

AKTIVITAS ANTIFUNGAL β -1,3-GLUKANASE *Trichoderma reesei* PADA FUNGI AKAR *Ganoderma philippii*

THE EFFECT OF ANTIFUNGAL ACTIVITY OF β -1,3-GLUCANASE *Trichoderma reesei* AGAINST ROOT FUNGI OF *Ganoderma philippii*

Sri Wahyuni Budiarti* dan S.M. Widyastuti**

*Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP) Jawa Tengah
Bukit Tegalepek Ungaran Jawa Tengah 50501

**Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada,
Jalan Agro No 01 Bulaksumur Yogyakarta 55281
e-mail: budiarti_sw@yahoo.com

ABSTRACT

Purified three isoform β -1,3-glucanases of 90 kDa β -1,3-glucanase-I, 75 kDa β -1,3-glucanase-II, and 64 kDa β -1,3-glucanase-III derived from *Trichoderma reesei* isolate T₁₃ were tested in vitro for its antifungal activity to the root fungi of *Ganoderma philippii*. Antifungal activity was tested by bioassay using a modified cup plate method and microscopic observation to determine the presence of abnormal mycelia growth of *G. philippii*. The result showed that antifungal activity of those three isoform β -1,3-glucanase (β -1,3-glucanase-I, β -1,3-glucanase-II, and β -1,3-glucanase-III) in vitro could not form growth inhibition against the mycelia of *G. philippii*. Microscopic observation revealed that the enzyme caused necrotic lesion, whereas the combination of β -1,3-glucanase and chitinase from *T. harzianum* (Sigma) caused lyzed hyphae of *G. philippii*.

Keywords: β -1,3-glucanase, Antifungal activity, *Trichoderma reesei*, *Ganoderma philippii*

ABSTRAK

Hasil purifikasi tiga isoform β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase-I 90 kDa, β -1,3-glukanase-II 75kDa, dan β -1,3-glukanase-III 64 kDa) dari *Trichoderma reesei* isolat T₁₃ telah dilakukan uji aktivitas antifungal. Uji aktivitas antifungal secara in vitro terhadap fungi patogen tular tanah *Ganoderma philippii* dilakukan dengan metode cup plate dan pengamatan secara makroskopis untuk mengetahui adanya pertumbuhan miselia yang abnormal sebagai akibat aktivitas β -1,3-glukanase. Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa tiga isoform β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III) tidak menghambat pertumbuhan (tidak membentuk zona penghambatan) terhadap hifa *G. philippii* pada uji in vitro, namun pengamatan secara mikroskopis menunjukkan adanya pembengkakan dan nekrosis pada hifa *G. philippii*. Kombinasi β -1,3-glukanase dan kitinase *T. harzianum* (Sigma) menunjukkan adanya lisis pada hifa *G. philippii*.

Kata kunci: β -1,3-glukanase, Aktivitas antifungal, *Trichoderma reesei*, *Ganoderma philippii*

PENDAHULUAN

Ganoderma philippii merupakan penyebab penyakit akar merah yang tergolong ke dalam filum Basidiomycota, ordo Aphyllophorales dan famili Ganodermataceae.¹ Sifat fungi *G. philippii* dapat mematikan tanaman. Penyebaran yang cepat serta gejala awal yang sulit diketahui,

menyebabkan kesulitan melakukan pengendalian secara dini. Cara-cara pengendalian yang selama ini dilakukan belum memberikan hasil sesuai yang diharapkan.² Salah satu alternatif yang mulai banyak dikembangkan adalah dengan pengendalian hayati menggunakan fungi *Trichoderma*.^{2,3}

Trichoderma spp. telah dikenal sebagai mikoparasit terhadap berbagai jenis jamur patogen tanaman tular tanah dan sangat potensial untuk dikembangkan sebagai agen pengendali hayati. Kemampuan *Trichoderma* dalam menghasilkan enzim-enzim pendegradasi dinding sel (glukanolitik, kitinolitik, dan selulolitik) telah menjadi perhatian para peneliti sejak tiga dekade terakhir.^{4,5,6}

