

Teknik Isolasi Protoplasma Kapang *Trichoderma* ssp. Menggunakan Enzim Lisis

PRIYO WAHYUDI^{1*}, ZAINAL ABIDIN², RETNO LESTARI²

¹P3 Teknologi Bioindustri – BPPT
Gedung II BPPT Lantai 13, Jl. M.H. Thamrin 8 Jakarta Pusat
²FMIPA Departemen Biologi Universitas Indonesia - Depok

Diterima 12 Desember 2005, Disetujui 9 Februari 2006

Abstract: *Trichoderma* is well known industrial fungi producing many kinds of industrial enzymes and as biological control agent. The applications of modern biotechnology using *Trichoderma* or its derived metabolites. Considering to the variety of the species of *Trichoderma* and enzymes or metabolites produced by *Trichoderma* lead to create a fusan of *Trichoderma*. The first step toward protoplast fussion is protoplasm isolation. In this experiment has been conducted protoplasm isolation of *Trichoderma harzianum*, *T. viride*, *T. aureoviride* and *T. pseudokoningii* using lysing enzyme in room temperature for 1- 5 hours incubation. The aim of this experiment is to find the best condition and time of incubation in producing protoplast optimally. *Trichoderma mycelia* (1 mg) sink in osmotic stabilizer solution (pH 5.8), crushed and add 1 ml lysing enzyme 2%, then incubate in shaker incubator (room temperature) for 5 hours. Observation of the protoplast is conducted using haemacytometer for 1 until 5 hours incubation. After 5 hours incubation in room temperature showed the *T. harzianum* protoplast is the highest number of protoplast (40,150 protoplast/ml), followed by *T. pseudokoningii* (10,375 protoplas/ml), *T. viride* (15,075 protoplast/ml) and *T. aureoviride* (10,050 protoplas/ml).

Key words: *Trichoderma*, protoplasm isolation, lysing enzyme, protoplast

PENDAHULUAN

Trichoderma adalah salah satu genus kapang yang sangat umum ditemui di biosfer Indonesia. Perannya yang besar telah lama dikenal dalam dekomposisi bahan organik di hutan tropis. *Trichoderma* juga dapat digunakan dalam pengendalian hama jamur seperti *Fusarium* sp. Yang merusak tanaman budidaya. Selain dapat dimanfaatkan sebagai bahan biofungisida, *Trichoderma* juga dapat menghasilkan enzim komersial⁽¹⁾.

Trichoderma merupakan fungi multiseluler berbentuk filamen sehingga masuk kelompok kapang (*molds*). *Trichoderma* adalah genus dari Hypocreaceae yang mempunyai warna koloni hijau tua atau abu-abu. Secara lebih lengkap, klasifikasi *Trichoderma*⁽²⁾ adalah sebagai berikut:

Divisio : Mycophyta
Classis : Deuteromycetes
Sub classis : Ascomycetes
Ordo : Hypocreales

Familia : Hypocreaceae
Genus : *Trichoderma*

Trichoderma mempunyai koloni yang berwarna hijau muda sampai hijau tua. Konidia kapang tersebut bulat dan terusun seperti buah anggur. Tingkat pertumbuhannya cepat sehingga dalam empat atau lima hari koloninya sudah memenuhi cawan petri⁽³⁾.

Trichoderma termasuk kapang yang mudah ditemukan diberbagai substrat tanah. *Trichoderma* umum ditemukan sebagai komponen yang dominan pada mikroflora tanah terutama lapisan humus hutan maupun pertanian⁽²⁾. *Trichoderma* merupakan bio-kontrol jamur fitopatogen genus tersebut menghasilkan enzim-enzim yang mampu melisis dinding sel jamur, seperti kitinase dan b-glukanase. Kitin dan glukukan merupakan penyusun utama dinding sel jamur fitopatogen. Enzim kitinase dan glukukanase menghidrolisis kitin dan glukukan, sehingga hifanya mengalami lisis⁽⁴⁾.

Protoplasma merupakan bagian keseluruhan sel yang telah terpisah dari dinding sel, atau dihasilkan dari degradasi dinding sel. Keberadaan dinding sel telah menghambat terjadinya perubahan komposisi protoplas secara genetik dan sitokinesis. Isolasi pro-

* Penulis korespondensi, Hp. 0816119981,
e-mail: wahyudi@bppt.go.id

toplas sangat diperlukan untuk memperbaiki kualitas strain maupun perkawinan interspesies⁽⁵⁾.

