

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI  $\beta$ -1,3-GLUKANASE AKAR SEMAI TUSAM  
(*PINUS MERKUSII* JUNGH. ET DE VRIESE) YANG BERASOSIASI DENGAN  
FUNGI EKTOMIKORISA**

***ISOLATION AND CHARACTERIZATION  $\beta$ -1,3-GLUCANASE FROM TUSAM  
SEEDLING ROOTS  
(*PINUS MERKUSII* JUNGH. ET DE VRIESE) ASSOCIATED WITH  
ECTOMYCORRHIZAL FUNGI***

**M.D. Anggoro**

*Balai Konservasi Sumber Daya Alam Kalimantan Timur, Samarinda*

**S.M. Widyastuti**

*Fakultas Kehutanan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

**S. Margino**

*Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

**ABSTRACT**

*Association between tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) seedling roots with ectomycorrhiza fungi was expected to increase the activity  $\beta$ -1,3-glucanase level in the plants. This enzyme has potency to protect seedling from soil borne fungal pathogens by degrading the fungal cell walls. The objectives of this research were to isolate and characterize  $\beta$ -1,3-glucanase from tusam seedling roots associated with ectomycorrhiza fungi.*

*Crude protein was isolated with ammonium sulfat precipitation and then purified by gel filtration chromatography and characterize molecular weight, temperature and pH for optimum the activity.*

*The enzym from tusam seedling roots associated with ectomycorrhizal fungi, designated as GLUC15 have 15 kD molecular weight, 30° – 40° C temperature and pH 5 – 7 for optimum activity.*

**Key words:**  *$\beta$ -1,3-glucanase, tusam, fungi, ectomycorrhiza*

**INTISARI**

Asosiasi antara akar tusam dengan fungi pembentuk ektomikorisa diduga mengimbas adanya enzim  $\beta$ -1,3-glukanase. Enzim ini memberikan kontribusi terhadap ketahanan semai tusam dalam menghadapi fungi patogen melalui aktivitas enzim tersebut dalam mendegradasi dinding sel fungi yang mengandung glukana. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan karakterisasi  $\beta$ -1,3-glukanase akar semai tusam yang berasosiasi dengan fungi pembentuk ektomikorisa.

*Crude protein* diisolasi melalui tahapan pengendapan ammonium sulfat 70% dan kemudian dipisahkan menggunakan kromatografi gel filtrasi.  $\beta$ -1,3-glukanase yang diperoleh dikarakterisasi berat molekul, pH, dan suhu optimal aktivitas enzim.

Enzim  $\beta$ -1,3-glukanase dari akar semai tusam yang berasosiasi dengan fungi pembentuk ektomikorisa, yang kemudian disingkat GLUC15 memiliki berat molekul 15 kD, kurang tahan pemanasan dengan suhu optimal aktivitas 30° – 40° C, bekerja pada kondisi asam dengan aktivitas pH optimal 5 – 7.

**Kata kunci :**  *$\beta$ -1,3-glukanase, tusam, fungi, ektomikorisa*

## PENGANTAR

Pengendalian patogen menggunakan pendekatan kultur teknik (teknik penanaman) dan kimiawi belum memberikan hasil yang memadai. Sebagai alternatif dikembangkan pengendalian hayati yang sangat menguntungkan, ramah lingkungan serta telah teradaptasi yaitu melalui kajian terhadap asosiasi ektomikorisa pada akar tusam. Asosiasi akar dengan fungi pembentuk ektomikorisa tidak saja memberi keuntungan terhadap penyerapan hara terutama P tetapi juga perlindungan secara fisik, kimiawi, antibiosis, stabilitas rhizosfer dan/atau produksi metabolit anti fungal.