Produksi ekstraseluler β -1,3-glukanase, kitinase dan proteinase meningkat secara signifikan ketika spesies *Trichoderma* ditumbuhkan pada medium suplemen. Terbukti bahwa kitin dan β -1,3-glukan dan protein merupakan struktur utama komponen dinding sel jamur pada umumnya. Hal ini merupakan dasar yang menunjukkan bahwa enzim litik yang dihasilkan oleh beberapa spesies *Trichoderma* berperan penting dalam merusak atau mendegradasi patogen tanaman. Enzim glukanolitik ditemukan pada banyak spesies *Trichoderma*, di antaranya adalah *T. harzianum*, *T. viridae*, *T. longibrachiatum*, *T. reesei*, *T. koningii*, dan *T. virens*.⁷

Penelitian oleh Lorito *et al.*⁸ melaporkan bahwa enzim glukanolitik dan kitinolitik mempunyai peranan kunci dalam mekanisme mikoparasitisme. Enzim glukanolitik yang telah dimurnikan menunjukkan aktivitas antifungal yang signifikan terhadap perkembangan jamur patogen.

β -1,3-glukanase merupakan enzim yang dapat mendegradasi dinding sel jamur patogen⁹ sehingga enzim ini dimasukkan sebagai salah satu jenis protein yang terkait dengan patogenisitas (*Pathogenesis-related protein/ PR-Protein*). Dalam kelas-kelas *pathogenesis-related protein* menurut Selitennikoff,¹⁰ β -1,3-glukanase termasuk dalam PR-2 protein yang merupakan kelas protein yang memiliki aktivitas (1,3) β -endoglukanase secara *in vitro*.

Pada jamur, β -1,3-glukanase memiliki berbagai peran yang berbeda, antara lain pada proses morfogenesis dan morfolitik selama perkembangan dan diferensiasi, mobilisasi β -1,3-glukan dalam kondisi kekurangan sumber karbon dan energi dengan mekanisme autolitik oleh enzim.¹¹ Aktivitas *antifungal* β -1,3-glukanase pada *Trichoderma* terjadi dengan adanya kemampuan untuk menghidrolisa struktur β -1,3-glukan

yang ada pada dinding sel fungi patogen terutama sekali pada bagian ujung hifa di mana glukan paling banyak terdapat sehingga dinding sel menjadi lemah, lisis, dan mati.⁷

Pada penelitian sebelumnya¹⁴ telah berhasil didapatkan *T. reesei* (isolat T₁₃) yang mempunyai potensi antagonistik tertinggi terhadap delapan penyakit akar tanaman kehutanan dibandingkan isolat *T. koningii* (isolat T₁) dan *T. harzianum* (isolat T₂₇). Miselia *T. reesei* yang mampu tumbuh dan mengkolonisasi miselia fungi patogen pada uji kultur ganda, mengindikasikan adanya keterlibatan proses mikoparasitisme.¹² Widyastuti dan Sumardi¹³ juga melaporkan bahwa *T. reesei* memiliki potensi antagonistik tertinggi terhadap miselium 11 patogen akar (*Ganoderma* spp.) yang diuji dengan persentase penghambatan pertumbuhan sebesar 96,64% dibandingkan dengan isolat T₁ dengan persentase penghambatan pertumbuhan 92,67% dan T₂₇ sebesar 82,79%.

Pada penelitian sebelumnya¹⁴ diketahui bahwa *T. reesei* (T₁₃) memproduksi 32 kDa enzim endokitinase pada saat menghambat pertumbuhan *G. philippii*, di samping mekanisme interaksi hifa yang secara sinergis membuat sel jamur inang mengalami lisis. Selanjutnya, Budiarti *et al.*¹⁵ berhasil mempurifikasi tiga isoform β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase-I 90 kDa, β -1,3-glukanase-II 75kDa, dan β -1,3-glukanase-III 64 kDa) dari *Trichoderma reesei* (isolat T₁₃).