Tahun 1968 Takebe *dkk.* melaporkan bahwa telah diisolasi protoplas mesofil tembakau secara enzimatis. Cocking pada tahun 1961 telah mengisolasi protoplas akar tomat menggunakan enzim selulase *Myrothecium verrucaria*. Sejumlah tanaman yang diklon dari protoplas telah teregenerasi menjadi tanaman lengkap. Jepang pada tahun 1968 memproduksi protoplas daun tembakau dalam jumlah besar menggunakan enzim selulase *Trichoderma viride* yang diproduksi untuk industri makanan bayi dan biskuit. Pektinase digunakan oleh peneliti di Nottingham tahun 1960 untuk mengisolasi protoplas dalam jumlah besar dari jaringan parenkim buah tomat yang belum matang pada medium plasmolisis⁽⁶⁾.

Protoplas dihasilkan dari pendegredasian dinding sel. Dinding sel mempunyai komposisi kimia yang berbeda pada tiap spesies. Rangka dinding sel terdiri dari senyawa-senyawa yang sebagian besar (80-90%) merupakan polisakarida dan selebihnya protein serta lipid. Secara spesifik rangka dinding sel terdiri dari glukukan, selulosa, kitin dan kompleks protein-polisakarida⁽⁷⁾.

Protoplas mempunyai sifat totipotensi yang dapat beregenerasi menjadi individu baru yang lengkap. Protoplas juga dapat memasukkan DNA, virus, organ- el, dan mikroorganisme kedalam selnya. Kemampuan tersebut menyebabkan protoplas dapat berfusi dengan sesamanya sehingga dapat dikembangkan individu transgenik⁽⁶⁾.

Protoplas mempunyai sifat dapat beregenerasi menjadi sel lengkap. Protoplas dari sel yang sama ataupun berbeda dapat berfusi satu dengan yang lainnya menghasilkan kombinasi kedua sel yang disebut fusan. Fusan dapat beregenerasi menjadi sel (individu) yang sempurna. Teknik fusi protoplas merupakan contoh metode hibridisasi somatik. Protoplas dapat menyerap makromolekul (asam nukleat dan protein), virus, komponen sel seperti kromosom dan kloroplas melalui fagositosis⁽⁶⁾. Kemampuan protoplas dalam berfusi digunakan untuk memperbaiki kualitas mahluk hidup dari tingkat fungi sampai tanaman tingkat tinggi⁽⁵⁾.

Pengisolasian protoplas dapat dilakukan dengan memperhatikan faktor-faktor sebagai berikut:

Enzim litik. Komponen dinding sel yang sangat kuat, sehingga diperlukan enzim pelisis yang baik. Kreger dan Koppeca pada tahun 1975 telah berhasil memperoleh isolat protoplas dari *Saccharomyces cerevisiae* selama tiga dan enam jam. Sagara pada tahun 1969 mengisolasi protoplas *Geotrichum candidum* selama tujuh sampai sepuluh jam. Waktu inkubasi yang berbeda tersebut disebabkan kualitas

enzim pelisis yang berbeda. Novozim 234 telah digunakan secara luas untuk memproduksi protoplas dari berbagai fungi seperti *Schizosaccharomyces pombe* dan *Trichoderma harzianum*. Zynolyase 500 juga digunakan dalam pengisolasian protoplas khamir. Selain menggunakan enzim komersial, isolasi protoplas dapat dilakukan dengan bantuan enzim alami bahkan dengan teknik nonenzimatis misalnya dengan melibatkan suhu⁽⁸⁾.

Stabilitas osmotik. Protoplas sangat peka terhadap tekanan osmotik lingkungan yang dapat menyebabkan lisis maupun krenasi. Hal tersebut dapat ditanggulangi dengan memberikan larutan penstabil osmotik. Larutan penstabil osmotik terdiri dari garam anorganik, gula dan gula alkohol. Protoplas *Trichoderma viride* stabil pada medium dengan kandungan $MgSO_4$, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ serta gula alkohol manitol^(9,8).