Salah satu enzim yang potensial memiliki aktivitas *antifungal* pendegradasi dinding sel fungi yang mengandung glukukan adalah b-1,3-glukanase. Enzim ini banyak menarik perhatian dalam mekanisme pertahanan tumbuhan terhadap serangan fungi patogen sehingga dimasukkan dalam golongan *pathogenesis-related protein* (PR-2 protein) (Peumans dkk., 2000) dan dapat juga berperan pada mekanisme diferensiasi sel (Crutz dkk., 1995). Diduga asosiasi antara akar semai tusam dengan fungi pembentuk ektomikorisa memberikan kontribusi terhadap ketahanan semai tusam (*Pinus merkusii* Jungh *et de* Vriese) terhadap fungi patogen tular tanah melalui adanya enzim b-1,3-glukanase. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakterisasi b-1,3-glukanase akar semai tusam yang berasosiasi dengan fungi pembentuk ektomikorisa. Hasil penelitian ini memberikan peluang untuk pengembangan bioteknologi mikorisa dalam mekanisme pengendalian hayati.

## BAHAN DAN METODE

**Akar semai tusam.** Akar semai tusam diambil dari benih tusam yang disemaikan pada media yang terdiri dari campuran 70 % pasir steril dan 30% tanah inokulum yang mengandung fungi

pembentuk ektomikorisa (diambil dari tanah tegakan tusam di Kaliurang, Yogyakarta) mengacu pada metode yang digunakan oleh Tektonia (2002).

**Uji aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase.** Fraksi yang terkumpul diuji kandungan protein total tiap fraksi pada serapan 280 nm menggunakan spektrofotometer (Beckman) dan aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase pada fraksi-fraksi yang menunjukkan adanya protein dari uji kandungan protein total.

**Uji kandungan protein total.** Isolasi *Pathogenesis Related Protein* menggunakan metode Vannini dkk. (1999). Sebanyak tiga puluh gram akar semai tusam yang dibekukan (*deep freeze*,  $-80^{\circ}\text{C}$ ) dan ditambahkan nitrogen cair kemudian dihancurkan menggunakan mortar sampai menjadi serbuk. Serbuk yang dihasilkan diekstrak menggunakan 100 ml 50mM Tris HCl, pH 8,2 yang mengandung 0,5 M NaCl selama 1 jam pada suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Ekstrak disentrifuge selama 30 menit (25000 g), dilanjutkan dengan pengendapan menggunakan ammonium sulfat 70%. Protein terendapkan dipisahkan dari supernatan menggunakan sentrifuge dengan kecepatan 25000 g selama 30 menit. Sampel didialisis menggunakan membran dialisis (Sigma) MWCO 12000 dan buffer 20mM Tris HCl, pH 8,2. Hasil dialisis dipekatkan menggunakan *Polyethylene Glycol* 35000 (PEG 35000). Pengukuran kandungan protein total dilaksanakan mengikuti prosedur yang dibuat oleh produsen (*BioRad*) menggunakan *BioRad Protein Assay*.

**Pemurnian  $\beta$ -1,3-glukanase.** Semua langkah pemurnian dilakukan pada kondisi suhu  $4^{\circ}\text{C}$ . Pemisahan  $\beta$ -1,3-glukanase dilakukan dengan menggunakan kromatografi gel filtrasi. Penyiapan sistem kromatografinya mengacu pada metode Colligan *et al.*, (1995) yang juga dilakukan oleh Harjono *et al.*, (2001) dengan modifikasi bahan dan panjang kolom yang

dipergunakan (silinder kaca, 1,4 x 60 cm dengan ketebalan 0,5 mm). Fraksi dikoleksi setiap 2 ml menggunakan kolektor fraksi (*Atta Mini Collector*) dengan kecepatan alir 0,087 ml/menit. Fraksi-fraksi yang menunjukkan adanya aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase dikumpulkan dan didialisis menggunakan buffer 0,025 M Imidazole, pH 7,4 selama semalam.

Regenerasi kolom dilakukan dengan pencucian matriks dalam kolom menggunakan 2 M NaOH 1 - 2 kali volume kolom. Kolom kemudian diekuilibrasikan dengan buffer yang sama 2 - 3 kali volume kolom sebelum aplikasi sampel selanjutnya.

**Karakterisasi  $\beta$ -1,3-Glukanase.** SDS PAGE 12,5 % yang dibuat dengan mengacu pada metode dasar Laemli *et al.*, (1970). Pengecatan untuk visualisasi protein pada gel yang telah selesai di-*running* menggunakan dua macam cara yaitu pengecatan *Coomassie brilliant blue* dan *Silver stain Kit* (Biorad).