Pada penelitian dilakukan uji aktivitas antifungal secara *in vitro* dari β -1,3-glukanase murni terhadap fungi patogen tular tanah *Ganoderma philippii* dengan metode *cup plate*. Pengamatan secara mikroskopis juga dilakukan untuk mengetahui adanya pertumbuhan miselia yang abnormal sebagai akibat aktivitas β -1,3-glukanase.

METODE PENELITIAN

Mikroorganisme

T. reesei isolat T₁₃, fungi antagonis terhadap *Ganoderma* spp. dan fungi tular tanah lain digunakan untuk memproduksi enzim β -1,3-glukanase.^{3,12,16} Aktivitas antifungal β -1,3-glukanase diaplikasikan pada isolat *G. philippii* yang diisolasi dari tanaman *Acacia mangium*.¹⁶ Kedua jenis fungi ini merupakan koleksi Laboratorium Perlindungan dan Kesehatan Hutan, Fakultas Kehutanan, Universitas Gadjah Mada.

Produksi dan purifikasi enzim

β -1,3-glukanase diproduksi dan dipurifikasi dengan menggunakan metode Lorito *et al.*⁸ yang telah dimodifikasi pada kondisi kultur. Hasil purifikasi diperoleh tiga isoform β -1,3-glukanase yaitu β -1,3-glukanase-I 90 kDa, β -1,3-glukanase-II 75kDa, dan β -1,3-glukanase-III 64 kDa.¹⁵

Uji Aktivitas Antifungal

Uji aktivitas antifungal β -1,3-glukanase murni dilakukan dengan metode *cup plate*.¹⁴ Medium PDA dengan konsentrasi agar 1,5% (w/v) sebanyak 5 ml dituangkan pada cawan petri steril, diratakan dan ditunggu sampai membeku. Selanjutnya, empat buah silinder plastik/logam steril berdiameter 5 mm (sebagai cetakan) diletakkan pada ke empat jari-jari cawan petri dengan jarak sama satu dengan yang lain. Sepuluh ml PDA dituangkan di atas lapisan sebelumnya dan setelah membeku silinder plastik/logam diambil sehingga memperoleh lubang sumuran pada permukaan PDA dengan ukuran yang seragam.

Potongan koloni *G. philippii* berdiameter 3 mm ditumbuhkan di tengah-tengah cawan petri (diperoleh dengan memotong koloni *G. philippii* umur 7 hari yang sebelumnya telah ditumbuhkan pada PDA menggunakan bor gabus). Setelah biakan berumur 7 hari, tiap lubang diisi dengan larutan enzim hasil isolasi dengan volume total 100 μ l. Sebagai kontrol digunakan bufer tanpa larutan enzim (20 mM Tris-HCl, pH 8,2). Secara makroskopis diamati adanya zona terang yang menunjukkan zona penghambatan pertumbuhan

miselium *G. philippii* yang terbentuk. Pengamatan mikroskopis dilakukan di bawah mikroskop untuk mengetahui adanya pertumbuhan miselia yang abnormal sebagai akibat aktivitas β -1,3-glukanase murni.

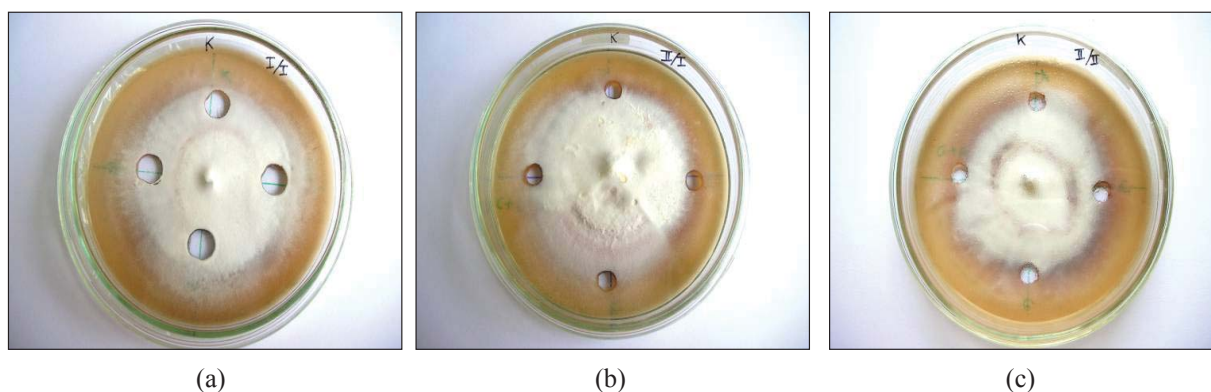
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan Makroskopis

