

ENG ... Amplified ...
PENGUJIAN AKTIVITAS KITINASE DARI *Bacillus circulans*
UNTUK DIKEMBANGKAN SEBAGAI AGEN BIOKONTROL
PADA PENYAKIT TANAMAN

Muharni dan Elisa Nurnawati

Abstrak : *Bacillus circulans* mempunyai kemampuan memproduksi kitinase secara ekstraseluler, aktivitas kitinase ini dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan fungi patogen karena mempunyai kitin pada dinding selnya. Untuk itu pada penelitian ini dilakukan pengujian aktivitas kitinase baik secara kualitatif maupun kuantitatif, serta kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen pada tanaman. Berdasarkan hasil yang telah didapatkan diketahui bahwa *B. circulans* memproduksi kitinase tertinggi pada akhir fase eksponensial yaitu pada jam ke 20 sebesar 0,58 U/ml. Hasil uji antagonisme terhadap fungi patogen *Fusarium oxysporum* dan *Rhizoctonia solani*. ternyata *B. circulans* hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur *Rhizoctonia solani* dengan zona hambat sebesar 0,65 cm.

Kata kunci : Kitinase, *Bacillus circulans*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*

Abstract : *Bacillus circulans* has an ability to produce extra cellular chitinase. Pathogenic fungal growth is being inhibited by chitinase activity because of its cell wall chitin. Therefore, the test of qualitative and quantitative activity of chitinase and its ability to prevent *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* growth has been done. The result showed that production *B. circulans* chitinase was highest on the end of exponential phase that is 0.58 U/ml on 20th hours. Antagonism test toward *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* showed that *B. circulans* just only hampered *Rhizoctonia solani* growth. The inhibition zone of *B. circulans* was 0.65 cm.

Key words : Chitinase, *Bacillus circulans*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*

PENDAHULUAN

Kitin merupakan homopolimer yang tersusun dari N-asetil-D-glukosamin dengan ikatan β -1,4 yang terdapat berlimpah di alam setelah selulosa. Secara umum kitin banyak terdapat pada integumen insekta, crustacea, nematoda dan beberapa protozoa serta merupakan komponen utama

penyusun dinding sel fungi (Folders *et. al.*, 2001).

Kitinase adalah enzim yang mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin, degradasi kitin dapat dilakukan oleh organisme kitinolitik dengan melibatkan enzim kitinase. Organisme pendegradasi kitin umumnya berasal dari kelompok mikroorganisme diantaranya adalah dari

kelompok bakteri. Bakteri yang dilaporkan memiliki aktivitas kitinolitik adalah seperti, *Vibrio furnissi* (Hirano, 1996), *Serratia marcescens* (Suzuki *et.al.*, 1999), *Bacillus circulans* (Watanabe *et. al.*, 1999), *Bacillus thuringensis* subsp. pakistani (Thamthiankul *et.al.*, 2001) dan *Pseudomonas aeruginosa* (Folders *et. al.*, 2001).

Kitinase mempunyai banyak manfaat dalam berbagai aspek terutama dalam bidang industri, bioteknologi, dan pertanian. Kitinase dapat digunakan sebagai agen biokontrol dalam bidang pertanian, misalnya pada penyakit tanaman oleh jamur dan serangga hama tanaman (Thamthiankul *et.al.*, 2001). Kitinase dapat memproduksi kito-oligosakarida (GlcNac)_n yang cukup potensial dalam menghasilkan senyawa aktif sehingga bermanfaat dalam bidang kedokteran, seperti sebagai agen anti bakteri, elisitor, sebagai induser lisozim dan meningkatkan imunitas (Wen *et.al.*, 2002).

Aktivitas kitinase dari bakteri sangat potensial digunakan sebagai agen biokontrol terhadap fungi patogen maupun serangga hama yang umumnya mempunyai komponen kitin pada dinding selnya (Hirano, 1996). Beberapa laporan menyatakan bahwa aktivitas kitinase dari *Aeromonas caviae* efektif digunakan untuk mengontrol serangan fungi patogen *Rizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum* pada kapas. Pada program pengendalian penyakit dan hama terpadu, pemanfaatan

musuh alami yang banyak dikembangkan adalah dari golongan bakteri.