Organel. Sebagian besar isolasi protoplas kapang berasal dari hifa atau miselium. Protoplas *Trichoderma viride* dapat juga diisolasi dari spora uninukleat. Khamir adalah contoh organisme yang mudah diisolasi protoplasnya karena struktur selnya uniseluler⁽⁹⁾. Plowe pada tahun 1931 telah berhasil mengisolasi protoplas bawang dari sel epidermisnya dan kebanyakan sel tersebut bervakuola. Isolasi protoplas *M. verrucaria* dari bagian akar dilakukan oleh Cocking pada tahun 1960⁽⁶⁾.

Kondisi kultur. Kapang dan khamir mempunyai respon yang berbeda terhadap kondisi lingkungan. Percobaan dengan *Aspergillus nidulans* telah memperoleh protoplas dalam jumlah yang banyak dari miselium yang ditumbuhkan pada medium *glucose-salt* dari pada dengan ekstrak yeast⁽⁵⁾.

Umur kultur. Telah dibuktikan bahwa umur biakan terbaik yaitu fase eksponensial. Isolasi protoplas pada fase stationer menyebabkan produksi protoplas menjadi 70% lebih rendah dan membutuhkan waktu inkubasi yang lebih lama⁽⁵⁾.

Faktor perlakuan sebelum isolasi. Beberapa senyawa yang diberikan sebelum isolasi protoplas ternyata berpengaruh terhadap hasil isolasi. *Pretreatment* yang diberikan pada umumnya adalah dengan penambahan senyawa thiol atau detergen pada inkubasi antara 8 sampai 70 menit tergantung jenis dan strain. Selanjutnya sel dicuci dengan larutan dapar dan disuspensikan kembalikan pada medium dapar berisi enzim pelisis. Faktor lain yang berpengaruh adalah temperatur dan pH⁽⁹⁾.

Kemampuan *Trichoderma* sebagai mikoparasit dan penghasil enzim dapat ditingkatkan dengan melakukan fusi protoplas antar spesies. Saat ini *Trichoderma harzianum* telah diproduksi sebagai bahan biofungisida, tetapi kualitasnya masih perlu

ditingkatkan dengan fusi protoplas. Salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan fusi protoplas adalah tersedianya protoplas dalam jumlah yang optimum, sehingga harus dilakukan optimasi isolasi protoplas. Tujuan dari studi ini adalah untuk mengetahui kondisi optimum bagi proses isolasi protoplas pada empat jenis *T. harzianum*, *T. viride*, *T. aureoviride*, dan *T. pseudokoningii*.

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Biakan mikroorganisme. Kapang yang digunakan adalah biakan *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma aureoviride*, dan *Trichoderma pseudokoningii* koleksi BPPTCC.

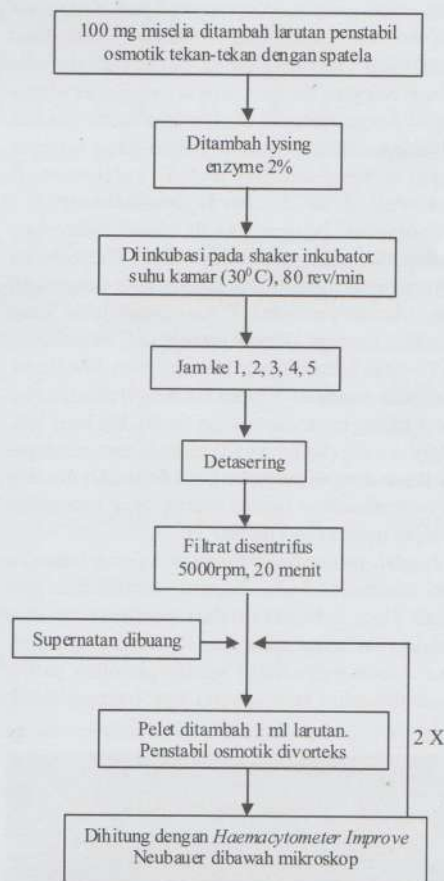
Bahan medium & kimia. *Potato dextrose agar* [Oxoid Ltd.], *Potato dextrose broth* [DIFCO] untuk pembuatan medium. Enzim pelisis dinding sel yang dipakai adalah *lysing enzyme* dari *Trichoderma harzianum* produksi SIGMA ALDRICH CHEMIE GmbH, Germany. Bahan untuk pembuatan larutan yaitu aquades, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ [Merck], bufer posfat pH 5,8, alkohol.

