

**KITINASE *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 SEBAGAI AGENS  
BIOKONTROL PENYAKIT HAWAR DAUN PADA TANAMAN  
KELAPA SAWIT**

**MUHAMMAD ASRIL**



**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2014**



## **PERNYATAAN MENGENAI TESIS DAN SUMBER INFORMASI SERTA PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis berjudul Kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 sebagai Agens Biokontrol Penyakit Hawar Daun pada Tanaman Kelapa Sawit adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya kepada Institut Pertanian Bogor

Bogor, Agustus 2014

*Muhammad Asril*  
NIM G351120331

## RINGKASAN

MUHAMMAD ASRIL. Kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 sebagai Agens Biokontrol Penyakit Hawar Daun pada Tanaman Kelapa Sawit. Dibimbing oleh NISA RACHMANIA MUBARIK dan ARIS TRI WAHYUDI.

Kitin merupakan komponen penyusun utama dinding sel cendawan, miselium dan spora. *Curvularia affinis* dan *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan cendawan patogen penyebab penyakit bercak daun dan hawar daun pada pembibitan kelapa sawit yang menyebabkan penurunan terhadap nilai jual, sehingga perlu dipelajari lebih lanjut agar dapat dilakukan pencegahan sejak dini. Kitin yang terdapat pada dinding sel cendawan patogen ini mampu didegradasi oleh kitinase.

Kitinase merupakan kelompok enzim yang dapat mendegradasi polimer kitin menjadi monomer. Enzim ini ditemukan secara luas pada berbagai organisme khususnya bakteri. Spesies yang paling sering digunakan sebagai agens biokontrol ialah *Bacillus*. *Bacillus* asal Indonesia diketahui berpotensi sebagai penghasil kitinase salah satunya *B. thuringiensis* SAHA 12.08. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengendapkan dan mengkarakterisasi kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dan mengkaji potensinya sebagai agens biokontrol terhadap cendawan patogen *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* penyebab hawar daun pada tanaman kelapa sawit secara *in vitro* dan *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit. .

Kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 memiliki aktivitas maksimum pada 60 jam inkubasi dengan aktivitas spesifik sebesar 7.896 U/mg. Aktivitas optimum pada pH 7.0 dan 35 °C. Pengendapan kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dilakukan dengan menggunakan amonium sulfat. Kitinase ini mengendap maksimal pada konsentrasi 30% amonium sulfat dengan aktivitas spesifik sebesar 17.061 U/mg dan meningkatkan kemurniannya 2.35 kali dibandingkan aktivitas enzim kasarnya. Hasil SDS-PAGE menunjukkan adanya tujuh pita protein dengan bobot molekul yang bervariasi sebesar 107, 102, 82, 63, 55, 46 dan 44 kDa. Analisis zimogram menunjukkan satu protein yang memiliki aktivitas kitinase dengan bobot molekul sebesar 82 kDa. Proses pengendapan merubah sebagian karakter kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 sehingga berbeda dengan karakter kitinase ekstrak kasar. Karakter yang berubah yaitu pH optimum aktivitas kitinase. Kitinase hasil pengendapan memiliki aktivitas optimum pada pH 7 dan pada suhu 45°C. Kitinase ini stabil pada suhu optimum selama 180 menit.

Efektivitas penghambatan kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 terhadap cendawan patogen dilakukan secara *in vitro* dan *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit. Kitinase ini memiliki aktivitas antagonis dan memiliki efektivitas biokontrol terhadap kedua jenis cendawan patogen *C. affinis* dan *C. gloeosporioides*. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kitinase isolat tersebut menjanjikan dalam perannya sebagai agens biokontrol penyakit hawar daun pada tanaman kelapa sawit.

Kata kunci: aktivitas antagonis, *Bacillus thuringiensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia affinis*.

## SUMMARY

MUHAMMAD ASRIL. *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 Chitinase as Biocontrol of Leaf-blight Disease in Oil Palm. Supervised by NISA RACHMANIA MUBARIK and ARIS TRI WAHYUDI.

Chitin is a major component of fungi cell wall, mycelia, and spore. *Curvularia afinis* and *Colletotrichum gloeosporioides* are fungi causing leaf-blight disease on oil palm nursery which decrease its economic value, thus, the study about early prevention of this disease is required. Chitin contained in cell wall of pathogenic fungi is able degraded by chitinase.

Chitinase is a group of enzymes that can degrade chitin polymer into monomers. Enzyme is found in a wide variety of organisms especially bacteria. The most species is often used as biocontrol agent from group *Bacillus*. *Bacillus* from Indonesia known as a potentially producer of chitinase i.e *B. thuringiensis* SAHA 12.08. The objectives of the research were to precipitated and characterize extracellular chitinase of *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 and determine its potency as biocontrol of *C. afinis* and *C. gloeosporioides* causing leaf blight on oil palm plantations *in vitro* and *detached leaf assay* using oil palm leaves.

Chitinase of *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 has maximum activity at 60 h incubation with specific activity of 7.896 U mg<sup>-1</sup> protein. Optimum pH and temperature of chitinase activity were 7.0 and 35 °C, respectively. Precipitation of chitinase was performed using ammonium sulphate. Precipitation using 30% ammonium sulphate was able to produce a maximum chitinase specific activity 17.061 U/mg and increase the purity of 2.35 fold than crude enzyme. The result of SDS-PAGE showed at least seven bands (molecular) of chitinase protein fraction of 30% ammonium sulphate with an estimated molecular weight viz 107, 102, 82, 63, 55, 46 and 44 kDa. Zymogram analysis showed one protein molecule which had chitinase activity with molecular weight of 82 kDa. The process of precipitation could change character of these chitinase. The precipitate chitinase had different characters from crude chitinase. The character that changed was the optimum pH of the chitinase activity. The activity of precipitate chitinase was optimal at 45 °C and 7.0, respectively. This chitinase was stable at optimum temperature for 180 minutes incubation.

Effectiveness of *B. thuringiensis* SAHA 12.08 chitinases on fungal pathogens performed by *in vitro* and *detached leaf assay* using oil palm leaves. This chitinase had antagonist activity and biocontrol efficacy to *C. affinis* and *C. gloeosporioides* causing leaf blight on oil palm plantations. These results indicated that the isolates had promising role as biocontrol agents of leaf-blight on oil palm.

**Keywords:** antagonistic activity, *Bacillus thuringiensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Curvularia afinis*.

© Hak Cipta Milik IPB, Tahun 2014  
Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

*Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan atau menyebutkan sumbernya. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik, atau tinjauan suatu masalah; dan pengutipan tersebut tidak merugikan kepentingan IPB*

*Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apa pun tanpa izin IPB*

**KITINASE *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 SEBAGAI AGENS  
BIOKONTROL PENYAKIT HAWAR DAUN PADA TANAMAN  
KELAPA SAWIT**

**MUHAMMAD ASRIL**

Tesis  
sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains  
pada  
Program Studi Mikrobiologi

**SEKOLAH PASCASARJANA  
INSTITUT PERTANIAN BOGOR  
BOGOR  
2014**

Penguji Luar Komisi pada Ujian Tesis: Dr Ir Abdjad Asih Nawangsih, MSi



Judul Tesis : Kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 sebagai Agens  
Biokontrol Penyakit Hawar Daun pada Tanaman Kelapa Sawit  
Nama : Muhammad Asril  
NIM : G351120331

Disetujui oleh  
Komisi Pembimbing



Dr Nisa Rachmania Mubarik, MSi  
Ketua



Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi  
Anggota

Diketahui oleh

Ketua Program Studi  
Mikrobiologi



Prof Dr Anja Meryandini, MS

Dekan Sekolah Pascasarjana



Dr Ir Dahrul Syah, MScAgr

Tanggal Ujian: 18 Agustus 2014

Tanggal Lulus:

27 AUG 2014

## PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala karunia-Nya sehingga karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Tema yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan September 2013 sampai April 2014 ini ialah kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 sebagai agens biokontrol penyakit hawar daun pada tanaman kelapa sawit

Terima kasih penulis ucapkan kepada Dr Nisa Rachmania Mubarik, MSi sebagai ketua komisi pembimbing dan Prof. Dr Aris Tri Wahyudi, MSi sebagai anggota komisi pembimbing, yang telah banyak memberikan nasehat, saran, motivasi, waktu konsultasi, serta solusi dari setiap permasalahan yang dihadapi penulis selama melaksanakan penelitian dan penyusunan karya ilmiah ini. Selain itu penulis ucapkan terima kasih kepada penguji luar komisi Dr Ir Abdjad Asih Nawangsih, MSi dan Prof Dr Anja Meryandini, MS selaku Ketua Program Studi Mikrobiologi IPB, yang telah memberikan motivasi selama studi dan masukan pada saat ujian sidang tesis. Kepada DIKTI melalui Beasiswa Unggulan 2012/2013 terima kasih atas kepercayaannya untuk memberikan beasiswa kuliah selama menempuh pendidikan pascasarjana di IPB, dan terima kasih atas hibah penelitian BOPTN DIKTI tahun 2013 dan ABS Funds dari kerjasama CRC-IPB tahun 2014 a.n. Dr Nisa Rachmania Mubarik MSi sehingga penelitian yang penulis lakukan dapat terlaksana dengan baik.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Ibu Heni dan Bapak Jaka selaku staf Laboratorium Mikrobiologi IPB, Dina, Mahyar, Lekta, Rika, Anja, Nezha, Vita, Ayun, Qurrota, Randi, Hendri, Yeni, Mei, Annisa, Suri, Syipa, Ismi, serta seluruh teman-teman di Laboratorium Mikrobiologi IPB, atas dukungan, motivasi, dan bantuannya selama penelitian ini. Ucapan terima kasih tak terhingga juga penulis ucapkan kepada bapak, ibu, kakak dan adikku tercinta, serta sahabat-sahabatku tersayang, atas doa, dukungan, kasih sayang, dan semangat yang diberikan. Terima kasih untuk teman-teman seperjuangan di Pascasarjana Mikrobiologi IPB angkatan 2012 serta seluruh pihak yang telah memberikan doa dan dukungannya, penulis ucapkan terima kasih.

Semoga karya ilmiah ini bermanfaat.

Bogor, Agustus 2014

*Muhammad Asril*

## DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
PENDAHULUAN	1
Latar Belakang	1
Perumusan Masalah	1
Tujuan Penelitian	2
Manfaat Penelitian	2
Ruang Lingkup Penelitian	2
TINJAUAN PUSTAKA	3
Kitin	3
Kitinase	3
Bakteri Kitinolitik	4
Potensi Bakteri Kitinolitik sebagai Pengendali Hayati	4
METODE	5
Kerangka Penelitian	5
Waktu dan Tempat Penelitian	6
Peremajaan dan Seleksi Isolat Kitinolitik	6
Penentuan Kurva Tumbuh dan Produksi Enzim	6
Pengukuran Aktivitas Kitinase dan Konsentrasi Protein	6
Uji Antagonis terhadap Cendawan Patogen	7
Penentuan pH dan Suhu Optimum Kitinase serta Stabilitasnya	7
Pengendapan Kitinase	7
Pengujian Efektivitas Biokontrol secara <i>Detached leaf Assay</i>	9
HASIL DAN PEMBAHASAN	10
Hasil	10
Pembahasan	16
SIMPULAN DAN SARAN	19
Simpulan	19
Saran	19
DAFTAR PUSTAKA	20
LAMPIRAN	25
RIWAYAT HIDUP	30

## DAFTAR TABEL

1	Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk sepasang gel	8
2	Hasil pemurnian parsial kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	11

## DAFTAR GAMBAR

1	Struktur kimia kitin	3
2	Diagram alur penelitian ini	5
3	Pertumbuhan sel dan aktivitas kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 pada media produksi NB + koloidal kitin	10
4	Pengaruh penambahan konsentrasi amonium sulfat terhadap pengendapan kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	11
5	SDS PAGE dan zimogram kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	11
6	Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan	12
7	Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan	12
8	Stabilitas ekstrak kasar dan hasil pengendapan kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 pada suhu optimum	13
9	Efektivitas penghambatan kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 terhadap <i>C. affinis</i> dan <i>C. gloeosporioides</i> setelah 7 hari inkubasi pada media PDA	13
10	Penghambatan pertumbuhan <i>C. affinis</i> oleh kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	14
11	Penghambatan pertumbuhan <i>C. gloeosporioides</i> oleh kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	14
12	Efektivitas penghambatan kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 terhadap hawar daun yang disebabkan oleh <i>C. affinis</i> dan <i>C. gloeosporioides</i> menggunakan daun kelapa sawit	15
13	Efektivitas biokontrol kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08 dalam mengurangi serangan penyakit yang disebabkan oleh <i>C. affinis</i> dan <i>C. gloeosporioides</i>	15

## DAFTAR LAMPIRAN

1	Metode pengujian aktivitas kitinase (Spindler 1997)	25
2	Metode pengukuran kadar protein (Bradford 1976)	26
3	Penghitungan bobot molekul kitinase <i>B. thuringiensis</i> SAHA 12.08	26
4	Prosedur pembuatan reagen yang digunakan dalam penelitian	27

# PENDAHULUAN

## Latar Belakang

Kitin merupakan polisakarida yang tersusun atas residu  $\beta$ -1.4-*N*-acetilglukosamin (GlcNAc) yang berikatan kuat dengan ikatan hidrogen. Kelimpahan kitin di alam berada di urutan kedua setelah selulosa dan terdistribusi secara luas di lingkungan seperti kutikula insekta, cangkang crustacea, nematodes and dinding sel cendawan (Gohel *et al.* 2006; Bhattacharya *et al.* 2007; Aranaz *et al.* 2009).