1. Pengujian pH optimal untuk aktivitas enzim  
Pengujian pH untuk aktivitas enzim optimal dilakukan dengan modifikasi metode yang dipergunakan oleh Aono *et al.*, (1995) dan juga oleh Fontaine dkk. (1997). Enzim dalam berbagai macam buffer, ditera sampai diperoleh kisaran yang pH 3 - 10 dan mengandung substrat laminarin 1mg/ml. Buffer sitrat digunakan untuk peneraan pH 3 - 6, buffer fosfat untuk peneraan pH 7 - 8, dan buffer karbonat-bikarbonat untuk peneraan pH 9 - 10. Aktifitas enzim diuji menggunakan metode Kauffman *et al.*, (1987) dan kadar gula reduksi hasil aktifitas pemecahan enzim terhadap substrat laminarin diukur menggunakan metode DNS (Aono dkk., 1995).
2. Pengujian suhu optimal aktivitas enzim  
Pengujian suhu optimal aktivitas enzim dilakukan dengan menginkubasikan enzim dan substrat laminarin 1 mg/ml pada berbagai tingkat suhu dengan kisaran antara 10 - 60° C dan interval 10° C dengan dua ulangan.

Enzim ini bekerja optimal pada suhu 40° C dan akan langsung terhambat aktifitasnya pada suhu diatas 50° C dengan kisaran aktifitas optimal antara 30 - 40° C. Data yang diperoleh dirata-rata dan dibuat grafik hubungan antara suhu (x) dengan aktifitas enzim (y).

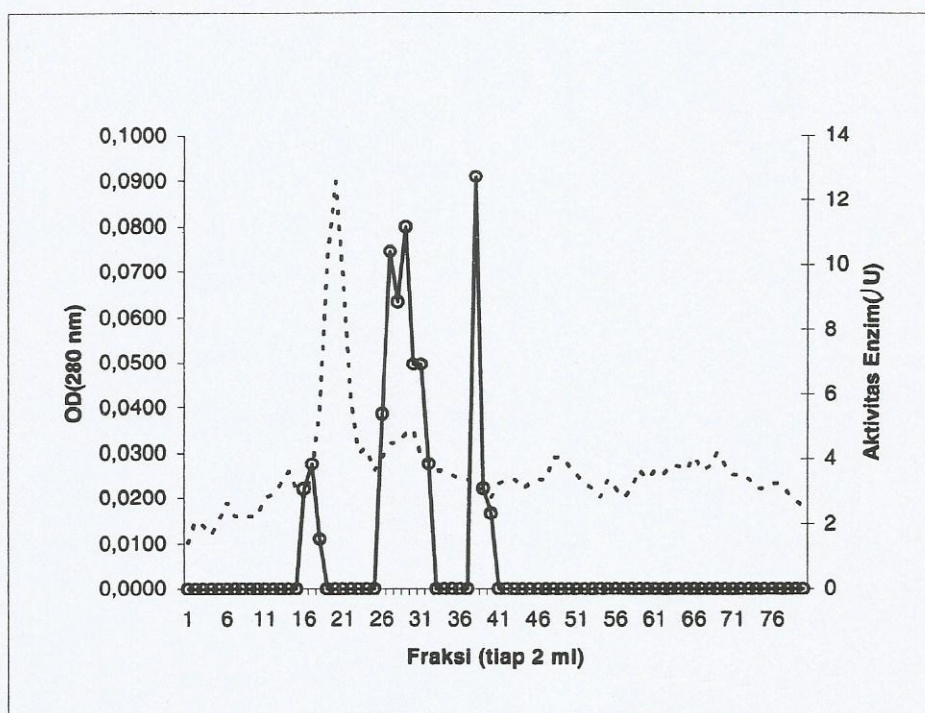
## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Isolasi  $\beta$ -1,3-Glukanase Akar Semai Tusam.**  $\beta$ -1,3-glukanase dapat dideteksi aktifitasnya pada *crude protein* yang diekstraksi dari akar semai tusam yang berasosiasi dengan fungi pembentuk ektomikorisa. Hal ini menunjukkan bahwa adanya asosiasi tersebut mampu memacu respon aktifitas enzim tersebut. Interaksi antara fungi pembentuk ektomikorisa dengan akar tanaman akan menimbulkan respon ketahanan tanaman terhadap benda asing. Dalam hal ini respon tersebut adalah enzim  $\beta$ -1,3-glukanase yang merupakan salah satu jenis protein yang berkaitan dengan patogenitas (*pathogenesis-related protein*) (Yun *et al.*, 1997; Selitrennikoff, 2001).