Alat. Cawan Petri (Anumbra), tabung reaksi (Iwaki Pyrex), tabung ukur (Iwaki Pyrex), labu Erlenmeyer (Schott Duram), *magnetic stirer* (Cole Palmer Instrument Co.), jarum ose dan spatula (Yamaco stainless), *shaker* (Taitech-Triple shaker NR-80), pipet mikro dan tip (Eppendorf), autoclave (Hiramaya MC, HL-36, dan Iwaki glass Co., ACV-2456), ruang laminar (Babcock-Bsh), timbangan analitik (Precisa XT 220A), *hot plate* (Heidolph MR-3002), inkubator (Mettler D-09101), sentrifus (Sigma 3), *vortex mixer* (Heidolph REAX top), mikroskop (Olympus A-011), *counter* (Togo Shiseiki), *Haemacytometer Improve* Neubauer (Marienfeld Ltd. NR-853), dan pH meter (Knick/WTW pH-Electrode Sentix 61).

METODE. Persiapan isolasi protoplas. Sebelum dilakukan isolasi protoplas, biakan *Trichoderma* ditumbuhkan terlebih dahulu sehingga biomassa sel diharapkan berada pada fase eksponensial. Peremajaan biakan dilakukan dengan menginokulasikan biakan *Trichoderma* kedalam medium agar tegak dan miring. Setelah berumur lima hari biakan diinokulasikan ke medium *potato dextrose broth* (PDB), dan disuspensikan. Sebanyak 4 ml suspensi kapang ditanam dalam 40 ml PDB dalam labu Erlenmeyer 125 ml. Inokulum diinkubasi pada suhu kamar selama lima hari dalam *shaker incubator* 120 rpm.

Isolasi protoplas. Sebanyak 100 mg miselia ditambah dengan larutan penstabil osmotik pH 5,8

dan ditekan-tekan menggunakan spatula sehingga hancur. Terhadap serpihan miselia ditambahkan 1 ml larutan *lysing enzyme* 2%. Campuran tersebut diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu ruang, 80 rev/min., selama 1, 2, 3, 4, dan 5 jam. Setelah diinkubasi sesuai perlakuan jam inkubasi, campuran disaring. Filtrat disentrifugasi 5000 rpm, selama 20 menit. Supernatan dibuang dan peletnya ditambah 1 ml larutan penstabil osmotik pH 5,8 dan disentrifugasi kembali 5000 rpm, 20 menit. Pelet dilarutkan kembali dalam 1 ml larutan penstabil osmotik pH 5,8 kemudian dihomogenkan dengan *vortex mixer*. Protoplas dihitung di bawah mikroskop perbesaran 20 x 20 dengan *Haemacytometer Improve* Neubauer⁽¹⁰⁾ (Gambar 1).



Gambar 1. Skema kerja isolasi protoplas.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan koloni *Trichoderma*. *Trichoderma harzianum* mempunyai koloni berwarna putih saat berumur 4 hari dan warnanya menjadi hijau keabu-abuan ketika berumur lebih dari lima hari. Koloninya rapat, tekstur halus (beludru) dengan warna dasar kekuningan (krem). *Trichoderma viride* mempunyai penampakan yang sama dengan *Trichoderma harzianum* tetapi teksturnya lebih halus. *Trichoderma aureoviride* mempunyai koloni yang lebih renggang dengan penampakan yang sama dengan *Trichoderma* lainnya. *Trichoderma pseudokoningii* mempunyai warna koloni yang putih saat berumur 4 hari dan warnanya menjadi hijau keabu-abuan gelap ketika berumur 5 hari. Koloninya rapat bertekstur sedikit kasar dengan warna dasar kekuningan (krem). Koloni yang tumbuh pada medium cair yang diinkubasi dalam *shaker incubator* dengan penggoyangan 80 rev/min menunjukkan perbedaan ukuran. Ukuran koloni yang terbesar sampai terkecil dimiliki oleh *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. viride*, dan *T. pseudokoningii*.

Protoplas. Pengamatan di bawah mikroskop menunjukkan protoplas keempat jenis *Trichoderma* berwarna hijau mengkilat dengan bentuk yang relatif bulat. Ukuran protoplas *T. harzianum* lebih kecil dibanding lainnya. Ukuran protoplas *T. aureoviride* dan *T. viride* hampir sama dan tidak bisa dibedakan, sedangkan protoplas *T. pseudokoningii* mempunyai ukuran paling besar diantara protoplas dari jenis lain. Protoplas yang dihitung pada haematisometer dapat dibedakan dengan pengotor hasil degradasi dinding selnya berdasarkan bentuk warna yang transparan dan hijau mengkilat (Gambar 2).