*Curvularia affinis* dan *Colletotrichum gloeosporioides* merupakan penyebab penyakit bercak daun dan hawar daun pada pembibitan kelapa sawit yang menyebabkan penurunan terhadap nilai jual. Di Indonesia penyakit ini masih dalam kelompok penyakit sekunder, tetapi di Thailand, serangan penyakit ini meningkat serangannya mencapai 61.01% (*Curvularia* sp.) dan 22.38% (*Colletotrichum* sp.) (Kittimorakul *et al.* 2013), sehingga perlu dipelajari lebih lanjut agar dapat dilakukan pencegahan sejak dini. Kitin yang terdapat pada dinding sel, miselium, tangkai dan spora cendawan patogen ini mampu didegradasi oleh kitinase (Peter 2005).

Kitinase merupakan kelompok enzim yang dapat mendegradasi polimer kitin dengan 2 tahap. Endokitinase (EC 3.2.1.14) mendegradasi polimer menjadi oligomer, kemudian didegradasi menjadi monomer oleh eksokitinase ( $\beta$ -*N*-acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52). Enzim ini ditemukan secara luas pada berbagai organisme seperti bakteri (Yong *et al.* 2005), aktinomiset (Akagi *et al.* 2006), fungi (Matsumoto 2006), insekta (Bansode dan Bajekal 2006) serta tanaman (Matsushima *et al.* 2006). Penggunaan kitinase beberapa dekade ini semakin meningkat, seiring dengan luasnya aplikasi dari enzim ini. Salah satunya, digunakan sebagai agens biokontrol terhadap berbagai jenis fungi patogen (de la Vega *et al.* 2006) yang diharapkan mampu mengurangi penggunaan fungisida sintetik. Upaya tersebut terus dilakukan sepanjang tahun diseluruh dunia untuk meningkatkan produksi dan karakterisasi kitinase dari berbagai isolat bakteri. Spesies yang paling sering digunakan sebagai agens biokontrol ialah dari kelompok *Bacillus*. Berbagai spesies *Bacillus* penghasil kitinase telah banyak dilaporkan diantaranya *B. thuringiensis* (de la Vega *et al.* 2006), *B. cereus* (Huang *et al.* 2005), *B. licheniformis* (Kamil *et al.* 2007). Beberapa karakteristik kitinase terbaru dari bakteri telah banyak dilaporkan (Bhattacharya *et al.* 2007). Meskipun demikian belum ada laporan tentang pengendapan dan karakterisasi kitinase bakteri indogenous Indonesia yang dijadikan sebagai agens biokontrol *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* penyebab hawar daun pada daun kelapa sawit, sehingga sangat menarik untuk dikaji.

## Perumusan Masalah

1. Setiap cendawan patogen mengandung kitin sebagai penyusun utama komponen dinding selnya.
2. Kitinase merupakan enzim yang memiliki karakter yang beragam yang dapat diperoleh dari bakteri.

3. *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 penghasil kitinase berhasil diisolasi dari tanah Jambi.
4. *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 penghasil kitinase dapat menjadi agens biokontrol terhadap cendawan patogen penyebab penyakit hawar daun pada tanaman kelapa sawit, disamping keistimewaannya dalam menghasilkan toksin *cry* sebagai bioinsektisida.
5. Penelitian mengenai pengendapan dan karakterisasi kitinase dari isolat yang dijadikan sebagai agens biokontrol terhadap cendawan patogen penyebab hawar daun pada tanaman kelapa sawit belum banyak dilakukan.

### **Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk mengendapkan dan mengkarakterisasi kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 serta mengkaji potensinya sebagai agens biokontrol terhadap cendawan patogen *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* penyebab hawar daun pada tanaman kelapa sawit secara *in vitro* dan *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit.

### **Manfaat Penelitian**

Pengendapan, karakterisasi kitinase serta pengujian biokontrol kitinase isolat *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dalam penelitian ini, diharapkan mampu memberikan informasi tentang karakter kitinase dan membuka peluang adanya karakter baru dari isolat ini sehingga menambah informasi tentang karakter kitinase *B. thuringiensis* yang tersedia saat ini. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peran mikrobiologi khususnya potensi *B. thuringiensis* dalam bidang pertanian yaitu tidak hanya sebagai bioinsektisida tetapi juga dapat dijadikan sebagai biofungisida, sebagai salah satu upaya peningkatan produktivitas kelapa sawit di Indonesia.

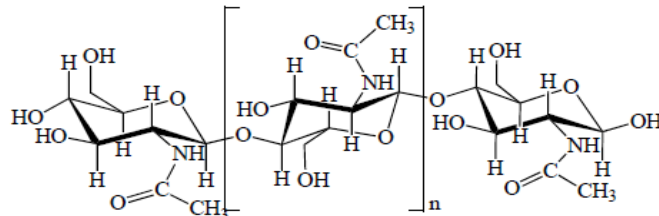
### **Ruang Lingkup Penelitian**

Ruang lingkup dalam penelitian ini meliputi mengendapkan protein kitinase, karakterisasi kitinasenya serta analisis kemampuan biokontrolnya dalam menghambat cendawan patogen penyebab hawar daun pada daun kelapa sawit. Pengendapan dan karakterisasi kitinasenya meliputi produksi kitinase, pengendapan dengan amonium sulfat dan karakterisasi enzim berdasarkan pH, suhu serta stabilitasnya. Analisis kemampuan biokontrol terhadap cendawan patogen meliputi pengujian kitinase dari kultur sel, ekstrak kasar dan endapan enzim terhadap cendawan patogen secara *in vitro* dan pengujian langsung pada daun kelapa sawit menggunakan *detached leaf assay*.

## TINJAUAN PUSTAKA

### Kitin

Kitin merupakan senyawa biopolimer berantai panjang dan tidak bercabang. Tiap rantai polimer pada umumnya terdiri atas 2000 hingga 5000 unit monomer N-asetil-D-Glukosamin yang terpaat melalui ikatan  $\beta$  (1-4) glukosa.. (Sanjaya dan Yuanita 2007). Struktur kitin mirip dengan selulosa, tetapi pada kitin gugus hidroksil yang terikat pada atom C-2 digantikan oleh gugus asetamina (-NHCOCH<sub>3</sub>) (Zohuriaan dan Mehr 2004). Pada umumnya keberadaan kitin di alam tidak terdapat dalam keadaan bebas, akan tetapi berikatan dengan protein, mineral, dan berbagai macam pigmen (Kaban 2009). Kitin dapat larut dalam heksafluoro isopropanol, heksafluoro aseton, dan kloro alkohol serta dimetilasetamida (DMAc) yang mengandung 5% litium klorida (LiCl) (Dutta *et al.* 2004).



Gambar 1 Struktur kimia kitin (Aranaz *et al.* 2009)

Beberapa manfaat yang dapat diambil dari kitin, yaitu di bidang pertanian antara lain dengan memanfaatkan sifat antifunginya untuk melindungi tanaman dari serangan fungi dan sifat antibakterinya terhadap beberapa patogen (Shahidi *et al.* 1999). Selain itu sifat antibakterial, antifungal, serta antiviral yang dimilikinya, kitin sangat berguna diaplikasikan dalam bidang biomedis misalnya sebagai kontrol kolestrol darah dan sebagai bahan dasar pembuatan benang operasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kitin dan kitosan bersifat tidak beracun dan tidak menyebabkan alergi sehingga tubuh dapat menerimanya sebagai benda asing (Naznin 2005).

### Kitinase

Kitinase merupakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri kitinolitik yang berperan penting dalam menghidrolisis kitin. Kitinase dapat menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidiknya (Nasran *et al.* 2003). Degradasi kitin secara enzimatik oleh kitinase berlangsung secara bertahap. Awalnya polimer kitin dipecah menjadi oligomer kitin (umumnya berupa dimer) dan selanjutnya diuraikan menjadi monomer GlcNAc oleh N-asetil glukosaminidase (Purwani *et al.* 2002).

Kitinase diproduksi secara alami pada berbagai macam organisme seperti bakteri, arthropoda, vertebrata, dan tanaman. Fungsi fisiologis dari kitinase bergantung pada sumbernya. Pada tanaman, umumnya kitinase diinduksi oleh adanya faktor stress seperti infeksi patogen yang mengandung kitin. Sedangkan pada organisme yang mengandung kitin pada dinding selnya atau struktur yang lainnya seperti fungi, kitinase diketahui terlibat dalam germinasi spora,

pertumbuhan hifa dan percabangannya serta perkembangan miselium (Lopes *et al.* 2008). Kitin didegradasi oleh kitinase secara enzimatik melalui dua cara. Endokitinase (EC 3.2.1.14) mengubah polimer menjadi oligomer yang secara berkelanjutan didegradasi menjadi monomer oleh eksokitinase-kitobiase ( $\beta$ -N-acetylhexosaminidase, EC 3.2.1.52) (Toharisman *et al.* 2005).

### **Bakteri Kitinolitik**

Bakteri kitinolitik merupakan bakteri yang memiliki aktivitas kitinolitik, yakni mampu menguraikan kitin. Kitin merupakan senyawa yang sulit larut, ukuran, susunan molekul yang kompleks dan keragaman komposisinya, kitin tidak didegradasi di dalam sel, tetapi oleh mikroorganisme yang mensekresi enzim untuk mengubah atau menghidrolisis kitin. Mikroorganisme kitinolitik memproduksi kitinase dalam jumlah yang lebih banyak daripada hewan dan tumbuhan (Matsumoto 2006). Mikroorganisme ini dapat diperoleh dari berbagai sumber seperti rizosphere (Shanmugaiah *et al.* 2008), filosper (Herdyastuti *et al.* 2009), tanah (Purwani *et al.* 2002; Khan dan Khan 2011) atau lingkungan air seperti laut, danau (Donderski dan Brzezinska 2001) atau limbah udang (Herdyastuti *et al.* 2009), cangkang kepiting, eksoskeleton serangga dan puparium (Yong *et al.* 2005). Selain lingkungan mesofil, mikroorganisme kitinolitik juga dapat diisolasi dari lingkungan termofilik seperti sumber air panas dan daerah geotermal. Bakteri kitinolitik ini dapat dideteksi dan diisolasi melalui terbentuknya zona bening pada medium selektif agar (Purwani *et al.* 2002).

Bakteri yang mempunyai aktivitas kitinolitik antara lain *Bacillus circulans*, *Streptococcus lividans*, *Aeromonas* sp. dan *Serratia marcescens* yang menghasilkan banyak kitinase dari gen yang berbeda (Suzuki *et al.* 1999). Beberapa bakteri kitinolitik berpotensi sebagai agenss kontrol biologi pada penyakit tanaman yang disebabkan oleh berbagai macam cendawan fitopatogenik dan hama serangga karena dinding sel cendawan dan eksoskeleton serangga mengandung kitin sebagai struktur komponen utama (Saleem dan Khan 2011). Beragamnya kemampuan bakteri menghasilkan berbagai jenis kitinase dan enzim pendegradasi kitin lainnya kemungkinan merupakan upaya penyesuaian terhadap beragamnya jenis, tipe, dan struktur kitin yang tersedia di alam (Nasran *et al.* 2003).

### **Potensi Bakteri Kitinolitik sebagai Pengendali Hayati**

Pengendalian hayati merupakan pemanfaatan spesies-spesies makhluk hidup tertentu untuk mengendalikan hama tanaman. Spesies-spesies dari golongan rendah seperti cendawan, bakteri dan virus. Pemanfaatan spesies tersebut sebagai pengendali hayati disebabkan karena adanya interaksi antara dua spesies makhluk hidup atas keuntungan yang satu karena memangsa dan yang lainnya dirugikan karena dimakan.