Uji aktivitas antifungal β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III *T. reesei* terhadap *G. philippii* secara makroskopis disajikan pada Gambar 1. Sampel enzim dengan volume 100 μ l digunakan untuk uji antifungal (GLUC) dan kontrol negatif digunakan bufer Tris-HCl, pH 8,2 (K). Sebagai kontrol positif digunakan 100 μ l kitinase (Sigma) dengan konsentrasi 1 mg/ml (CHIT), serta kombinasi 50 μ l kitinase (Sigma) dan 50 μ l sampel enzim (CHIT + GLUC).

Hasil uji aktivitas antifungal β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III) terhadap pertumbuhan miselia fungi *G. philippii* tidak menunjukkan adanya zona penghambatan di sekitar sumuran yang diaplikasikan larutan enzim β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III seperti pada kontrol. Pada kontrol positif CHIT dan CHIT + GLUC terlihat zona penghambatan, namun sangat tipis sekali (Gambar 1a, 1b, 1c)

Penelitian sebelumnya oleh De La Cruz *et al.*¹¹ juga melaporkan hasil yang sama. Disebutkan bahwa meskipun secara *in vitro* endo- β -1,3-



Gambar 1. Aktivitas penghambatan β -1,3-glukanase-I (GLUC-I), β -1,3-glukanase-II (GLUC-II), dan β -1,3-glukanase-III (GLUC-III) terhadap perkembangan koloni *G. philippii*. Tampak dari depan berlawanan arah dengan jarum jam mulai dari atas (a) kontrol, CHIT+GLUC-I, GLUC-I (42,36 μ g/ml), CHIT; (b) kontrol, CHIT+GLUC-II, GLUC-II (53,12 μ g/ml), CHIT (c) kontrol, CHIT+GLUC-III, GLUC-III (48,82 μ g/ml), CHIT

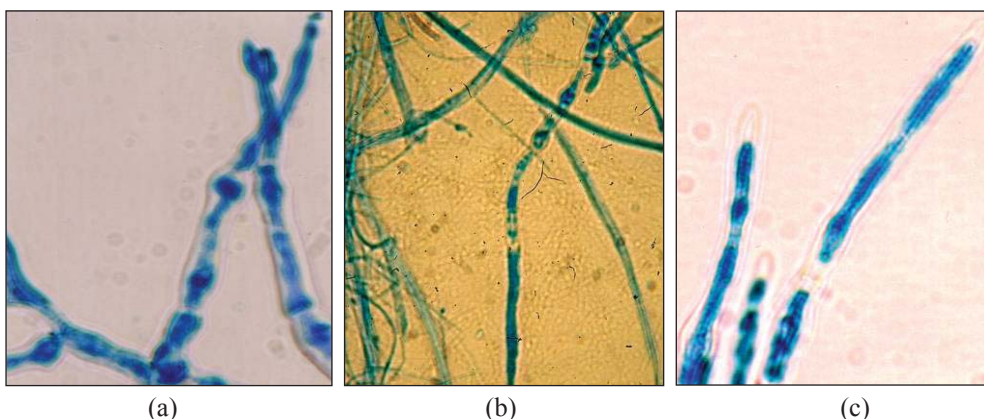
glukanase dari *T. harzianum* mampu menghasilkan gula reduksi, namun tidak mampu membentuk zona penghambatan terhadap miselia fungi patogen. Namun, ketika dikombinasikan dengan enzim hidrolase lain dari *T. harzianum*, seperti β -1,6-glukanase dan kitinase, menghasilkan zona penghambatan dan bahkan mampu menghambat pertumbuhan fungi patogen.

Pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa ketidakaktifan aktivitas antifungal β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III terhadap *G. philippii* diduga disebabkan oleh tiga hal. **Pertama**, konsentrasi larutan β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III yang diaplikasikan terlalu kecil untuk menghambat pertumbuhan koloni *G. philippii*. Penelitian yang dilakukan oleh Ji dan Kuc¹⁷ menunjukkan bahwa penghambatan pertumbuhan konidia *Colletotrichum lagenarium* oleh β -1,3-glukanase mulai tampak pada konsentrasi protein 250 μ g/

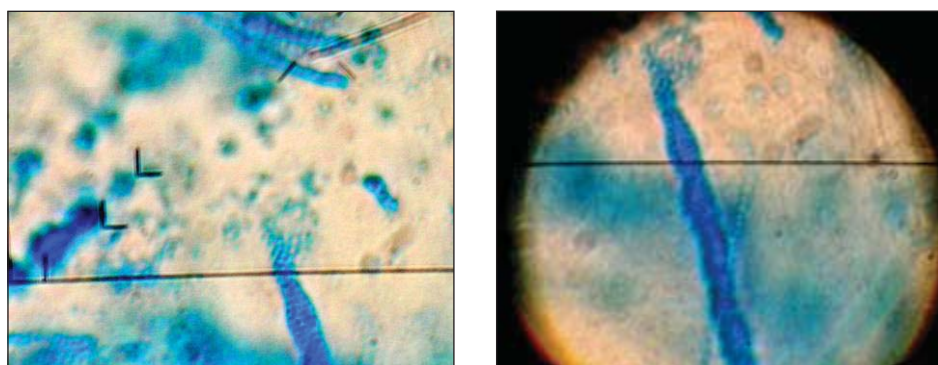
ml. **Kedua**, kemungkinan pH medium untuk uji aktivitas *antifungal* secara *in vitro* (pH 7,4) tidak sesuai dengan pH optimal β -1,3-glukanase (pH 5). Kemungkinan **ketiga**, diduga tidak ada kerja sama dengan enzim lain seperti kitinase sehingga aktivitas enzim β -1,3-glukanase terlalu kecil.

Pengamatan Mikroskopis

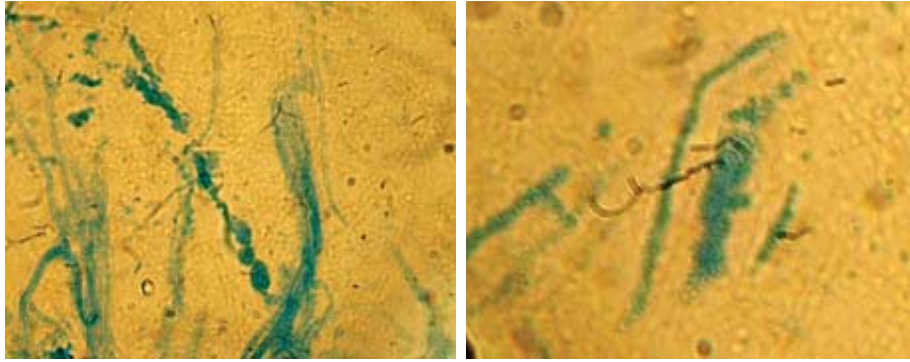
Meskipun secara makroskopis tidak terjadi penghambatan, namun secara mikroskopis aplikasi larutan enzim mampu memengaruhi perkembangan hifa *G. philippii* di mana ujung hifa mengalami pembengkakan dan nekrosis (Gambar 2a dan 2b). Perlakuan tanpa aplikasi enzim (Gambar 2c) menunjukkan pertumbuhan ujung hifa yang normal. Pada kontrol positif dengan perlakuan CHIT dan CHIT + GLUC menunjukkan terjadinya lisis hifa. Fenomena ini diikuti dengan keluarnya protoplas dari sel (Gambar 3 dan 4).