Pentingnya peranan aktivitas kitinase pada bidang pertanian menyebabkan pengkajian yang intensif terhadap ekspresi gen kitinase, regulasinya dan kloning gen kitinase untuk memperoleh produksi enzimnya. Gen kitinase sangat berpotensi untuk dimanfaatkan dalam mengkonstruksi galur-galur biokontrol atau tanaman transgenik yang dapat mencegah timbulnya penyakit yang disebabkan oleh fungi (Panda, 1999).

Penggunaan fungisida kimia sintetik dalam mengendalikan hama dan penyakit tanaman mempunyai dampak negatif terhadap lingkungan, maka alternatif pengendalian perlu terus dicari dan dikembangkan diantaranya pengendalian dengan menggunakan musuh alami seperti bakteri.

Aktivitas kitinase bakteri kitinolitik seperti, *B. circulans* sangat potensial digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman, karena organisme ini memiliki komponen kitin pada dinding selnya. Salah satu upaya yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah menguji kemampuan *B. circulans* dalam memproduksi kitinase serta kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen pada tanaman.

METODE PENELITIAN

Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Agustus 2005 sampai Januari 2006, di Lab. Genetika dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, strain *B. circulans*, strain *Fusarium oxysporum* dan *Rizoctonia solani* yang diperoleh dari Laboratorim Hama dan Penyakit Tanaman Pertanian Unsri, Media agar kitin (Koloidal kitin 0,3 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 %, K_2HPO_4 0,02 %, Ekstrak yeast 0,1 % dan Bacto agar 1,5 %) dan Media produksi enzim kitinase (Koloidal kitin 0,3 %, Pepton 1 %, Ekstrak yeast 0,5 %, NaCl 0,1 %, K_2HPO_4 0,1 %, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 %, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %, $Zn FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,001 %, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,0001 %, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,0001 %, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,0001 %), Media NA, Media PDA, kertas saring dan kertas pH.

Alat yang digunakan adalah, cawan petri, tabung reaksi, erlemeyer, autoklaf, jarum ose, pipet mikro, pipet tetes, pH meter, shaker, water bath, oven, spektrofotometer, dan sentrifugasi,

CARA KERJA

Perbanyak kultur bakteri

Perbanyak biakan bakteri dilakukan pada medium NA dengan menggunakan jarum ose. Biakan disimpan di dalam inkubator pada suhu 30 °C selama 24 jam.

Uji Kualitatif Aktivitas Kitinase

Pengujian aktivitas kitinase secara kualitatif dilakukan dengan cara menumbuhkan *B. circulans* pada media agar kitin dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30 °C. Aktivitas kitinase ditandai dengan

adanya zona bening disekitar koloni bakteri.

Pengukuran Pertumbuhan *B. circulans* dan Produksi Enzim

Koloni tunggal *B. circulans* diinokulasikan ke dalam masing 25 ml media produksi dan diaktivasi selama 3 kali pada shaker dengan kecepatan 150 rpm dan suhu ruang. Dipindahkan 50 ml kultur ke dalam 450 ml media produksi, dan diinkubasi dengan kecepatan 150 rpm dan suhu ruang. Pengambilan sampel dilakukan se-tiap 4 jam sampai jam ke 48. Pertumbuhan sel diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm.

Isolasi Ekstrak Kasar Kitinase

Isolasi enzim dilakukan dengan mengambil 1 ml kultur cair setiap 4 jam sekali selama 48 jam. Supernatan dipisahkan dari endapan melalui sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Supernatan adalah merupakan ekstrak kasar kitinase.