Salah satu bentuk pengendalian hayati yang sudah banyak digunakan adalah dengan menggunakan berbagai jasad mikroorganisme (Duffy 1995) seperti bakteri kitinolitik. Bakteri ini sering digunakan sebagai agens pengendali hayati karena di dasarkan atas kemampuan mikroorganisme menghasilkan kitinase dan  $\beta$  1,3-glukanase yang dapat melisiskan sel jamur (El-Katatny *et al.*

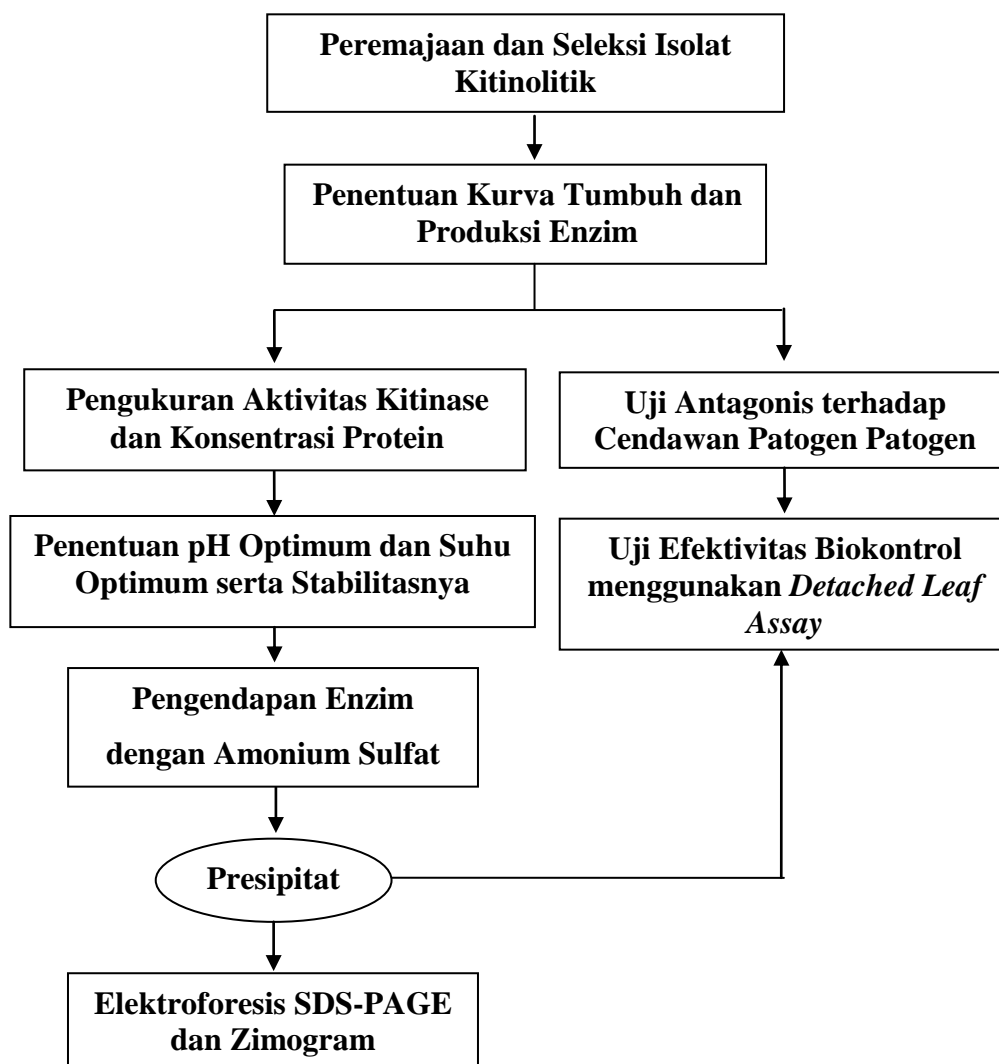


2000). Menurut Oku (1994), peranan kitinase dalam pertahanan tanaman terhadap serangan patogen terjadi melalui dua cara yaitu : (1) menghambat fungi dengan secara langsung menghidrolisis dinding miselia dan (2) melalui pelepasan elisitor endogen oleh aktivitas kitinase yang kemudian memicu reaksi ketahanan sistemik pada inang. Mekanisme interaksi antara inang dengan parasit sangat menentukan tingkat ketahanan tanaman terhadap suatu penyakit.

## METODE

### Kerangka Penelitian

Kerangka penelitian ini (Gambar 2) meliputi pengendapan kitinase isolat *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 dengan menggunakan ammonium sulfat serta pengujian efektivitas kitinase dari isolat secara *in vitro* dan *detached leaf assay*.



Gambar 2 Diagram alur penelitian ini

## **Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2013 hingga April 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, FMIPA IPB.

## **Peremajaan dan Seleksi Isolat Kitinolitik**

Sebanyak 4 isolat bakteri (SAHA 12.08, SAHA 12.13, SAHA 12.10, dan KAHN 15.08 yang diisolasi dari tanah Jambi digoreskan pada media agar kitin yang terdiri atas 1 % koloidal kitin, 0,1%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,02%  $K_2HPO_4$ , 0,1% ekstrak khamir dan 1,5% agar-agar. Isolat kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Koloni tunggal kemudian ditumbuhkan pada media koloidal kitin tanpa agar-agar. Isolat kemudian diinkubasi kembali pada inkubator goyang pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm selama 72 jam. Kultur sel kemudian disentrifugasi selama 20 menit dengan kecepatan 6.000 rpm (Sentrifuge Hermle dengan rotor 220.97). Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstrak kasar yang selanjutnya diukur aktivitas kitinasenya. Isolat yang memiliki aktivitas kitinase terbaik ditetapkan sebagai isolat terpilih.

## **Penentuan Kurva Tumbuh dan Produksi Enzim**

Sebanyak 2 lup isolat bakteri terpilih ditumbuhkan di media cair kaldu nutrient (NB) dan ditambahkan 0,3% koloidal kitin kemudian diinkubasi selama 15 jam dengan kecepatan 120 rpm pada suhu 37 °C. Selanjutnya 1% ( $10^8$  sel/ml) inokulum diinokulasi ke media NB 100 ml ditambah 0,3% koloidal kitin dalam erlenmeyer 250 ml sebagai media produksi dan diinkubasi pada suhu 37 °C dengan kecepatan 120 rpm. Setiap 6 jam dilakukan pengambilan kultur sel untuk diukur densitas selnya pada panjang gelombang 600 nm yang berlangsung 72 jam lalu dibandingkan dengan kurva standar sel. Kultur sel yang sama kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6.000 rpm pada suhu 4 °C. Supernatan yang diperoleh merupakan enzim ekstrak kasar yang selanjutnya diukur aktivitas kitinasenya.

## **Pengukuran Aktivitas Kitinase dan Konsentrasi Protein**

Aktivitas kitinase diukur dengan metode Spindler (1997) (Lampiran 1), Sebanyak 225  $\mu$ L ekstrak kasar kitinase ditambahkan ke dalam 450  $\mu$ L 0,3% koloidal kitin dan 225  $\mu$ L bufer fosfat 0,1 M pada suhu 37 °C, pH 7,0, 120 rpm. Campuran diinkubasi pada 30 °C selama 30 menit. Kemudian inkubasi dihentikan pada 100 °C selama 10 menit dan selanjutnya didinginkan selama 10 menit pada suhu 4 °C. Setelah sentrifugasi pada 8400 g selama 5 menit, filtrat ditambahkan ke dalam akuades 750  $\mu$ L dan 1500  $\mu$ L reagenss *Schales* (K-Ferrisianida dan Na-Karbonat 0,5M) dan reaksi dihentikan pada 100 °C selama 10 menit. Aktivitas enzim ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 420 nm. Satu unit aktivitas enzim didefinisikan sebagai jumlah enzim yang menghasilkan 1  $\mu$ mol N-asetil glukosamin per menit. Konsentrasi protein ditentukan dengan

metode Bradford (1976) (Lampiran 2) menggunakan *Bovine serum Albumin* sebagai standar.

### **Uji Antagonis terhadap Cendawan Patogen**

Aktivitas antagonis diuji menggunakan kultur sel dan ekstrak kasar kitinase dari isolat bakteri pada dengan metode *agar well diffusion*. Kultur sel dan ekstrak kasar kitinase isolat bakteri diambil pada waktu inkubasi yang memiliki aktivitas enzim tertinggi untuk diujikan terhadap cendawan patogen. Sebanyak 100 µl kultur sel atau ekstrak kasar kitinase dimasukkan ke dalam sumur yang dibuat 3 cm dari pinggir cawan petri dan 3 cm dari miselium cendawan umur 3 hari di medium PDA. Akuades steril digunakan sebagai kontrol. Hambatan pemanjangan miselium cendawan patogen yang mengarah ke cakram yang berisi kultur sel atau enzim dan akuades (kontrol) diamati secara visual setiap hari selama 7 hari pada suhu 25 °C. Persentase penghambatan cendawan patogen dapat dikur dengan menggunakan rumus  $[100\% \times (r_1 - r_2)/r_1]$ , dengan  $r_1$  ialah panjang pertumbuhan miselium ke arah pinggir petri (3 cm) dan  $r_2$  ialah panjang miselium ke arah sumur (Fokkema 1983). Uji ini juga dilakukan dengan menggunakan enzim kitinase hasil pemurnian untuk membuktikan bahwa hasil pemurnian masih memiliki kemampuan menghambat cendawan patogen. Uji antagonis enzim kitinase ditentukan berdasarkan adanya penghambatan pemanjangan miselium cendawan patogen saat terjadi kontak dengan enzim kitinase.

### **Penentuan pH dan Suhu Optimum Kitinase serta Stabilitasnya**

Penentuan pH optimum aktivitas enzim ekstrak kasar dan hasil pemurnian dilakukan dengan mengujikan ekstrak kasar enzim yang diperoleh pada waktu produksi tertinggi. Pengukuran aktivitas enzim diuji pada substrat koloidal kitin 0,3 % dalam bufer dengan rentang pH 4-10 (selang 1 unit) menggunakan bufer sitrat 0,1 M (pH 4-6), bufer fosfat 0,1 M (pH 7-8) dan bufer glisin-NaOH 0,1 M (pH 9-10). Penentuan suhu optimum aktivitas kitinase dilakukan dengan mengujikan ekstrak kasar enzim pada pH optimum dengan rentang suhu 25 °C - 60 °C (selang 5 °C).

Uji stabilitas enzim dilakukan dengan menginkubasikan ekstrak kasar enzim pada suhu optimum. Ekstrak kasar enzim diuji setiap 15 menit pada pH dan suhu optimumnya dengan substrat koloidal kitin 0,3%. Pengujian dilakukan hingga 180 menit. Penentuan pH dan suhu optimum serta stabilitasnya juga dilakukan pada enzim setelah dilakukan pengendapan kitinase.

### **Pengendapan Kitinase dengan Amonium Sulfat**

Pengendapan kitinase dilakukan dalam tiga langkah. Supernatan sel bebas diendapkan dengan amonium sulfat bertingkat pada kisaran 0-70 % (Scopes 1987). Penambahan tersebut disertai pengadukan selama 1 jam pada suhu 4 °C. Enzim ekstrak kasar disimpan di dalam tabung sentrifuge selama semalam pada

suhu 10 °C, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm (Sentrifuge Hermle dengan rotor 220.97) selama 20 menit. Supernatan dan endapan, kemudian endapan dilarutkan dengan bufer fosfat, pH 7.0 (perbandingan 1:1) dan lalu diukur aktivitas kitinase serta kadar proteinnya.

Elektroforesis dilakukan pada piranti elektroforesis vertikal Mini Protean 3 (Bio-Rad) pada kondisi protein terdenaturasi (SDS-PAGE) dan tidak terdenaturasi (zimogram). Berat molekul protein diukur dengan standar berat molekul dari Thermo Scientific (Rockford, USA). Standar protein berat molekul terdiri atas 14 protein yang berukuran 10-200 kDa. Elektroforesis protein menggunakan gel pemisah (10% poliakrilamida) dan gel penahan (4% poliakrilamida) (Tabel 1). Sebelum dimasukkan ke dalam sumur, sampel dicampur dengan 5x bufer sampel (Lampiran 4) di dalam tabung mikro, sedangkan standar protein tidak dicampur dengan bufer sampel. Sampel protein yang telah dicampur dengan bufer sampel dipanaskan di dalam air mendidih selama 5 menit, kecuali pada sampel zimogram tidak dipanaskan. Kemudian sebanyak 5 µl campuran tersebut dimasukkan ke dalam sumur pada gel penahan menggunakan pipet mikro. Setelah gel dipasang pada piranti elektroforesis, sebanyak 70 ml 1x bufer elektroforesis dituangkan pada tempatnya.