Gambar 2. Pengaruh aplikasi β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III (GLUC) terhadap hifa *G. philippii*. (a) Pembengkakan ujung hifa, (b) Ujung hifa yang mengalami nekrosis, (c) Hifa normal tanpa aplikasi enzim (kontrol) (4 μ m)



Gambar 3. Pengaruh aplikasi CHIT [Kitinase dari *T. harzianum* (Sigma)] terhadap hifa *G. philippii*. Ujung hifa *G. philippii* yang mengalami lisis ditunjukkan oleh tanpa panah (4 μ m)



Gambar 4. Pengaruh kombinasi CHIT+GLUC terhadap hifa *G. philippii*. Hifa *G. philippii* yang mengalami lisis ditunjukkan oleh tanda panah (4 μ m)

Seperti halnya yang telah dilakukan oleh Lorito *et al.*⁸ bahwa kemampuan antifungal β -1,3-glukanase lebih tinggi apabila ada kerja sama secara sinergis antara kitinase dan β -1,3-glukanase. Penelitian yang dilakukan oleh Lo *et al.*¹⁸ menunjukkan adanya dua tipe reaksi dalam proses mikoparasitisme. Tipe reaksi pertama, bagian hifa patogen menunjukkan kerusakan jaringan (nekrosis). Selanjutnya, tipe reaksi kedua menunjukkan reaksi lisis pada ujung hifa patogen.

Ketidaktifan β -1,3-glukanase yang dijelaskan berdasarkan hasil penelitian-penelitian sebelumnya dapat diduga disebabkan oleh tiga hal, yaitu 1) Sivan dan Chet¹⁹ mengemukakan bahwa adanya perbedaan kerentanan fungi patogen terhadap enzim *T. harzianum* berkaitan adanya lapisan protein pada dinding sel yang bersifat protektif. Benyagoub *et al.*²⁰ menemukan adanya lapisan matriks ekstra yang kaya protein fibrial pada dinding sel *Stachybotrys elegans* yang memiliki aktivitas melindungi polimer glukana dari β -1,3-glukanase. 2) Ketidaktifan aktivitas β -1,3-glukanase ditentukan oleh jumlah dan distribusi polisakarida pada dinding sel fungi. Seperti yang dipaparkan oleh Lorito *et al.*²¹ bahwa penghambatan perkecambahan spora oleh kitinase *T. harzianum* ditentukan oleh jumlah kitin yang ada dan distribusinya pada dinding sel fungi. 3) Mekanisme lain diduga melibatkan adanya protein penghambat (inaktifator). Lora *et al.*²² mengemukakan bahwa adanya penghambat kitinase pada dinding sel *T. harzianum* mencegah sel tersebut mengalami lisis.

KESIMPULAN

Tiga isoform β -1,3-glukanase (β -1,3-glukanase-I, β -1,3-glukanase-II, dan β -1,3-glukanase-III) tidak menghambat pertumbuhan (tidak membentuk zona penghambatan) terhadap hifa *G. philippii* pada uji *in vitro*. Adapun pengamatan secara mikroskopis aplikasi β -1,3-glukanase menunjukkan adanya pembengkakan dan nekrosis pada hifa *G. philippii*. Kombinasi β -1,3-glukanase dan kitinase *T. harzianum* (Sigma) menunjukkan adanya lisis pada hifa *G. philippii*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan sebagian dana dari ASE-UNINET Riset Grant dan Proyek Penelitian Dasar.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Alexopoulos, C.J., C.W. Mims, and M. Blackwell. 1996. *Introductory mycology* (4th ed.). Canada: JohnWiley & Sons.
- ²Semangun, H. 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- ³Widyastuti, S.M., Sumardi, dan P. Sumantoro. 2001. Efektivitas *Trichoderma* spp. sebagai agen pengendali hayati terhadap tiga patogen tular tanah pada beberapa jenis tanaman kehutanan. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 7 (2): 98–107.
- ⁴Reese, E.T., and M. Mandels. 1959. β -1,3-glucanases in fungi. *Canadian Journal Microbiology*, 5: 173–185.

