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau dapat menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman *Ganoderma boninense*, *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani*. Hal ini didukung dari adanya aktivitas kitinase dari jamur biokontrol tersebut dimana *T. asperellum* TNJ63 memiliki aktivitas kitinase dan

aktivitas spesifik enzim lebih besar dibandingkan *T. asperellum* TNC52.
Pemurnian lebih lanjut dapat meningkatkan aktivitas enzim hingga 2-4 kali lipat.