Tabel 1 Komposisi gel pemisah dan gel penahan untuk sepasang gel

Komposisi	10% gel pemisah		4% gel penahan
	SDS (ml)	Zimogram (ml)	(ml)
Akuades	4.1	1.1	3.075
Substrat koloidal kitin 0.3% pH 8.8	-	3.0	-
1.5 M bufer Tris-HCl pH 8.8	2.5	2.5	-
0.5 M bufer Tris-HCl pH 6.8	-	-	1.25
10% SDS	0.10	0.10	0.05
30% (29%:1%) akrilamida/bis	3.3	3.3	0.67
10% amonium persulfat (APS)	0.05	0.05	0.025
TEMED (N,N,N',N'- tetrametilen- etilendiamin	0.01	0.01	0.005

Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt, 50 mA selama 45 menit atau sampai pewarna bromofenol biru mencapai sekitar 1 cm dari tepi gel bagian bawah. Gel hasil elektroforesis dilepas dari cetakan dan jarak migrasi bromofenol biru diukur dari batas gel pemisah. Gel SDS PAGE direndam dalam larutan pewarna gel selama dua jam sambil digoyang konstan pada mesin penggoyang. Kelebihan warna dihilangkan dengan peluntur sampai diperoleh pita-pita protein berwarna biru dengan latar belakang jernih.

Setelah pengukuran migrasi bromofenol biru, gel zimogram direndam dalam larutan 2.5% Triton X-100 selama satu jam sambil digoyang konstan. Gel ditiriskan dan direndam dalam 0.1 M bufer fosfat pH 7.0 selama 2 jam sambil

digoyang perlahan dalam inkubator goyang suhu 45 °C. Selanjutnya, gel zimogram direndam dalam larutan merah kongo 0.1% selama 30 menit. Larutan tersebut diganti dengan larutan 1 M NaCl. Pita yang menunjukkan aktivitas kitinase divisualisasi di UV transluminator. Penghitungan bobot molekul kitinase dilakukan dengan cara membandingkan jarak migrasi pita kitinase dengan pita protein penanda. Persamaan linier protein penanda diperoleh dengan membuat kurva antara Rf (mobilitas relatif) dan log bobot molekul protein penanda (Lampiran 3)

$$Rf = \frac{\text{Jarak migrasi pita protein}}{\text{Jarak migrasi bromofenol biru}}$$

### **Pengujian Efektivitas Biokontrol secara *Detached Leaf Assay***

Pengujian efektivitas kitinase isolat *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dalam mengurangi serangan hawar daun yang disebabkan oleh *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* pada daun kelapa sawit dilakukan menggunakan metode Dan *et al.* (2003). Daun kelapa sawit yang berumur 3 bulan dicuci bersih menggunakan akuades steril. Perlakuan terdiri atas kultur sel 60 jam, enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan. Perlakuan kontrol yaitu daun kelapa sawit diinokulasikan hanya dengan cendawan patogen (*C. affinis* dan *C. gloeosporioides*). Perlakuan masing-masing dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Selanjutnya, daun yang diperlakukan dipotong dengan ukuran 4 cm x 3 cm. daun yang telah dipotong dicelupkan kedalam masing-masing perlakuan selama 30 menit. Daun tersebut kemudian diletakkan terbalik (permukaan atas berada pada posisi bawah) ke dalam cawan petri yang telah diberi kertas saring lembap dan penyangga berupa aluminium foil berbentuk U agar daun tidak langsung bersentuhan dengan permukaan cawan petri. Setelah 1-2 jam dikeringanginkan, 50 µl spora cendawan patogen dengan konsentrasi 4 x 10<sup>5</sup> spora/ml diteteskan pada salah satu sisi permukaan daun menggunakan mikropipet. Daun yang telah diberi perlakuan lalu diinkubasi pada ruang gelap pada suhu ruang selama 7 hari. Persentase kejadian penyakit diindikasikan dengan adanya peningkatan diameter bercak/lesi yang diamati pada hari ke-3 hingga hari ke-7 setelah inokulasi. Kemampuan pengurangan kejadian penyakit oleh perlakuan kemudian dibandingkan antar masing-masing perlakuan. Efektivitas biokontrol perlakuan atau *biocontrol efficacy* (BC) dan kejadian penyakit atau *disease incidence* (DI) dihitung dengan menggunakan rumus Chanchaichaovivat *et al.* (2007):

$$\% BC = [(T-A)/T] \times 100, \text{ and } \%DI = (A/T) \times 100.$$

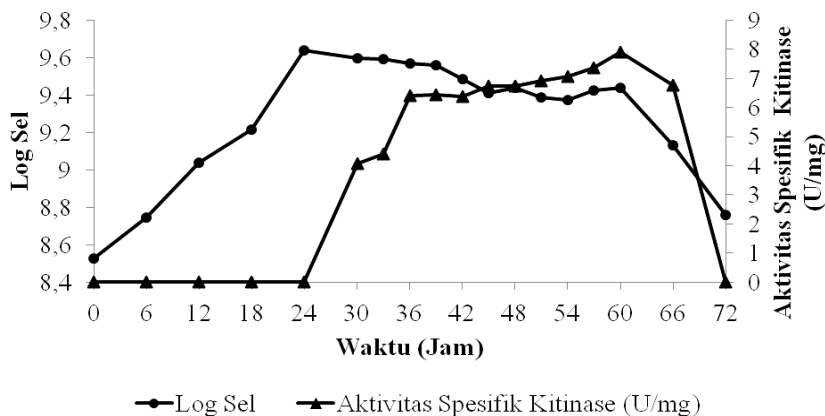
dengan BC merupakan *biocontrol efficacy* (%); T merupakan jumlah/diameter bercak yang hanya diinokulasi dengan patogen (kontrol), dan A merupakan jumlah/diameter bercak yang diinokulasi dengan antagonis dan patogen, sedangkan DI merupakan *disease incidence* (%).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Hasil

#### Kurva Pertumbuhan dan Aktivitas Kitinase dari *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08

Isolat yang diuji mampu tumbuh pada media NB + koloidal kitin pada pH 7.0 dan suhu 37 °C. Pertumbuhan isolat SAHA 12.08 mulai meningkat pada 0-24 jam setelah inkubasi dan pertumbuhan cenderung stabil hingga 60 jam inkubasi. Pertumbuhan sel mengalami penurunan setelah 72 jam inkubasi (Gambar 3). Produksi kitinase dari isolat ini mulai terlihat pada jam ke-30 inkubasi dan relatif meningkat hingga jam ke-60. Aktivitas kitinase tertinggi ditemukan pada 60 jam inkubasi dan setelah 66 jam inkubasi aktivitas kitinase tersebut tidak terdeteksi lagi (Gambar 3).



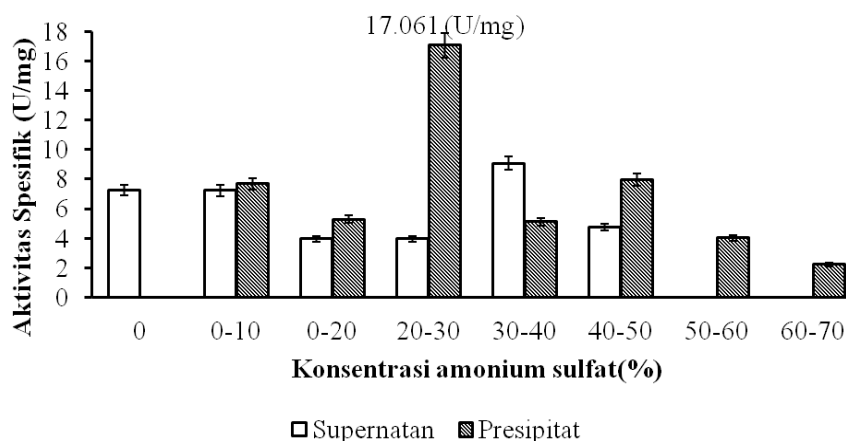
Gambar 3 Pertumbuhan sel dan aktivitas kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 pada media produksi NB+ koloidal kitin

#### Pengendapan Protein Enzim Kitinase

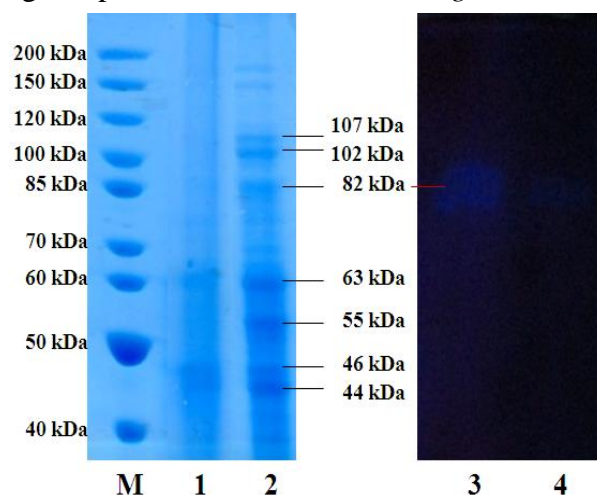
Hasil pengendapan menggunakan amonium sulfat (b/v) menunjukkan bahwa pada konsentrasi 20-30% amonium sulfat mampu mengendapkan protein dan meningkatkan aktivitas spesifik kitinase isolat *B. thuringiensis* SAHA 12.08 hingga 17.061 U/mg (Gambar 4). Kemurnian enzim yang telah dimurnikan secara parsial meningkat sebesar 2.35 kali dari sebelumnya (Tabel 2). Ekstrak kasar dan endapan enzim tersebut selanjutnya digunakan untuk pengujian SDS PAGE dan zimogram serta pengujian antagonis terhadap cendawan patogen secara *in vitro* dan *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit.

Hasil SDS PAGE yang diberi pewarna Coomassie brilliant blue G-250 menunjukkan bahwa di dalam larutan kitinase kasar *B. thuringiensis* SAHA 12.08 terdapat berbagai protein dengan berat molekul bervariasi (sumur 2, Gambar 5) yang tidak terlalu terlihat jelas. Tampaknya pengendapan kitinase dengan 30% amonium sulfat (sumur 3, Gambar 5) tidak banyak menghilangkan protein kontaminan tetapi meningkatkan konsentrasi protein. Hal ini terlihat dengan makin tebalnya pita pada sumur 3 dibandingkan pita pada sumur 2. Semakin tebal

pita hasil elektroforesis menunjukkan bahwa konsentrasi protein semakin tinggi. Hasil SDS-PAGE dari enzim hasil pengendapan amonium sulfat memperlihatkan adanya 7 pita dengan bobot molekul yang bervariasi masing-masing sebesar 107 kDa, 102 kDa, 82 kDa, 63 kDa, 55 kDa, 46 kDa, dan 44 kDa (Gambar 5). Analisis zimogram menunjukkan bahwa enzim kasar dan endapan enzim memperlihatkan adanya satu pita yang memiliki aktivitas kitinase yaitu sebesar 82 kDa.



Gambar 4 Pengaruh penambahan konsentrasi amonium sulfat terhadap pengendapan kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08



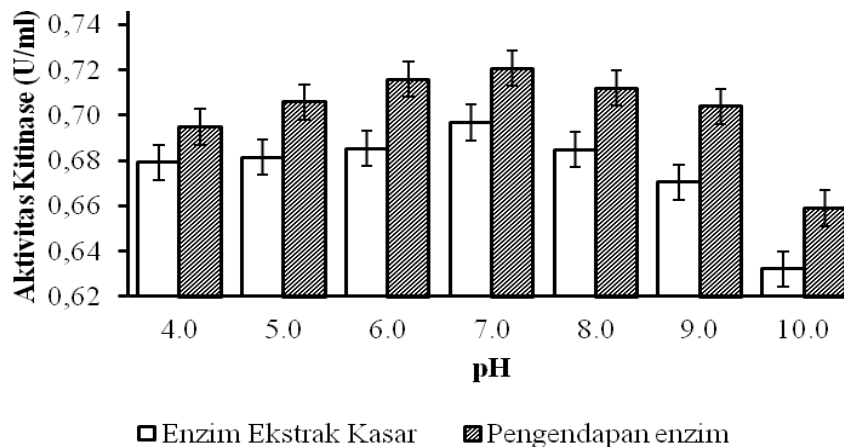
Gambar 5 SDS PAGE dan zimogram kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08. M. Marker, SDS PAGE, 1: enzim ekstrak kasar, 2: presipitat 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Zimogram, 3: presipitat 30%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4: enzim ekstrak kasar

Tabel 2 Hasil pengendapan protein kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08