*Crude protein* tersebut kemudian dipisah-pisahkan untuk mendapatkan  $\beta$ -1,3-glukanase melalui kromatografi gel filtrasi. Hasil kromatografi menunjukkan bahwa puncak protein terletak paling tinggi pada fraksi ke 21. Aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase dapat terdeteksi membentuk tiga puncak sepanjang fraksi yang dikumpulkan dan tidak mengikuti pola puncak kandungan protein total.  $\beta$ -1,3-glukanase diduga bukan merupakan protein yang diproduksi paling banyak dan dimungkinkan dalam *crude protein* terdapat 3 macam  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul protein yang berbeda. Berat molekul protein yang berbeda disebabkan, pada pemisahan menggunakan kromatografi gel filtrasi, prinsip pemisahan didasarkan pada perbedaan ukuran molekul. Perbedaan ukuran molekul tersebut menyebabkan kemampuan yang berbeda-beda dari tiap molekul yang akan

dipisahkan untuk memasuki pori-pori pada butiran gel yang digunakan sebagai matriks pemisahan (Price dan Stevens, 1984). Molekul yang berukuran kecil yang dapat memasuki pori-pori akan tertahan selama melewati kolom, sedangkan molekul yang berukuran lebih besar tidak tertahan dalam pori-pori sehingga akan melewati kolom lebih cepat (Price dan Stevens, 1984). Dengan demikian, makin besar nomor tabung fraksi yang menampung eluen dari sistem kromatografi, akan makin kecil ukuran molekul protein yang ada didalamnya. Ketiga puncak aktifitas enzim yang berbeda sepanjang profil elusi tersebut menggambarkan pemisahan berdasarkan berat molekul protein yang terjadi dalam sistem kromatografi (Gambar 1).

SDS-PAGE pada fraksi-fraksi yang menunjukkan aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase, tidak memberikan hasil yang jelas. Hal ini disebabkan kecilnya jumlah protein yang ada pada tiap fraksi yang dikumpulkan. Untuk dapat tervisualisasi dengan baik, sesuai pengecatan protein yang dipergunakan, diperlukan jumlah protein yang cukup. Kendala jumlah protein yang sedikit dan diperlukannya jumlah sampel yang cukup banyak diatasi dengan melakukan pemekatan sekaligus penggabungan fraksi-fraksi yang membentuk satu puncak aktifitas enzim yang sama dengan demikian jumlah protein pada sampel akan lebih banyak. Dengan menggabungkan, fraksi-fraksi dari puncak yang sama akan didapatkan jumlah sampel yang lebih besar dan setelah pemekatan kadar protein-



Gambar 1. Profil elusi hasil kromatografi gel filtrasi pada kolom *Sephacryl S-300 HR* untuk isolasi enzim  $\beta$ -1,3-glukanase. Garis terputus-putus (-----) menunjukkan absorbansi fraksi pada panjang gelombang 280 nm, sedangkan garis tidak terputus menunjukkan aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase terhadap 1 mg/ml laminarin (Sigma) dalam buffer asetat pH 5,2 pada tiap fraksi.

yang ada pada tiap sampel lebih tinggi. Sampel pertama merupakan penggabungan fraksi nomor 16 – 18, sampel kedua merupakan penggabungan fraksi nomor 26 – 32, dan sampel ketiga merupakan penggabungan fraksi nomor 38 – 40. Setelah pemekatan, ketiga sampel tersebut diuji aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase dengan hasil sebagai berikut pada Tabel 1.