Jumlah protoplas meningkat seiring lamanya waktu inkubasi (1-5 jam). Sampai 3 jam inkubasi protoplas yang dihasilkan dari keempat spesies *Trichoderma* belum mencapai 10.000 protoplas/ml. *T. harzianum* mempunyai jumlah protoplas paling banyak dibanding lainnya yaitu 40.150 protoplas/ml.



Gambar 2. Protoplas *Trichoderma harzianum* (perbesaran 400 x).

Jumlah tersebut didapat pada inkubasi selama 5 jam. *Trichoderma viride* dan *T. aureoviride* berturut-turut mempunyai jumlah protoplas sebanyak 15.075 dan 10.050 protoplas/ml pada inkubasi 5 jam. Jumlah protoplas *T. pseudokoningii* menurun setelah 4 jam yaitu sebanyak 10.375 protoplas/ml. Setelah 5 jam inkubasi, jumlah protoplasnya menurun menjadi 9.750 protoplas/ml

Persiapan isolasi protoplas. Sebelum dilakukan isolasi protoplas, biakan diremajakan dahulu pada medium *potato dextrose broth*. Pekerjaan dilakukan dalam *shaker incubator* pada suhu ruang (30°C). Walaupun Gams & Bisset menyatakan bahwa *Trichoderma* spp. tumbuh baik pada suhu 30°C, tetapi belum dilakukan optimasi suhu inkubasi masing-masing spesies *Trichoderma*. Pertumbuhan yang lebih baik mungkin diperoleh jika diketahui waktu inkubasi terbaik, yang selanjutnya akan mempengaruhi jumlah protoplas yang diisolasi⁽¹¹⁾.

Kultur yang baik untuk mengisolasi protoplas adalah saat umur biakan pada fase eksponensial⁽⁵⁾. Fase eksponensial adalah fase yang ditandai dengan peningkatan masa secara eksponensial sehingga mencapai titik maksimal dan dilanjutkan dengan fase stationer. Belum dilakukan pengukuran kurva tumbuh untuk masing-masing spesies *Trichoderma* sehingga tidak diketahui fase eksponensialnya. Isolasi protoplas dilakukan pada biakan yang berumur dua minggu, karena *Trichoderma* mengalami pertumbuhan pesat setelah berumur 5 hari⁽³⁾, sehingga diperkirakan pada usia tersebut *Trichoderma* sudah tidak pada fase eksponensial. Fase eksponensial dilanjutkan dengan fase stationer yang ditandai dengan jumlah nutrisi untuk pertumbuhan telah berkurang. Jumlah nutrisi yang berkurang pada fase stationer dapat dilihat dari luas medium yang tersisa. Usia 5 hari *Trichoderma* sudah memenuhi cawan petri artinya jumlah nutrisi selanjutnya telah terbatas sehingga pada saat dua minggu kapang tersebut sudah berada pada fase stationer⁽¹²⁾. Apabila analisis tersebut benar maka isolasi protoplas pada akhir pertumbuhan dua minggu bukanlah prosedur yang baik. Isolasi protoplas pada akhir inkubasi 5 hari mungkin dapat mengoptimalkan hasil protoplas karena saat tersebut kapang *Trichoderma* berada pada fase eksponensial. Prosedur akan lebih baik jika sebelumnya dilakukan pengukuran kurva tumbuh masing-masing jenis *Trichoderma*.

Kapang *Trichoderma* termasuk genus yang mudah tumbuh pada berbagai substrat. Pertumbuhan dalam *Potato dextrose broth* memberikan hasil yang cukup baik tetapi tidak dapat dipastikan bahwa medium tersebut merupakan medium pertumbuhan terbaik sebelum dilakukan isolasi protoplas.