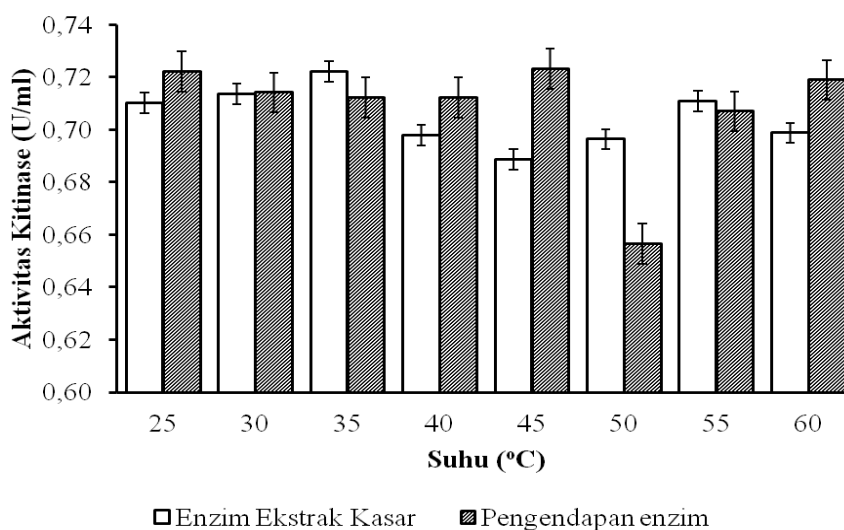
Tahap	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total aktivitas (U)	Aktivitas spesifik (U/mg)	Tingkat kemurnian (kali)	Perolehan (%)
Ekstrak kasar	100	19.68	142.6	7.24	1	100
Amonium sulfat 30%	2	0.0842	1.44	17.061	2.35	1.01

## Karakterisasi Kitinase

Aktivitas kitinase enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan isolat SAHA 12.08 pada pH optimum menunjukkan bahwa kedua enzim tersebut memiliki aktivitas kitinase maksimum pada pH 7.0 dengan nilai aktivitas kitinase masing-masing sebesar 0.697 U/ml dan 0.721 U/ml (Gambar 6). Aktivitas kitinase tetap menunjukkan aktivitas pada pH rendah hingga pH tinggi (4.0-10.0). Pengujian berdasarkan suhu menunjukkan bahwa aktivitas kitinase dari enzim ekstrak kasar memiliki aktivitas optimum pada suhu 35 °C sebesar 0.722 U/ml. Sedangkan pada enzim hasil pengendapan memiliki aktivitas optimum pada suhu 45 °C, sebesar 0.723 U/ml (Gambar 7). Penentuan stabilitas enzim ini untuk enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan dilakukan dengan menginkubasi enzim ekstrak kasar dan hasil pengendapan tersebut pada suhu optimumnya selama 180 menit. Hasil menunjukkan bahwa kedua enzim tersebut mampu stabil pada suhu optimum selama 180 menit inkubasi (Gambar 8).

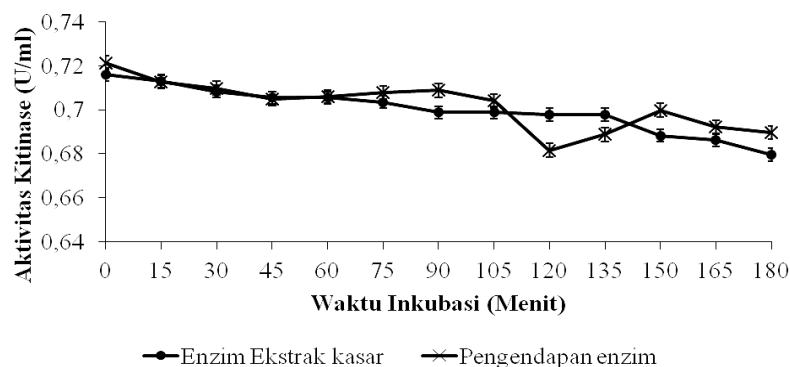


Gambar 6 Pengaruh pH terhadap aktivitas kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 ekstrak kasar dan hasil pengendapan



Gambar 7 Pengaruh suhu terhadap aktivitas kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 ekstrak kasar dan hasil pengendapan

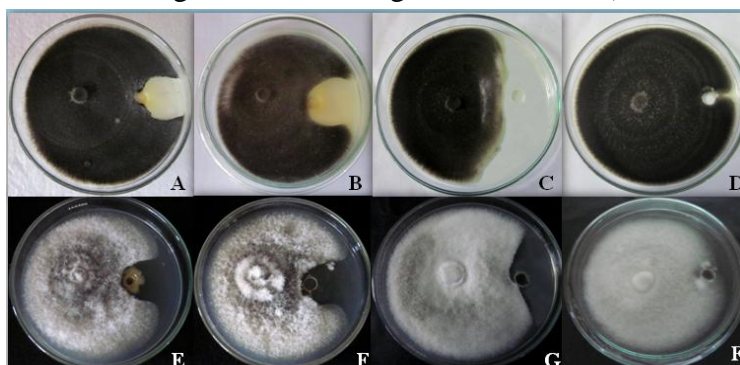




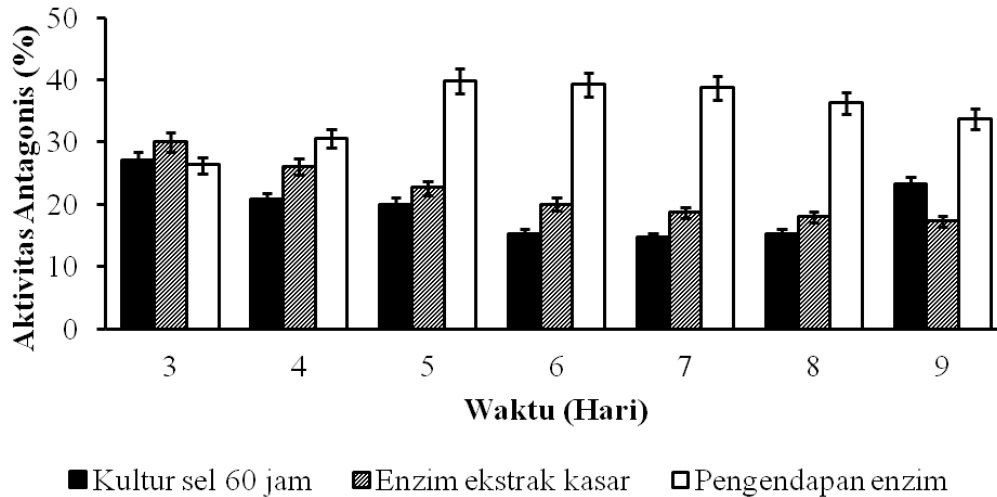
Gambar 8 Stabilitas ekstrak kasar dan pengendapan kitinase *B. thuringiensis* pada suhu optimum. (—●—) pada 35 °C dan (---×---) pada 45 °C

### Pengaruh Kitinase terhadap Cendawan Patogen secara *In vitro*

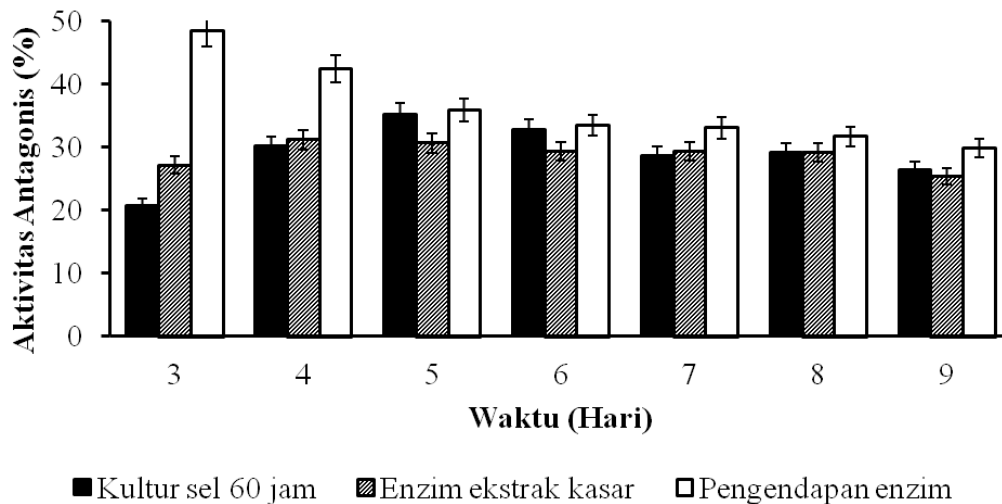
Penghambatan pertumbuhan cendawan patogen *Curvularia affinis* dan *Colletotrichum gloeosporioides* secara *in vitro* menggunakan kultur sel 60 jam, enzim ekstrak kasar dan enzim hasil pengendapan diamati di media agar-agar menggunakan metode difusi sumur (Gambar 9). Penghambatan terhadap kedua jenis patogen tersebut menunjukkan bahwa kitinase yang dihasilkan oleh isolat SAHA 12.08 mampu menghambat *C. affinis* lebih baik dibandingkan *C. gloeosporioides*. Enzim hasil pengendapan mampu menghambat pertumbuhan *C. affinis* sebesar 39.25% dan *C. gloeosporioides* sebesar 33.43% lebih baik dibandingkan kultur sel 60 jam dan enzim ekstrak kasar pada hari ke-6 setelah inokulasi. Pengamatan selama 9 hari menunjukkan bahwa kultur sel 60 jam tetap mampu menghambat *C. affinis* hingga hari ke-9, sedangkan enzim ekstrak kasar memiliki penghambatan tertinggi terhadap cendawan ini pada awal inokulasi dan cenderung menurun aktivitasnya hingga hari ke-9 (Gambar 10). Hal yang serupa juga ditunjukkan oleh enzim hasil pengendapan, kemampuan penghambatan cenderung menurun, tetapi aktivitas penghambatan terhadap cendawan patogen tetap lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain. Sedangkan penghambatan terhadap *C. gloeosporioides* antara ketiga perlakuan menunjukkan pola yang hampir sama yaitu cenderung menurun seiring masa inkubasi (Gambar 11).



Gambar 9 Efektivitas penghambatan kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 terhadap *C. affinis* (atas) dan *C. gloeosporioides* (bawah) setelah 7 hari inkubasi pada media PDA. Keterangan: A,E. kultur sel 60 jam, B,F. enzim ekstrak kasar, C,G. pengendapan enzim, D,F. kontrol.



Gambar 10 Penghambatan pertumbuhan *C. affinis* oleh kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08.

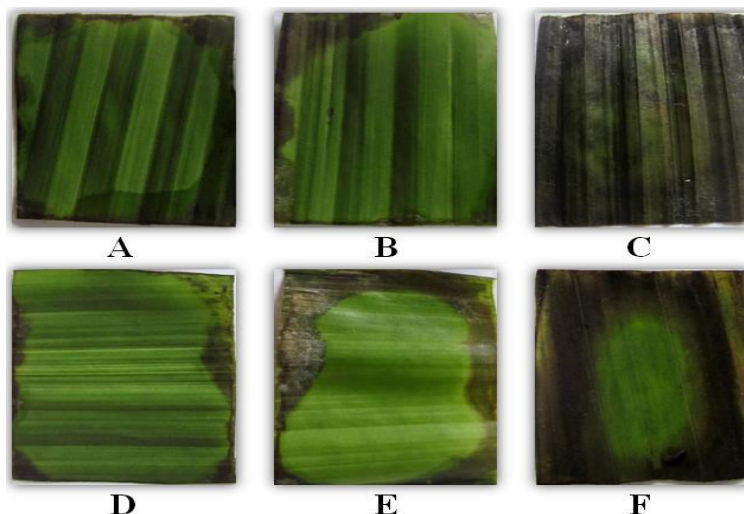


Gambar 11 Penghambatan pertumbuhan *C. gloeosporioides* oleh kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08.