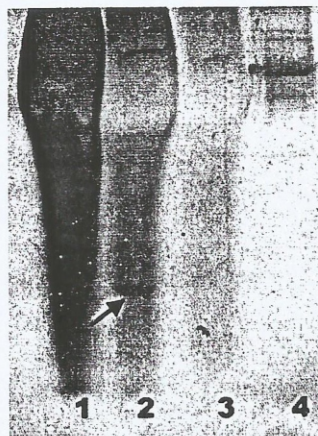
Penggabungan dan pemekatan fraksi yang membentuk puncak aktivitas menunjukkan gambaran protein yang dapat terdeteksi lebih baik. Hasil SDS PAGE (Gambar 2) menunjukkan bahwa puncak pertama masih

merupakan campuran banyak komponen sehingga saat dilakukan pengecatan terjadi *blocking* (gambaran tebal). Puncak kedua menunjukkan adanya satu pita yang tampak jelas dan telah merepresentasikan keberadaan satu macam protein yang memiliki aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase. Sedangkan puncak ketiga menunjukkan gambaran yang kurang jelas sehingga diduga kadar protein yang ada terlalu rendah. Untuk uji selanjutnya dipergunakan GFCA II yang tahap-tahap isolasinya disajikan pada Tabel 2 dibawah ini.

Tabel 1. Aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase pada protein hasil kromatografi gel filtrasi (setelah penggabungan dan pemekatan fraksi)

No.	Sampel	Kadar Protein ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Aktivitas Enzim (U)	Aktivitas spesifik (U/g)
1	GFCA I	0.0551	0,017	31,81
2	GFCA II	0.1818	0,030	16,71
3	GFCA III	0.1542	0,009	6,15

Keterangan : GFCA I = sampel hasil penggabungan fraksi nomor 16 – 18 ; GFCA II = sampel hasil penggabungan fraksi nomor 26 - 32; GFCA III = sampel hasil penggabungan fraksi nomor 38 – 40



Gambar 2. Hasil SDS PAGE menggunakan gel 12,5 % dengan pengecatan *Silver Stain* (*Silver Stain Plus* kit, Biorad) : 1. GFCA I (fraksi nomor 16 – 18); 2. GFCA II (fraksi nomor 26 – 32); 3. GFCA III (fraksi nomor 38 – 40). Tanda panah menunjukkan adanya 1 pita protein yang muncul dari hasil penggabungan dan pemekatan fraksi nomor 26 – 32.

Tabel 2. Tahap-tahap pemisahan  $\beta$ -1,3-glukanase akar semai tusam

Langkah Pemurnian	Protein total ( $\mu$ g)	Aktivitas $\beta$ -1,3 Glukanase (U)	Aktivitas spesifik (U/g)	Tingkat pemurnian	Recovery
Pengendapan ammonium sulfat dan dialisis	356.30	1,349	378.8122	1.00	100%
Sephacryl S-300 HR	145.44	0,030	16.7101	0.0441	2.25%

Pada Tabel 2 tampak bahwa sistem kromatografi yang dipergunakan mengurangi cukup banyak aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase yang dapat terdeteksi dan dapat dilihat pada persentase *recovery* yang kecil. Colligan dkk.(1996) menyatakan bahwa efektifitas penggunaan kromatografi gel filtrasi antara lain dipengaruhi oleh panjang kolom, jumlah sampel yang diaplikasikan, dan laju alir. Pemisahan menggunakan kromatografi gel filtrasi, dengan kolom yang cukup panjang dan dengan jumlah sampel yang sedikit diduga mengurangi tingkat *recovery* enzim.