Pengujian Aktivitas Kitinase Secara Kuantitatif

Pengujian aktivitas kitinase dilakukan dengan menggunakan metode Folders *et. al.* (2001) yaitu dengan cara mereaksikan larutan substrat koloidal kitin 0,3 % sebanyak 1 ml, 2 ml bufer asetat pH 5,2 dan 1 ml filtrat enzim dimasukkan kedalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama satu jam. Supernatan dipisahkan dari endapan melalui sentrifugasi pada

kecepatan 5000 rpm. Aktivitas enzim diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm. Satu unit aktivitas kitinase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menyebabkan pengurangan absorbansi sebesar 0,001 campuran reaksi per menit.

Uji Antagonisme Terhadap Fungi Patogen

B. circulans diuji kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen *Fusarium oxysporum* dan *Rizoctonia solani*. *B. circulans* diperbanyak pada media NA selama 48 jam. Sedangkan miselia fungi patogen diperbanyak pada media PDA di dalam cawan petri. Biakan *F. oxysporum* dan *R. solani* diinkubasi selama 3 hari. Uji antagonisme dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode Chernin, *et. al.*, (1995) pada media PDA di dalam cawan petri. Koloni fungi diinokulasikan di tengah-tengah media, dan inokulum bakteri ditotolkan disekelilingnya dengan jarak 2 cm. Biakan diinkubasikan pada suhu kamar, kemudian diamati pertumbuhan fungi patogen dengan mengukur diameter zona bening disekitar koloni bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan terhadap aktivitas kitinase baik secara kualitatif maupun secara kuantitatif telah didapat hasil seperti yang tertera dibawah ini :

Pengujian aktivitas kitinase secara kualitatif

Kemampuan *Bacillus circulans* untuk menghasilkan kitinase dapat diamati pada media yang mengandung kitin, adanya zona bening disekitar koloni menunjukkan adanya aktivitas kitinase dari bakteri tersebut, seperti yang dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 1. Uji kualitatif aktivitas kitinase

(1) *Bacillus* sp. M2.1 , (2) *Bacillus circulans*

Pada gambar diatas dapat dilihat bahwa masing-masing bakteri mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam menghasilkan kitinase, dimana *Bacillus circulans* mempunyai kemampuan yang lebih tinggi bila dibandingkan dengan *Bacillus* sp. M2.1.

Hal ini dapat dilihat dari luasnya zona bening yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri. Terjadinya perbedaan ini mungkin disebabkan jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari masing-masing bakteri berbeda-beda.

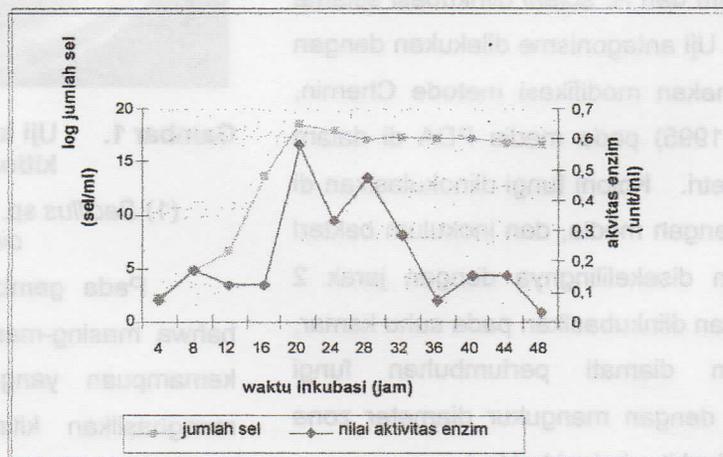
Seperti yang telah dinyatakan oleh Susi (2002), besarnya zona bening yang dihasilkan tergantung pada jumlah monomer N-asetilglukosamin yang dihasilkan dari proses hidrolisis kitin dengan memutuskan ikatan β -1,4 homopolimer N-asetilglukosamin. Semakin besar jumlah monomer yang dihasilkan N-asetilglukosamin yang dihasilkan maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk disekitar koloni.