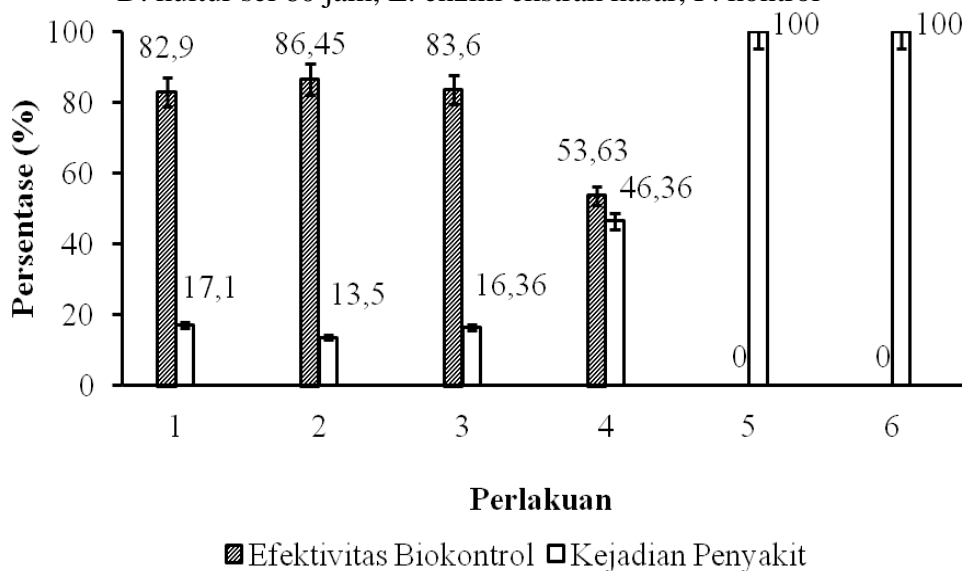
### Uji Efektivitas Biokontrol menggunakan *Detached Leaf Assay*

Pengujian efektivitas biokontrol menggunakan dua perlakuan yaitu kultur sel 60 jam dan enzim ekstrak kasar. Pengujian dengan enzim hasil pengendapan tidak dilakukan, karena enzim tersebut mampu merusak daun yang diuji akibat pengaruh amonium sulfat (data tidak ditunjukkan). Pengujian efektivitas biokontrol dari masing-masing perlakuan menunjukkan bahwa kultur sel 60 jam dan enzim ekstrak kasar memiliki kemampuan menghambat hawar daun yang disebabkan oleh *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* (Gambar 12). Enzim ekstrak kasar mampu mengurangi hawar daun yang disebabkan oleh *C. affinis* lebih baik dibandingkan dengan kultur sel 60 jam dengan nilai efektivitas biokontrol sebesar 86.45% atau kejadian penyakit sebesar 13.5% setelah 6 hari inokulasi. Sedangkan pengurangan hawar daun yang disebabkan oleh *C. gloeosporioides* lebih baik

ditunjukkan oleh kultur sel 60 jam dibandingkan enzim ekstrak kasar yaitu sebesar 83.6% atau kejadian penyakit sebesar 13.6% (Gambar 13). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat korelasi antara aktivitas atagonis *in vitro* dan efektivitas biokontrol secara *detached leaf assay*.



Gambar 12 Efektivitas penghambatan kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 terhadap hawar daun yang disebabkan oleh *C. affinis* (atas) dan *C. gloeosporioides* (bawah) menggunakan daun kelapa sawit. Keterangan: A. kultur sel 60 jam, B. enzim ekstrak kasar, C. kontrol, D. kultur sel 60 jam, E. enzim ekstrak kasar, F. kontrol



Gambar 13 Efektivitas biokontrol kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dalam mengurangi serangan penyakit yang disebabkan oleh *C. affinis* and *C. gloeosporioides*. Keterangan: 1. kultur sel 60 jam + *C. affinis*, 2. enzim ekstrak kasar + *C. affinis*, 3. kultur sel 60 jam + *C. gloeosporioides*, 4. enzim ekstrak kasar, 5. kontrol *C. affinis*, 6. kontrol *C. gloeosporioides*, setelah 5 hari inkubasi

## Pembahasan

Isolat *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 menghasilkan kitinase ekstraseluler yang mampu menghidrolisis substrat seperti koloidal kitin. Aktivitas spesifik kitinase mulai terlihat pada fase stasioner ketika jumlah sel cenderung menurun. Hal ini disebabkan oleh menurunnya nutrisi pada media, sehingga kitinase disekresikan dalam jumlah yang tinggi. Kitinase tersebut digunakan untuk mendegradasi koloidal kitin yang dapat dijadikan sebagai sumber karbon dan nitrogen oleh bakteri (Natsir *et al.* 2010). Aktivitas spesifik kitinase tertinggi terjadi pada 60 jam inkubasi dan tidak memiliki aktivitas kitinase setelah 72 jam inkubasi. Produksi enzim tertinggi ini juga dilaporkan sebelumnya oleh Narayana dan Vijayalakshmi (2009), bahwa produksi maksimum kitinase *Streptomyces* sp. ANU 6277 terjadi pada 60 jam inkubasi dan cenderung menurun seiring bertambahnya masa inkubasi. Sebagian besar kitinase dari bakteri memiliki aktivitas maksimum pada masa inkubasi 30-96 jam (Zhu *et al.* 2007; Faramarzi *et al.* 2009; Nurdebyandaru *et al.* 2010).

Enzim ekstrak kasar yang diperoleh dari produksi enzim tertinggi dapat diendapkan dengan menggunakan amonium sulfat 30% (b/v) yang mampu meningkatkan kemurnian sebesar 2.35 kali. Penambahan amonium sulfat berfungsi untuk memisahkan senyawa protein dan nonprotein dengan cara mengendapkan protein dan mengurangi kelarutannya. Cara ini merupakan tahap awal purifikasi. Ketika kelarutan protein menurun, interaksi antara sisi hidrofobik akan membentuk agregat, lalu protein dari agregat tersebut yang mengandung molekul protein yang berukuran besar akan terendapkan dan menghasilkan lebih banyak endapan hingga konsentrasi maksimal. Konsentrasi optimum tersebut disebut tingkat kejenuhan (Scopes 1994).

Persentase kejenuhan amonium sulfat untuk setiap kitinase dari berbagai isolat berbeda-beda. Tingkat kejenuhan pengendapan berkisar antara 30-85% (Zhang *et al.* 2001; Kim *et al.* 2003; Rabeeth *et al.* 2011). Seperti yang telah ditunjukkan pada Gambar 4, konsentrasi optimum amonium sulfat yang ditambahkan untuk mengendapkan kitinase dari *B. thuringiensis* SAHA 12.08 adalah 30% (b/v). Watanabe *et al.* (1994) melaporkan bahwa kitinase dari *B. circulans* WL-12 mampu terendapkan dengan penambahan amonium sulfat sebesar 40% (b/v) dan kitinase dari *Bacillus brevis* diendapkan pada konsentrasi amonium sulfat 50% (b/v) (Sheng *et al.* 2002).

Hasil SDS-PAGE dari ekstrak kasar dan endapan amonium sulfat kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 menunjukkan bobot molekul protein *B. thuringiensis* SAHA 12.08 berada pada kisaran yang luas antara 44-107 kDa. Analisis zimogram menunjukkan adanya satu pita protein yang memiliki aktivitas kitinase yaitu 82 kDa. Kitinase dari genus *Bacillus*, khususnya *B. thuringiensis* memiliki berat molekul yang beragam dan dikelompokkan menjadi kitinase BM tinggi (>30 kDa) berkisar antara 32-125 kDa (de la Vega *et al.* 2006; Barboza-Corona *et al.* 2008; Liu *et al.* 2010; Kuzu *et al.* 2012).

Karakter kitinase isolat ini, baik enzim kasar maupun enzim hasil pengendapan memiliki kisaran pH yang luas (pH 4.0-10.0). Aktivitas optimum keduanya berada pada pH 7.0. Wang dan Chang (1997) mengemukakan bahwa aktivitas optimum kitinase kebanyakan bakteri berada pada pH asam hingga basa. Hasil yang sama juga telah dilaporkan pada kitinase dari *B. thuringiensis* (Gomaa

2012) dan *Bacillus* sp. I5 (Mubarik *et al.* 2010) yang memiliki aktivitas optimum pada pH 7.0. Perubahan pH secara ekstrem menyebabkan perubahan struktur enzim dan penurunan efektivitas dan efisiensi aktivitas enzim (Farabee 2001).

Aktivitas enzim ini juga dipengaruhi oleh suhu. Enzim ekstrak kasar menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 35 °C. Sedangkan enzim hasil pengendapan menunjukkan aktivitas optimum pada suhu 45 °C. Sebagian besar kitinase dari bakteri memiliki aktivitas optimum pada suhu yang luas. Berbagai laporan menunjukkan bahwa aktivitas optimum berada pada suhu 30-75 °C (Sakai *et al.* 1998; Kim *et al.* 2003; Barboza-Corona *et al.* 2008; Mubarik *et al.* 2010; Thiagarajan *et al.* 2011; Haggag dan Abdallah 2012; Margino *et al.* 2012). Perbedaan karakteristik suhu pada enzim kasar dan enzim hasil pengendapan mungkin disebabkan oleh proses pemisahan menggunakan amonium sulfat, sehingga gugus protein yang terdapat pada enzim kasar sebelumnya berubah ketika proses pengendapan.

Karakteristik lainnya berupa stabilitas enzim menunjukkan bahwa enzim kitinase ini baik enzim kasar maupun enzim hasil pengendapan tetap stabil pada masing-masing suhu optimum enzim hingga 180 menit masa inkubasi. Hasil tersebut juga dilaporkan oleh Kuzu *et al.* (2012) pada *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HBK-51 yang mampu stabil dan tetap aktif selama 180 menit pada suhu 30-120 °C. Karakter kitinase dari *B. thuringiensis* SAHA 12.08 yang aktif pada berbagai pH dan suhu serta stabilitas yang baik pada suhu optimumnya dapat dikaitkan dengan sinergisme enzim ini dalam pengendalian cendawan patogen.

Pengendalian cendawan patogen menggunakan bakteri merupakan cara yang efektif yang telah dilakukan selama ini. Bakteri memiliki kemampuan untuk menghambat fungi patogen dengan berbagai cara, di antaranya produksi antibiotik, enzim litik dan induksi ketahanan tanaman dengan aktivasi gen seperti kitinase,  $\beta$ -1,3 glukanase, peroksidase dan phenilalanine ammonia liase (Chang *et al.* 2007). Enzim kitinase diutamakan dalam pengendalian hayati cendawan patogen saat ini karena kemampuannya mendegradasi kitin pada dinding sel cendawan (Ulhoa dan Peberdy 1991). Penelitian ini dilakukan untuk menganalisis kemampuan dari kultur sel, enzim kasar dan enzim hasil pengendapan isolat *B. thuringiensis* SAHA 12.08 dalam menghambat pertumbuhan cendawan patogen penyebab hawar daun (*C. affinis* dan *C. gloeosporioides*). Ketiga perlakuan kitinase tersebut mampu menghambat pertumbuhan kedua jenis cendawan patogen ini. Penghambatan miselium dari perlakuan menunjukkan efektivitas kitinase tersebut. Semakin tinggi persentase penghambatan miselium cendawan patogen menunjukkan tingginya efektivitas biokontrol kitinase suatu isolat. Kitinase hasil pengendapan memiliki penghambatan lebih baik daripada enzim kasar dan kultur sel terhadap dua jenis cendawan patogen ini. Hal ini mungkin disebabkan kultur sel membutuhkan waktu yang lebih banyak untuk memproduksi kitinase, sedangkan pengujian kitinase langsung mampu segera menghidrolisis kitin yang terdapat pada dinding sel cendawan patogen. Perbedaan kemampuan penghambatan terhadap cendawan patogen tersebut disebabkan oleh konsentrasi enzim hidrolitik atau senyawa metabolik sekunder yang terdapat pada enzim kasar maupun enzim hasil pengendapan (Prapagdee *et al.* 2008). Berbagai laporan tentang penggunaan ekstrak kasar maupun fraksi kitinase dalam mengendalikan cendawan patogen telah banyak dilaporkan antara lain kitinase kasar dari *Serratia marcescens* SR1

yang menghambat *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solanii* dan *Alternaria alternata* (Parani dan Saha 2011). Demikian pula fraksi kitinase *Stenotrophomonas maltophilia* juga mampu menghambat perkecambahan konidia *Bipolaris sorokiniana* (Zhang *et al.* 2001), tetapi belum ada laporan tentang penggunaan enzim kitinase khususnya *B. thuringiensis* terhadap cendawan patogen hawar daun pada tanaman kelapa sawit. Hal ini disebabkan penggunaan bakteri kitinolitik pada tanaman kelapa sawit lebih banyak digunakan untuk penghambatan *Ganoderma boninense* yang merupakan patogen utama pada tanaman kelapa sawit (Suryanto *et al.* 2012), sehingga pengujian terhadap daun kelapa sawit yang diserang oleh cendawan penyebab hawar daun perlu dilakukan.