#### **Karakterisasi $\beta$ -1,3-glukanase hasil isolasi.**

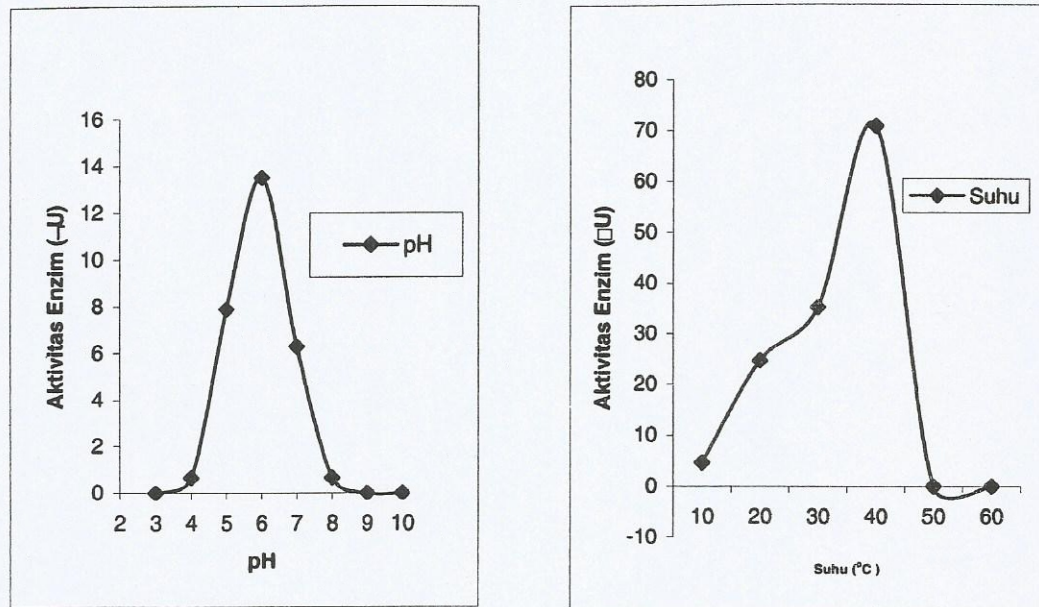
Berdasarkan persamaan garis linier mobilitas relatif protein marker dan protein sampel menunjukkan bahwa protein yang memiliki aktivitas  $\beta$ -1,3-glukanase tersebut (data tidak ditunjukkan) memiliki berat molekul protein sebesar 15 kD, sehingga untuk selanjutnya protein ini disebut GLUC15. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan adanya berbagai macam  $\beta$ -1,3-glukanase yang dapat diisolasi dari tumbuhan. Hwang *et al.*, (1997) mendapatkan  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 20 kD yang diisolasi dari tanaman *Capsicum annum* L. yang disemprot dengan DL- $\beta$ -amino-n-butyric acid (BABA). Salzer dkk. (1997) mendapatkan  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 35 kD dengan melakukan penelitian pada medium kultur sel *Picea abies*

[L.] Karst. untuk mempelajari pengaruhnya pada fungi pembentuk ektomikorisa.  $\beta$ -1,3-glukanase dengan berat molekul 15 kD belum pernah diteliti sehingga perlu penelitian lebih mendalam.

GLUC15 memiliki rentang suhu untuk aktivitas optimal yang sempit dan tidak tahan terhadap pemanasan. Enzim ini bekerja optimal pada suhu 30° - 40° C dan akan langsung terhambat aktivitasnya pada suhu diatas 50°. Hal ini berbeda dengan penelitian Peumans dkk. (2000) yang menyatakan kemungkinan bahwa  $\beta$ -1,3-glukanase tahan terhadap suhu inkubasi yang tinggi (sampai dengan 70° C tanpa kehilangan aktivitasnya). Beberapa penelitian lain menunjukkan bahwa enzim  $\beta$ -1,3-glukanase memiliki berbagai macam rentang suhu optimal untuk aktifitasnya tergantung pada sumbernya (Fontaine *et al.*, 1997; Gueguen *et al.*, 1997)

Aktivitas optimal GLUC15 berada pada kisaran pH 5 – 7. Aktifitas enzim  $\beta$ -1,3-glukanase memiliki rentang pH optimal yang cukup lebar disekitar pH 6, kecuali enzim yang diisolasi dari *Bacillus brevis* yang memiliki aktifitas optimal pada pH 9 (Gueguen *et al.*, 1997). Peumans *et al.*, (2000) menyatakan bahwa enzim  $\beta$ -1,3-glukanase pada tanaman kebanyakan bekerja pada pH cenderung asam

Hasil pengukuran aktifitas enzim yang dengan berbagai tingkat suhu dan pH dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengaruh pH dan suhu terhadap aktivitas enzim.