Kitin yang ditambahkan ke dalam medium pertumbuhan *Bacillus circulans* berfungsi sebagai substrat kitinase. Kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhan bakteri dapat merangsang produksi kitinase. Sebagaimana yang

sudah dijelaskan oleh Boing 1982 dalam Susi (2002), keberadaan suatu substrat dapat memacu suatu mikroorganisme untuk mensekresikan metabolit selnya. Enzim akan bereaksi bila terdapat substrat. Interaksi yang terjadi antara enzim dan substrat ini akan menghasilkan produk akhir yang merupakan gabungan dari reaksi enzim-substrat yang berpengaruh pada struktur molekul katalitik enzim.

Pengukuran Pertumbuhan dan Produksi Kitinase *B. circulans*.

Hasil pengukuran pertumbuhan dan produksi kitinase *B. circulans* selama 48 jam dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 2. Pertumbuhan dan Produksi Kitinase *Bacillus circulans*

Pada gambar diatas dapat dilihat bahwa kitinase pada *B. circulans* diproduksi mulai pada jam ke 4 dan tertinggi didapat jam ke 20 yaitu 0,58 U/ml, setelah jam ke 20 aktivitas kitinase terus menurun. Hal ini menunjukkan bahwa *B. circulans* memproduksi kitinase selama fase eksponensial,

dimana kitin dihidrolisis sebagai sumber karbon dan nitrogen untuk pertumbuhannya. Kane dan Kandel (1998) menyatakan bahwa, fase eksponensial ini nutrisi tersedia dalam jumlah yang banyak, sehingga sel berkembang biak dengan cepat dan mensekresikan berbagai metabolit primer

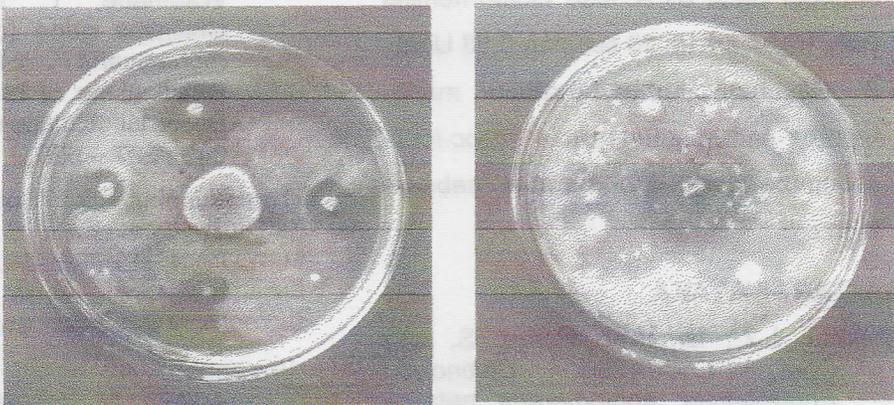
berupa enzim untuk menyediakan sumber karbon dan nitrogen (sumber energi) untuk pertumbuhan dan perbanyakkan sel. Kondisi pertumbuhan pada fase ini seimbang dimana laju pertumbuhan bakteri maksimal dan konstan.

Aktivitas kitinase yang dihasilkan oleh *B. circulans* mempunyai kestabilan yang relatif rendah, dimana terjadi fluktuasi pada jam-jam tertentu. *B. circulans* memproduksi kitinase secara ekstraseluler, enzim-enzim ekstraseluler begitu dibebaskan dari dalam sel tidak dikendalikan lagi oleh sel dan langsung dipengaruhi oleh kondisi lingkungan seperti suhu, pH dan enzim ekstraseluler lainnya seperti protease. Rao, et. al. (1998) menyatakan bahwa protease adalah enzim proteolitik

yang mengkatalis pemutusan ikatan peptida pada protein atau merupakan enzim degradatif yang mengkatalisis hidrolisis total protein. Kestabilan yang rendah dari kitinase ini kemungkinan besar disebabkan degradasi oleh enzim protease. Disamping itu aktivitas enzim protease ekstraseluler di dalam medium juga menyebabkan terjadinya penguraian enzim ekstraseluler lainnya yang dihasilkan bakteri tersebut.