Pengaruh perlakuan kitinase terhadap daun kelapa sawit yang terinfeksi kedua jenis cendawan patogen menunjukkan bahwa enzim ekstrak kasar memiliki penghambatan terhadap *C. affinis* sama baiknya dengan kultur sel 60 jam. Hal yang berbeda ditunjukkan pada penghambatan *C. gloeosporioides*. Kultur sel 60 jam mampu menghambat lebih baik dibandingkan enzim kasar. Hal tersebut disebabkan oleh aksi sinergisme dari mekanisme biokontrol dari kultur sel seperti produksi antibiotik dan induksi ketahanan tanaman (Podile dan Kishore 2002), karena dalam proses penghambatan cendawan patogen tanaman, kultur bakteri tidak hanya menghasilkan enzim kitinase tetapi senyawa-senyawa lain yang mampu menghambat pertumbuhan cendawan patogen. Meskipun belum ada laporan tentang biokontrol hawar daun pada tanaman kelapa sawit menggunakan kitinase dari *B. thuringiensis*, beberapa spesies *Bacillus* telah banyak digunakan sebagai agens biokontrol cendawan patogen baik sel, ekstrak kasar maupun kitinase murni diantaranya *B. cereus* terhadap *Botrytis elliptica* (Huang *et al.* 2005), *B. licheniformis* terhadap *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium culmorum*, *Pythium* sp., *Sclerotium rolfsii*, dan *Alternaria alternata* (Kamil *et al.* 2007), *B. licheniformis* dan *B. thuringiensis* mampu melindungi perkecambahan biji dari serangan *A. niger* (Gomaa 2012), kitinase murni dari *B. thuringiensis* subsp. *aizawai* yang mampu melindungi biji kacang-kacangan dari serangan enam jenis cendawan patogen (de la Vega *et al.* 2006).

Berdasarkan data yang telah ditampilkan menunjukkan bahwa penghambatan kultur sel 60 jam dan enzim kasar terhadap *C. affinis* dan *C. gloeosporioides* memiliki efek penghambatan yang sejalan, baik secara *in vitro* maupun uji biokontrol *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit.

## SIMPULAN DAN SARAN

### Simpulan

Aktivitas kitinase dari *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 tertinggi dihasilkan pada 60 jam inkubasi di media NB yang mengandung 0.3% koloidal kitin. Kitinase tersebut mampu ditingkatkan kemurniannya sebesar 2.35 kali dengan menggunakan 30% amonium sulfat. Enzim ekstrak kasar dan enzim hasil pengendapan memiliki aktivitas optimum pada pH 7.0, dan masing-masing memiliki aktivitas optimum pada suhu 35 °C dan 45 °C. Kitinase yang diujikan stabil pada suhu optimumnya masing-masing selama 180 menit. Hasil elektroforesis dengan SDS-PAGE menunjukkan bobot molekul protein yang terendapkan masing-masing sebesar 107, 102, 82, 63, 55, 46 dan 44 kDa. Analisis zimogram menunjukkan hanya satu pita protein yang memiliki aktivitas kitinase yaitu 82 kDa. Kitinase ini mampu menghambat *C. afinis* dan *C. gloeosporioides* secara *in vitro* dan dengan pengujian *detached leaf assay* menggunakan daun kelapa sawit. Kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08 memiliki potensi untuk diaplikasikan sebagai agens biokontrol terhadap serangan penyakit hawar daun pada kelapa sawit yang disebabkan oleh *C. afinis* and *C. gloeosporioides*.

### Saran

Perlu dilakukan pemurnian kitinase lebih lanjut untuk mendapatkan fraksi murni dari kitinase sehingga dapat ditentukan secara spesifik bobot molekul kitinasenya. Perlu dilakukan pengujian efektivitas biokontrol kitinase dari isolat *B. thuringiensis* SAHA 12.08 secara *in vivo* pada tanaman kelapa sawit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Akagi K, Watanabe J, Hara M, Kezuka Y, Chikaishi E, Yamaguchi T, Akutsu H, Nonaka T, Watanabe T, Ikegami T. 2006. Identification of the substrate interaction region of the chitin-binding domain of *Streptomyces griseus* chitinase C. *J Biochem.* 139(3):483–493.
- Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, Galed G, Heras A. 2009. Functional characterization of chitin and chitosan. *Curr Chem Biol.* 3(2):203-230.
- Bansode VB, Bajekal SS. 2006. Characterization of chitinase from microorganisms isolated from Lonar lake. *Indian J Biotech.* 5(3):357-363
- Barboza-Corona JE, Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernández R, Bideshi DK. 2008. Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Molec Biotechnol.* 39(1):29-37. doi: 10.1007/s12033-007-9025-4.
- Bhattacharya D, Nagpure A, Gupta RK. 2007. Bacterial chitinases: properties and potential. *Crit Rev Biotech.* 27(1):21-28.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72(2):248-254.
- Chang WT, Chen YC, Jao CL. 2007. Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Biores Technol.* 98(6):1224–1230.
- Chanchaichaovivat A, Ruenwongsa P, Panijpan B. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chili anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biol Control.* 42(3):326-335.
- Dan He, Xiao-Dong Zheng, Yuan-Ming Yin, Ping Sun, Hong-Yin Zhang. 2003. Yeast application for controlling apple postharvest diseases associated with *Penicillium expansum*1. *Bot Bull Acad Sin.* 44(3):211-216.
- de la Vega LM, Barboza-Corona JE, Aguilar-Uscanga MG, Ramirez-lepe M. 2006. Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can J Microbiol.* 52(7):651–657. doi: 10.1139/W06-019
- Driss F, Kallassy AM, Zouari N, Jaoua S. 2005. Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol.* 99(4):945–953. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x
- Duffy BK, Andrew S, DM Weller. 1995. Combination of *Trichoderma coningii* with fluorescent *Pseudomonads* for control of take-all on wheat. *Phytopathology.* 86(2):160-168.
- Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. 2004. Chitin and chitosan: chemistry, properties, and application. *J Scie Indust Res.* 63(1):20-31.
- Donderski W, Brzezinska MS. 2001. Occurance of chitinolytic bacteria in water and bottom sediment of eutrophic lakes in Ilawski lake district. *Polish J Environ Stud.* 10(5):331-336.



- El-Katatny MH, Somitsch W, Robra KH, El-Katatny MS, Gilbitz GM. 2000. Production of chitinase and  $\beta$ -1,3 glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technol Biotechnol.* 38(30): 173 – 180
- Farabee, M.J. 2001. *Enzyme: Organic Catalyst*. New York (US):W.H-Freeman & Co.
- Faramarzi MA, Fazeli M, Yazdi MT, Adrangi S, Al-Ahmadi KJ, Tasharrofi N, Mohseni FA. 2009. Optimizing of cultural conditions for production of chitinase by a soil isolate of *Massilia timonae*. *Biotechnology.* 8(1): 93-99.
- Fokkema NJ. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Phys Plant Pathol.* 3(2):195-205.
- Gohel V, Singh A, Vimal M, Ashwini P, Chatpar HS. 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr J Biotechnol.* 5(2):54-72.
- Gomaa EZ. 2012. Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol.* 50(1):103-111.
- Haggag WM, Abdallh EG. 2012. Purification and characterization of chitinase produced by endophytic *Streptomyces hygroscopicus* against some phytopathogens. *J Microbiol Res.* 2(5):145-151.
- Haryanto A. 2013. Isolation of chitinolytic bacteria used as biological control of suspected pathogenic fungi on oil palm seedlings [skripsi]. Bogor (ID): Bogor Agricultural University.
- Herdyastuti N, Raharjo JT, Mudasir, Matsjeh S. 2009. Kitinase dan mikroorganisme kitinolitik: isolasi, karakterisasi dan manfaatnya. *Indones J Chem.* 9(1):37-38.
- Huang CJ, Wang TK, Chung SC, Chen CY. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agensst, *Bacillus cereus* 28-9. *J Biochem Mol Biol.* 38(1):82-88.
- Kaban J. 2009. *Modifikasi Kimia dari Kitosan dan Aplikasi Produk Yang Dihasilkan*. Medan (ID): Universitas Sumatera Utara.
- Kamil K, Rizk M, Saleh M, Moustafa S. 2007. Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Global J Mol Sci.* 2(2):57-66.
- Khan RS, Khan ZH. 2011. Studies on soil with respect to chitinolytic *Bacillus* from Aurangabad and Akola District (M.S) India. *Biosci Discover.* 2 (3):328-332.
- Kim KJ, Yang YJ, Kim JG. 2003. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J Biochem Molec Biol.* 36(2): 185-189.
- Kittimorakul J, Pornsuriya C, Sunpapao A, Petcharat V. 2013. Survey and incidence of leaf blight and leaf spot diseases of oil palm seedlings in Southern Thailand. *Plant Pathol J.* 12(3):149-153.
- Kuzu, SB, Guvenmez HK, Denizci AA. 2012. Production of a thermostable and alkaline chitinase by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HBK-51. *Biotechnol Res Int.* 2012: 1-6. doi: 10.1155/2012/135498

- Liu D, Cai J, Xie Ch-Ch, Liu Ch, Chen Y-H. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* spp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microb Technol.* 46(4):252–256
- Lopes MA, Gomes DS, Koblitz MGB, Pirovani CP, Cascardo JC DM, Es-Net AG, Michelia F. 2008. Use of response surface methodology to examine chitinase regulation in the Basidiomycetes *Moniliophthora Perniciosa*. *J Mycol Res.* 112(4):399-406.
- Margino S, Behar C, Asmara W. 2012. Isolation and purification of Chitinase *Bacillus* sp. D2 isolated from potato rhizosfer. *Indones J Biotechnol.* 17(1):69-78.
- Matsushima R, Ozawa R, Uefune M, Gotoh T, Takabayashi J. 2006. Interspecies variation in the Kanzawa spider mite differentially affects induced defensive response in lima bean plants. *J Chem Ecol.* 32(11): 2501–2512.
- Matsumoto KS. 2006. Fungal Chitinases. *J Agri Food Biotechnol.* 28(2):93-94
- Mubarik NR, Mahagiani I, Anindyaputri A, Santoso S, Rusmana I. 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere : chitinase characterization and its application as biocontrol for whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.). *Am J Agr Biol Sci.* 5(4):430-435.
- Narayana KJP, Vijayalaksmi M. 2009. Chitinase production by *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Braz J Microbiol.* 40(4):725-733.
- Nasran S, Ariyani F, Indriati N. 2003. Produksi kitinase dan kitin diasetilase dari *Vibrio harveyi*. *J Penel Perik Indones.* 9(5):33-38.
- Natsir H, Patong AR, Suhartono MT, Ahmad A. 2010. Production and characterization of chitinase enzymes from sulili hot spring in south sulawesi, *Bacillus* sp. HAS, 3-1a. *Indo J Chem.* 10(2):263-267.
- Naznin R. 2005. Extraction of chitin and chitosan from shrimp (*Metapenaeus monoceros*) shell by chemical method. *Pakist J Biol Sci.* 8(8):1051-1054.
- Nurdebyandaru N, Mubarik NR, Prawasti TS. 2010. Chitinolytic bacteria isolated from chili rhizosphere: chitinase characterization and application as biocontrol for *Aphis gossypii*. *Microbiol Indones.* 4(3):103-107.
- Oku H. 1994. *Plant pathogenesis and disease control*. London (UK): Lewis Publ.
- Parani K, Shetty GP, Saha BK. 2011. Isolation of *Serratia marcescens* SR1 as a source of chitinase having potentiality of using as a biocontrol agensst. *Indian J Microbiol* 51(3):247–250. doi 10.1007/s12088-011-0065-x
- Peter MG. 2005. *Chitin and Chitosan in Fungi*. Postdam (DE): J Wiley.
- Podile AR, Kishore GK. 2002. Biological control of peanut diseases. In S.S. Gnanamanickam, editor. *Biological control of crop diseases*. New York (US):Marcel Dekker, Inc. hlm 131–160.
- Prapagdee B, Kuekulvong C, Mongkolsuk S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygrosopicus* against phytopathogenic fungi. *Int J Biol Sci.* 4(5): 330-337.
- Purwani EY, Toharisman A, Chasanah E, Laksmi JF, Welan V, Suhartono MT, Purwadaria T, Hwang JK, Pyun YR. 2002. Studi pendahuluan enzim kitinase ekstraseluler yang dihasilkan oleh isolat bakteri asal manado. *J Teknol Indust Pang.* 8(2):111-117.