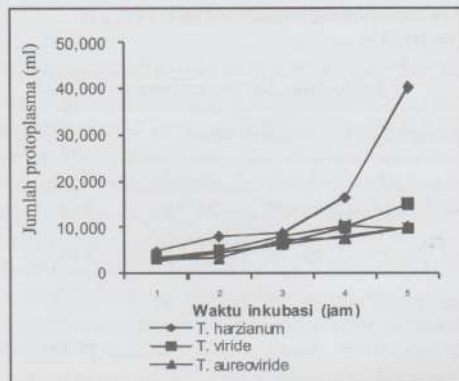
Tabel 2. Jumlah protoplas *Trichoderma* dengan waktu inkubasi yang berbeda (1-5 jam) 30°C menggunakan *lysing enzyme* 2%

No	Spesies	Jam	Jumlah Protoplas (haemasitometer)										/µl
			Kamar Atas					Kamar Bawah					
			1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
1	<i>T. harzianum</i>	1	29	8	9	19	18	15	37	21	21	16	4.825
		2	22	13	29	29	43	28	69	35	30	24	8.050
		3	22	42	32	36	37	31	37	38	32	40	8.675
		4	77	51	69	51	66	45	81	78	75	63	16.400
		5	172	194	162	167	143	101	209	189	174	95	40.150
2	<i>T. viride</i>	1	8	15	20	12	18	9	11	8	16	8	3.125
		2	20	11	13	22	16	21	23	20	26	10	4.550
		3	5	7	48	22	20	38	43	24	31	19	6.425
		4	25	33	29	39	47	46	35	39	45	64	10.050
		5	21	13	81	50	57	82	85	64	110	40	15.075
3	<i>T. aureoviride</i>	1	5	23	7	14	6	4	14	12	21	20	3.150
		2	10	13	15	16	14	12	17	8	14	16	3.375
		3	23	27	21	16	18	31	25	41	47	38	7.175
		4	20	26	35	31	31	33	30	37	29	30	7.550
		5	31	34	45	29	25	45	40	33	70	50	10.050
4	<i>T. pseudokoningii</i>	1	8	7	16	11	14	11	8	22	26	15	3.450
		2	22	16	20	9	17	17	12	25	30	32	5.000
		3	35	37	34	37	24	32	29	31	20	35	7.850
		4	76	52	30	41	28	24	41	32	60	31	10.375
		5	35	33	30	27	63	53	32	41	56	20	9.750

Isolasi protoplas. Sebanyak 100 gram miselia yang sudah dipisahkan ditumbuk dengan spatula agar jaringan terpisah membentuk serpihan sel sehingga kerja enzim pelisis dinding sel dapat lebih optimal. Sebanyak 1 ml *lysing enzyme* ditambahkan kemudian diinkubasi dalam *shaker incubator* selama 1-5 jam dengan kecepatan 80 rev/min. Waktu inkubasi yang berbeda ditujukan untuk mengetahui waktu terbaik yang menghasilkan protoplas dalam jumlah yang optimal, sedangkan digunakannya *shaker* bertujuan agar enzim pelisis dinding sel bekerja diseluruh sisi sel. Kecepatan *shaker* 80 rev/min, ditujukan agar protoplas yang dihasilkan tidak pecah karena kecepatan

shaker di atas 80 rev/min. dapat menyebabkan pecahnya protoplas dan di bawah kecepatan tersebut kerja enzim tidak optimal.

Setelah diinkubasi, larutan enzim dan protoplas tersebut disaring dengan penyaring sintetik. Filtrat kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 20 menit. Hal tersebut ditujukan untuk memisahkan protoplas dengan pelarutnya. Setelah didapat pelet dan supernatan, maka supernatan dibuang sedangkan pelet disuspensikan kembali dengan larutan penstabil osmotik pH 5,8. Larutan penstabil osmotik tersebut terdiri dari $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, dan dapar posfat yang berfungsi untuk melindungi



Gambar 3. Grafik produksi protoplas *Trichoderma* inkubasi 1-5 jam, suhu ruang (30°C), dengan *lysing enzyme*.

protoplas dari peristiwa lisis dan krenasi dengan cara menyeimbangkan tekanan osmotik antara lingkungan dengan cairan dalam protoplas. Pelet disuspensikan dalam penstabil osmotik serta disentrifugasi kembali agar protoplas dapat dimurnikan dari pengotor dan pelarut yang tertinggal (medium PDB).