## KESIMPULAN

$\beta$ -1,3-glukanase berhasil diisolasi dari akar semai tusam yang berasosiasi dengan fungi ektomikorisa, memiliki berat molekul 15 kD, kurang tahan terhadap pemanasan dengan kisaran suhu optimal 30<sup>o</sup> - 40<sup>o</sup> C dan pH optimum 5 - 6 .

## UNGKAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi X tahun anggaran 2003 (No. Kontrak : 18/P2IPT/DPPM/PHBL/III/2003 tanggal 27 Maret 2003) yang telah memberikan dananya sehingga penelitian dapat berlangsung.

## DAFTAR PUSTAKA

Aono, R., M. Hammura, M. Yamamoto & T. Asano. 1995. Isolation of extracellular 28- and 42-Kilodalton  $\beta$ -1,3-glukanases and comparison

of three  $\beta$ -1,3-glukanases produced by *Bacillus circulans* IAM1165. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:122-129.

Colligan, J.E., B.M. Dunn, H.L. Ploegh, D.W. Speicher d & P.T. Wingfield. (Eds). 1996. *Current protocol in protein science*. John Willey & Sons, Inc., U.S.A.

Fontaine, T., R.P. Hartland, M. Diaquin, C. Simenel, & J.P. Latge. 1997. Differential patterns of activity displayed by two exo- $\beta$ -1,3-glukanases associated with the *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J. of Bact.* 179: 3154-3163.

Gueguen, Y., W.G.B. Voorhorst, J. van der Oost, & W.M. de Vos. 1997. Molecular and biochemical characterization of an endo- $\beta$ -1,3-glukanase of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. of Biological Chemistry* 272:31258-31264

Harjono, S.M. Widyastuti, & S. Margino. 2001. Pemurnian dan Karakterisasi Enzim

- Endokitinase dari Agen Pengendali Hayati *Trichoderma reesei*. *J. Perlind. Tan. Indonesia* 7(2):109-115.
- Hwang, B.K., J.Y. Sunwoo, Y. J. Kim, & B.S. Kim. 1997. Accumulation of  $\beta$ -1,3-glukanase and chitinase isoform, and salicylic acid in the DL- $\beta$ -amino-nbutyric acid-induced resistance response of pepper stems to *Phytophthora capsici*. *Phys. Mol. Plant Pathology* 51:305 – 322.
- Kauffman, S., M. Legrand, P. Geoffroy, & B. Fritig. 1987. Biological Function of pathogenesis-related protein : four PR-proteins of tobacco have  $\beta$ -1,3-glukanase activity. *EMBO J.* 6:3209-3212.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Peumans, W.J., A. Barre, V. Derycke, P. Rouge, W. Zhang, G.D. May, J.A. Delcour, F. van Leuven, & J.M. van Damme. 2000. Purification, characterization and structural analysis of an abundant  $\beta$ -1,3-glukanase from banana fruit. *Eur. J. Biochem.* 267:1188-1195.
- Price, N.C.L., & L. Stevens. 1984. *Fundamentals of Enzimology*. Oxford University Press. Great Britain.
- Salzer, P., B. Hubner, A. Sirrenberg d & A. Hager. 1997. Differential effect of purified spruce chitinase and  $\beta$ -1,3-glukanase on the activity of elicitor from ectomycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 114: 957 – 968.
- Tektonia, R. 2002. Pengaruh Inokulasi Mikoriza terhadap Perkembangan Penyakit Rebah Semai (*Fusarium* sp.) pada Semai *Pinus merkusii* Jungh. *et de Vries. Thesis*. Tidak dipublikasikan. Yogyakarta
- Vannini, A., C. Caruso, L. Leonardi, E. Rugini, E. Chiarot, C. Caporale, & V. Buonocore. 1999. Antifungal properties of chitinase from *Castanea sativa* against hypovirulent and virulent strains of chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Phys. Mol. Plant Pathology* 55:29-35.