- Rabeeth M, Anitha A, Srikanth G. 2011. Purification of an antifungal endochitinase from a biocontrol agent *Streptomyces griseus*. *Pakist J Biol Sci.* 14(16):788-797. doi: 10.3923/pjbs.2011.788.797.
- Sakai K, Yokota A, Kurokawa H, Wakayama M, Moriguchi M. 1998. Purification and characterization of three thermostable endochitinase of a noble *Bacillus* sp. strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl Environ Microbiol.* 64(9):3397-3402
- Saleem R, Khan ZH. 2011. Studies on soil with respect to chitinolytic *Bacillus* from Aurangabad and Akola District (M.S.) India. *Biosci Discover.* 2(3): 328-332.
- Sanjaya I, Yuanita L. 2007. Adsorpsi Pb (II) oleh kitosan hasil isolasi kitin cangkang kepiting bakau (*Scylla sp*). *J Ilmu Dasar.* 8(1):30-36.
- Shanmugaiah V, Mathivanan N, Balasubramanian N, Manoharan PT. 2008. Optimization of cultural conditions for production of chitinase by *Bacillus laterosporous* MML2270 isolated from rice rhizosphere soil. *Afr J Biotechnol.* 7(15):2562-2568.
- Shahidi, F, Arachchi JKV, Jeon YJ. 1999. Food applications of chitin and chitosans. *Trends Food Sci Technol.* 10(2):37-51.
- Spindler KD. 1997. Chitinase and chitosanase assays. In: Muzarelli RAA, MGPeter, editors. Chitin Handbook. Grottamare (IT): Alda Tecnografica.
- Scopes RK. 1994. *Protein purification, principles and practice.* 3rd edition. New York (US): Springer-Verlag.
- Sheng L, An ZZ, Rong GZ, Chen B, Da HW. 2002. Purification and characterization of a novel chitinase from *Bacillus brevis*. *Act Biochim Biophys Sin.* 34(6):690-696.
- Suryanto D, Wibowo RH, Siregar EBM, Munir E. 2012. A possibility of chitinolytic bacteria utilization to control basal stems disease caused by *Ganoderma boninense* in oil palm seedling. *Afr J Microbiol Res.* 6(9): 2053-2059.
- Suzuki K, Taiyoji M, Sugawara N, Nikaidou N, Henrissat B, Watanabe T. 1999. The third chitinase gene (chic) of *Serratia mercenscens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J.* 343(4):587-596.
- Thiagarajan V, Revathi R, Aparanjini K, Sivamani P, Girilal M, Priya S, Kalaichelvan PT. 2011. Extracellular chitinase production by *Streptomyces* sp. PTK19 in submerged fermentation and its lytic activity on *Fusarium oxysporum* PTK2 cell wall. *Int J Curr Sci.* 1(1):30-44.
- Toharisman A, Suhartono MT, Barth MS, Hwang JK, Pyun YR. 2005. Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Bacillus licheniformes* Mb-2. *World J Microbiol Biotechnol.* 21(5):733-738. doi: 10.1007/s11274-004-4797-1
- Ulhoa CJ, Peberdy JF. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J Gen Microbiol.* 137(9):2163-2169.
- Wang SL, Chang WT. 1997. Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol.* 63(2):380-386.

- Watanabe T, Ito Y, Yamada T, Hashimoto M, Sekine SH, Tanaka H. 1994. The roles of C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation. *J Bacteriol.* 176(15):4465-4472.
- Yong T, Hong J, Zhangfu L, Li Z, Xiuqiong D, Ke T, Shaorong G, Shigui L. 2005. Purification and characterization of an extracellular chitinase produced by bacterium C4. *Ann Microbiol.* 55(3):213-218.
- Zhang Z, Yuen G, Sarath G, Penheiter AR. 2001. Chitinase from the plant disease biocontrol agensst, *Stenotrophomonas maltophilia* C3. *Phytopathology.* 91(2):203-211.
- Zhu XF, Zhou Y, Feng JL. 2007. Analysis of both chitinase and chitosanase produced by *Sphingomonas* sp. CJ-5. *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(11):831-838
- Zohuriaan MJ, Mehr A. 2004. Advances in chitin and chitosan modification through graft copolymerization: a comprehensive review. *Iran Polym J.* 14 (3): 235-265.

## LAMPIRAN

Lampiran 1 Metode pengujian aktivitas kitinase (Spindler 1997)

Kultur sel disentrifugasi (8400 g, 10')



Supernatan (enzim ekstrak kasar)



Bahan	Sampel ( $\mu$ l)	Kontrol-A ( $\mu$ l)	Kontrol-B ( $\mu$ l)
Koloidal kitin	450	450	-
Bufer fosfat	225	225	-
Enzim ekstrak kasar	225	-	225



Inkubasi (30 °C, 30')



Inkubasi dihentikan (100 °C, 30')



didinginkan, 10'



Kontrol-A dicampurkan dengan kontrol-B menjadi kontrol



Sampel dan kontrol disentrifugasi 8400 g, 5'



Supernatan yang dihasilkan merupakan campuran enzim



Bahan	Sampel ( $\mu$ l)	Kontrol ( $\mu$ l)	Blanko ( $\mu$ l)
Enzim campuran	300	300	-
Akuades	750	750	1050
Reagenss Schales	1500	1500	1500



Reaksi dihentikan (100 °C, 10')

Kemudian diukur absorbansinya pada  $\lambda$  420 nm

Rumus untuk menghitung aktivitas kitinase:

$$\frac{900}{300} \times \frac{1000}{225} \times \frac{1}{30} \times \frac{1}{221.2} \times \text{Konsentrasi NAG (ppm)}$$

Keterangan: 900 = volume larutan awal (koloidal kitin, bufer, enzim)

300 = volume larutan setelah inkubasi

100 = konversi ml ke  $\mu\text{l}$

225 = volume enzim/supernatant dalam larutan

30 = waktu inkubasi

221.2 = bobot molekul N-asetil glukosamin (NAG)

Konsentrasi NAG = Absorbansi (blanko-sampel) - (blanko-kontrol), kemudian nilai NAG diperoleh dari grafik konsentrasi NAG vs absorbansi

Lampiran 2 Metode pengukuran kadar protein (Bradford 1976)

Pereaksi	Blanko ( $\mu\text{l}$ )	Standar ( $\mu\text{l}$ )	Sampel ( $\mu\text{l}$ )
Standar protein (BSA)	-	50	-
Akuades	50	-	-
Enzim	-	-	50
Reagenss Bradford	2500	2500	2500



Campuran dihomogenkan dengan vortex



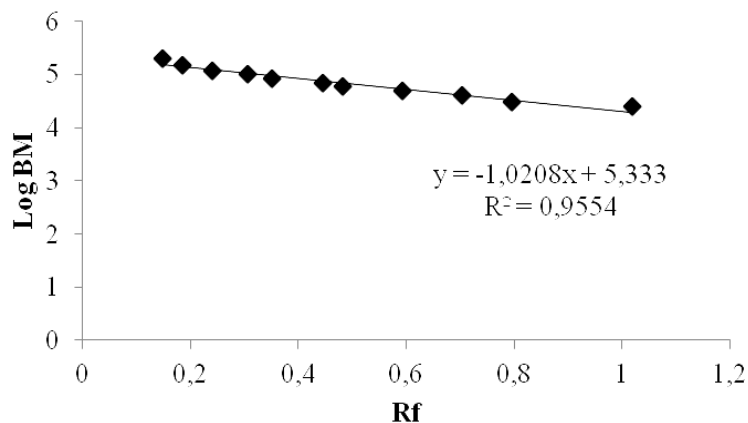
Diamkan 10-20'



Absorbansi diukur pada  $\lambda$  595 nm

Lampiran 3 Penghitungan bobot molekul kitinase *B. thuringiensis* SAHA 12.08

Pita ke-	BM	Log BM	BPB (cm)	Pita (cm)	Rf
1	200000	5.30103	5.4	0.8	0,14815
2	150000	5.17609	5.4	1.0	0,18519
3	120000	5.07918	5.4	1.3	0,24074
4	100000	5	5.4	1.65	0,30556
5	85000	4.92942	5.4	1.9	0,35185
6	70000	4.8451	5.4	2.4	0,44444
7	60000	4.77815	5.4	2.6	0,48148
8	50000	4.69897	5.4	3.2	0,59259
9	40000	4.60206	5.4	3.8	0,7037



Kurva linear Rf vs Log BM

Pita protein hasil pengendapan 30% amonium sulfat

BPB (cm)	Pita (cm)	Rf	log BM	BM (kDa)
5,4	1	0,185185	5,143963	139,3038
5,4	1,1	0,203704	5,125059	133,3703
5,4	1,6	0,296296	5,030541	107,2855
5,4	1,7	0,314815	5,011637	102,7157
5,4	2,2	0,407407	4,917119	82,62643
5,4	2,8	0,518519	4,803696	63,63499
5,4	3,1	0,574074	4,746985	55,84509
5,4	3,5	0,648148	4,67137	46,92129
5,4	3,6	0,666667	4,652467	44,92282

Keterangan: Rf = *retention factor* (mobilitas relatif), BPB = *bromo phenol blue*  
BM = bobot molekul

Lampiran 4 Prosedur pembuatan reagenss yang digunakan dalam penelitian

### Pereaksi Bradford (Bradford 1976)

Sebanyak 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dilarutkan di dalam 50 ml 95% etanol. Kemudian ditambahkan 85% asam ortofosfat dan diencerkan dengan akuades hingga 1000 ml.

### Elektroforesis gel poliakrilamida SDS dan zimogram

#### 30% (29%:1%) akrilamida/bis

Sebanyak 29.2 g akrilamida dicampur dengan 0.8 g N'N'-bis-metilen-akrilamida, dilarutkan dengan akuades hingga 100 ml. Campuran disaring dengan kertas saring, dan disimpan pada botol gelap pada suhu 4 °C. Sebelum digunakan campuran divakum selama 15 menit pada suhu kamar.

**1.5 M bufer Tris-HCl pH 8.8**

18.15 g Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris basa) dimasukkan ke dalam 50 ml akuades, pH diatur 8.8 dengan 1 N HCl. Akuades ditambahkan hingga tercapai volume akhir 100 ml. Larutan disimpan pada suhu 4 °C.

**0.5 M bufer Tris-HCl pH 6.8**

6 g Tris (hidroksimetil) aminometan (Tris basa) dimasukkan ke dalam 50 ml akuades, pH diatur 6.8 dengan 1 N HCl. Akuades ditambahkan hingga tercapai volume akhir 100 ml. Larutan disimpan pada suhu 4 °C.

**10% SDS**

Satu ml akuades mengandung 0.1 g SDS. Larutan disimpan pada suhu 4°C. Larutan ini dibuat segar setiap minggu.

**10% amonium persulfat (APS)**

Satu ml akuades mengandung 0.1 g APS. Larutan ini harus tersedia dalam keadaan segar

**0.3% koloidal kitin pH 8.8**

Sebanyak 0.03 g koloidal kitin dilarutkan dengan 10 ml 1.5 M bufer Tris-HCl pH 8.8. Proses pelarutan dipercepat dengan menginkubasi larutan pada suhu 40-50 °C pada penangas air. Larutan ini disediakan dalam keadaan segar.

**5x bufer elektroforesis pH 8.3**

Larutan ini terdiri dari: 9 g Tris basa, 43.2 g glisin, dan 3 g SDS yang dilarutkan hingga 600 ml dengan akuades. Untuk membuat 100 ml larutan, 20 ml 5x larutan stok diencerkan dengan akuades. Larutan disimpan pada suhu 4 °C.

**5x bufer sampel**

Larutan ini terdiri dari: 0.6 ml 1M Tris-HCl pH 6.8 (konsentrasi akhir 60 mM), 5 ml 50% gliserol (25%), 2 ml 10% SDS (2%), 0.5 ml β-merkaptotanol (14.4 mM), 1 ml 1% bromofenol biru (0.1%) dan 0.9 ml akuades. Sampel protein diencerkan dengan perbandingan 1:4 dengan 5x larutan stok. Larutan disimpan pada suhu 4 °C.

**Larutan pewarna gel**

Sebanyak 50 ml methanol, 10 ml asam asetat, dan 0.6 g Coomassie Blue G-250 dilarutkan sampai 100 ml dengan akuades. Larutan disaring dengan kertas saring biasa, dan disimpan pada suhu kamar.



**Larutan peluntur**

Seratus ml larutan peluntur mengandung 5 ml methanol dan 7.5 ml asam asetat 100 ml. Larutan disimpan pada suhu kamar.

**Larutan renaturasi**

Sebanyak 1.25 ml Triton X-100 dilarutkan dengan 50 ml akuades. Larutan dicampur dengan batang pengaduk sampai homogen.

## RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Aceh Utara pada tanggal 14 Februari 1990 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara dari pasangan ayah Azis Amril dan ibu Yasmarli. Pendidikan sarjana (S1) ditempuh di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatera Utara, lulus pada tahun 2011. Pada tahun 2012, penulis diterima di Program Studi Mikrobiologi (MIK) pada Program Pascasarjana IPB dengan beasiswa unggulan calon dosen DIKTI tahun 2012.

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains (MSi), penulis melakukan penelitian dengan judul “Kitinase *Bacillus thuringiensis* SAHA 12.08 sebagai Agenss Biokontrol Penyakit Hawar Daun pada Tanaman Kelapa Sawit”. Penelitian ini dibimbing oleh Dr Nisa Rachmania Mubarik, MSi dan Prof Dr Aris Tri Wahyudi, MSi. Penelitian ini telah disajikan pada *International Conference on Beneficial Microbes (ICOBM) 2014* di Penang, Malaysia, Pada tanggal 27-29 Mei 2014. Artikel penelitian ini juga telah disubmit ke jurnal internasional *Research Journal of Microbiology (RJM)* terindeks Scopus.