Protoplas hasil isolasi dengan *lysing enzyme* 2% menunjukkan bahwa jumlah protoplas terus meningkat seiring penambahan waktu inkubasi selama 5 jam. *Trichoderma pseudokoningii* memberikan hasil yang sedikit berbeda dengan adanya penurunan setelah 5 jam inkubasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa inkubasi 4 jam sudah cukup memberikan hasil yang optimal untuk memproduksi protoplasnya. Ketiga spesies lainnya yaitu *T. harzianum*, *T. viride*, dan *T. aureoviride* menghasilkan protoplas yang meningkat seiring penambahan waktu sampai 5 jam. Jumlah protoplas setelah 5 jam inkubasi masing-masing spesies tersebut adalah 40.150, 15.075, dan 10.050 protoplas tiap mikroliter suspensi (Tabel 1). Perbandingan peningkatan jumlah protoplas tiap jam inkubasi keempat spesies *Trichoderma* ditunjukkan dalam bentuk grafik garis (Gambar 3).

Secara morfologi protoplas *T. harzianum* memiliki ukuran yang paling kecil diantara tiga spesies yang lain. Protoplas *T. viride* dan *T. aureoviride* mempunyai kesamaan bentuk dan ukuran serta jumlahnya tidak jauh berbeda. Protoplas terbesar dimiliki oleh *T. pseudokoningii* sehingga lebih jelas dilihat dan dihitung.

SIMPULAN

Isolasi protoplas menggunakan *lysing enzyme* dengan perbedaan waktu inkubasi 1-5 jam menunjukkan peningkatan produksi protoplas yang terus ber-

tambah sampai 5 jam inkubasi kecuali *Trichoderma koningii*. *Trichoderma harzianum* mempunyai waktu inkubasi terbaik selama 5 jam dengan produksi protoplas terbanyak diantara 4 spesies *Trichoderma* yaitu 40.150 protoplas/ml. *Trichoderma viride* dan *Trichoderma aureoviride* juga mempunyai waktu inkubasi terbaik selama 5 jam dengan jumlah protoplas 15.075 dan 10.050 protoplas/ml. *Trichoderma pseudokoningii* mempunyai waktu inkubasi terbaik selama 4 jam dengan jumlah protoplas 10.375 protoplas/ml.

DAFTAR PUSTAKA

- Rao NSS. Mikroorganisme tanah dan pertumbuhan tanaman. 2nd ed. Jakarta: UI Press; 1994. hal. 353.
- Zaldivar M. 2001. *Trichoderma aureoviride* 7-121 a mutant with enhanced production and/or biocontrol. 9hlm. diambil dari <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol14/issue3full/7/index.html>. diakses 23 Juli, 2003.
- Suwahyono U & P Wahyudi. *Trichoderma harzianum* dan aplikasinya: Penelitian dan pengembangan agen pengendali hayati. Jakarta: Direktorat Teknologi Bioindustri BPPT; 2001. hal.5.
- Tripanji, S. Produksi kitinase dan selulase dari *Trichoderma harzianum* menggunakan lendir biji kakao sebagai medium pertumbuhan. Yogyakarta: Prosiding seminar nasional kimia UGM; 1999. hal.150-154.
- Pederby JF & S Isaac. An Improved procedure for protoplast isolation from *Aspergillus nidulans*. Mikrobiol letter. 1976; 7-9.
- Cocking EC. 1999. Plant protoplast. 8 hlm. diambil dari <http://www.uio.no/conferences/imc7/NFotm2000.htm>. diakses 23 juli, 2003.
- Labeda DP. Isolation of biotechnological organism from nature. New York: Mc Graw-Hill Pub Co; 1990. hal.322.
- Ogawa KH, Toyama & N Toyama. Degradation of fungal cell walls and protoplast formation by a mycolytic enzyme produce by *Trichoderma viride*. Myuzaki daigulan nogakubi: 1979; hal.387-198.
- Bennitez T, TG Villa, & IG Acha. Protoplast from *Trichoderma viride*. Arch Microbiol. 1975. hal.199-203.
- Adil EIM. Penuntun praktikum fisiologi hewan. Depok: Biologi-FMIPA UI; 2002. hal.44.
- Gams W & J Bisset. Morphologi and identification of *Trichoderma*. Dalam: Kubicek CP & G.E Harman (ed). *Trichoderma, Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetic. London: Taylor & Francis ltd; 1998. hal.169-175.
- Muslimin LW. Mikrobiologi lingkungan. Jakarta: Unhas PPPSL Dirjen Dikti Departmen P & K; 1995. hal.173.