Kemampuan *B. circulans* dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen

Kemampuan *B. circulans* dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen *Fusarium oxysporum* dan *Rhizoctonia solani*. *B. circulans* dapat dilihat pada gambar dibawah ini.



Gambar 3. Kemampuan *B. circulans* dalam menghambat pertumbuhan fungi patogen *Rhizoctonia solani* dan *Fusarium oxysporum*

(1) *Rhizoctonia solani*, (2) *Fusarium oxysporum*

Pada gambar di atas dapat dilihat bahwa *B. circulans* hanya dapat menghambat pertumbuhan jamur *Rhizoctonia solani*, besarnya daerah hambatan dari bakteri

kitinase secara ekstraseluler, aktivitas enzim ekstraseluler sangat tergantung oleh faktor lingkungan seperti suhu, pH dan enzim ekstraseluler lainnya. Tidak

adanya daerah hambatan pada *Fusarium oxysporum* kemungkinan disebabkan perbedaan pH disekitar media akibat dari metabolit yang dihasilkan oleh jamur tersebut, sehingga aktivitas kitinase menjadi terhambat. Selama proses fermentasi dapat terjadi perubahan pH karena terbentuknya hasil-hasil metabolisme seperti CO₂ dan asam-asam organik, asam-asam organik yang terbentuk seperti asam laktat, asam asetat dan asam piruvat (Judoamidjojo, dkk., 1992).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- *B. circulans* memproduksi kitinase tertinggi pada akhir fase ekspo-nensial yaitu pada jam ke 20 sebesar 0,58 U/ml.
- *B. circulans* hanya mampu menghambat pertumbuhan jamur *Rizoc-tonia solani* dengan zona hambat sebesar 0,65 cm.

DAFTAR PUSTAKA

- Chernin, L.Z., Ismailov, Haran, S. and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to Fungal Plant Patogens. *Appl Environ Micbiol* 61 : 1720-1726
- Folders, J., Algra, J., Roelofs, M.C., Leendert, C. L., Tommassen, J. and Bitter, W. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase a Gradually Secreted Protein. *J. Bacteriology*. 183 : 7044-7052.
- Hirano, S. 1996. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnol Annu Rev.* 2 : 237 – 258.
- Judoamidjojo, M. , Abdul, A.D. dan Endang, G.S. 1992 . *Teknologi Fermentasi* . Rajawali Press. Jakarta.
- Panda, F.T. 1999. Regulation and Cloning of Microbial Chitinase Genes. *Appl Microbiol Biotechnol* 51 : 141 – 151.
- Kane, L. Mc & Kandel, J. 1998. *Microbiology Essentials and Applications*. Mc Grwa-Hill. Inc. New York. 777 hlm
- Rao, M.B., Aparna, M.T., Mohini, S.G. and Vasanti, V.D., 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 597 – 635
- Susi. 2002. Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnase* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 3. No.1 : 30-35.
- Suzuki, K. Taiyoji, N. Sugawara, N. Nikaidou, B. Henrissat and Watanabe, T. 1999. The Third Chitinase gene (*chi C*) of *Serratia marcescens* 2170 and the Relationship of its Product to Other Bacterial Chitinases. *Biochem. J.* 343 : 587 – 596.
- Thamthiankul, S., Suan-Ngay, S. and Tantimavanich, S. 2001. Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. pakistani. *Journal of Appl Microbiol Biotechnol*. 56 : 395 – 401.
- Watanabe, A. Nong, V.H. Zhang, D. Arahira, M. Yeboah, N.A. Udaka, K. and Fukazawa, C. 1999. Molecular Cloning and Ethylene Inducible Expression of Chi b1 Chitinase from Soybean (*Glycine max L.*) . *Biosci Biotech Biochem*. 63 : 251 – 256
- Wen, C.M., Tseng, C.S., Cheng, C.Y. and Li, Y.K. 2002. Purification, Characterization and Cloning of a Chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. *Journal of Biotechnol. Appl. Biochem*. 35 : 213 – 219 hlm