- ⁵Hadar, Y., Y. Henis, and I. Chet. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 69: 64–68.
- ⁶Elad, Y., I. Chet, P. Boyle, and Y. Henis. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* dan *Sclerotium rolfsii*: scanning electron microscopy dan fluorescence microscopy. *Phytopathology*, 73: 85–88.
- ⁷Hjeljord, L. and A. Tronsmo. 1998. *Trichoderma* dan *Gliocladium* in biological control: an overview. In G.E. Harman and C.P. Kubicek (Eds.). *Trichoderma dan Gliocladium* Vol. 2. London: Taylor & Francis.
- ⁸Lorito, M., C.K. Hayes, A. Di Pietro, S.L. Woo, and G.E. Harman. 1994. Purification, characterization dan synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase dan an *N*-acetyl- β -glucosamidinase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84: 398–405.
- ⁹Yun, D., R.A. Bresson, and P. Hasegawa. 1997. Plant antifungal proteins. *Horticultural Reviews*, 14: 39–87.
- ¹⁰Selitennikoff, C.P. 2001. Antifungal proteins. *Applied Environmental Microbiology*, 67: 2883–2894.
- ¹¹De La-Cruz, J., J.A. Pintor-Toro, T. Benitez, and A. Llobell. 1995. Purification dan characterization of an endo- β -1,6-Glucanase from *Trichoderma harzianum* that is related to its mycoparasitism. *Journal Bacteriology*, 177: 1864–1871.
- ¹²Widyastuti, S.M., Sumardi, dan Harjono. 1999. Potensi antagonistik tiga *Trichoderma* spp. terhadap delapan penyakit akar tanaman kehutanan. *Bulletin Kehutanan*, 41 (2): 2–10.
- ¹³Widyastuti, S.M. and Sumardi. 1998. Antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against root rot pathogen of forest tree species. *ASIAN Journal of Sustainable Agriculture*, 4: 65–72.
- ¹⁴Harjono, dan S.M. Widyastuti. 2001. Pemurnian dan karakterisasi enzim endokitinase dari agen pengendali hayati *Trichoderma reesei*. *Jurnal Perlindungan Tanaman*, 7 (2): 114–120.
- ¹⁵Budiarti, S.W., S.M. Widyastuti, dan S. Margino. 2009. Purification and characterization of β -1,3-Glucanase from the antagonistic fungus *Trichoderma reesei*. *Hayati Journal of Biosciences*, 16: 115–119.
- ¹⁶Widyastuti, S.M., Sumardi, A. Sulthoni, dan Harjono. 1998. Pengendalian hayati penyakit akar merah pada akasia dengan *Trichoderma*. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 4 (2): 65–72.
- ¹⁷Ji, C., and J. Kuc. 1996. Antifungal activity of cucumber β -1,3-glucanase and chitinase. *Physiology and Molecular Plant Pathology*, 49: 257–265.
- ¹⁸Lo, C.T., E.B. Nelson, C.K. Hayes, and G.E. Harman. 1998. Ecological studies of transformed *Trichoderma harzianum* strain 1295-22 in the rhizosphere and on the phylloplane of creeping bentgrass. *Phytopathology*, 88: 129–135.
- ¹⁹Sivan, A. and I. Chet. 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes from *Trichoderma harzianum*. *Journal Genetic Microbiology*, 135: 675–682.
- ²⁰Benyagoub, M., S.H. Jabaji-Hare, H. Chamberl, and P.M. Charest. 1996. Cytochemical dan immunocytochemical investigation of the mycoparasitic interaction between *Stachybotris elegans* dan its host *Rhizoctonia solani* (AG-3). *Mycologia Research*, 100: 79–86.
- ²¹Lorito, M., G.E. Harman, C.K. Hayes, R.M. Broadway, A. Trosno, S.L. Woo, and A. DiPietro. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: antifungal activity of purified endochitinase dan chitobiosidase. *Phytopathology*, 83: 302–307.
- ²²Lora, J.M., J. De la Cruz, and A. Lobell. 1995. Molecular characterization dan heterologous expression of an endo- β -1,6-glucanase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. *Molecular General Genetic*, 247: 639–645.