

Pertumbuhan *Trichoderma harzianum* pada Medium yang Mengandung Xilan

PRIYO WAHYUDI^{1*}, UNTUNG SUWAHYONO¹, SRI MULYATI²

¹Badan Pengkajian & Penerapan Teknologi
Gedung BPPT 2 Lt. 15, Jl. MH Thamrin 8, Jakarta 10340

²Universitas Negeri Jakarta, Rawamangun, Jakarta Timur

Diterima 19 Januari 2004, Disetujui 22 Maret 2004

Abstract: Xylan is one of the most important components of hemicelluloses, which could be enzymatically hydrolyzed by xylanolytic enzymes. One of the xylanase producing fungi is *Trichoderma harzianum*, which growth in a medium requires sufficient nutrient, such as Carbon, Nitrogen, microelements and vitamins. Xylan as a polysaccharide could be used as Carbon source in a growth medium of *T. harzianum*. The purpose of this experiment is to assess the growth ability of *T. harzianum* in a medium with xylan as a sole Carbon source. Three media are tested in this experiment, i.e. Medium I, Medium II, and Medium III. The result shows that the best growth of *T. harzianum* is obtained in Medium III, followed by Medium II and then Medium I. The best medium pH is neutral (± 7) to mild acidic (6.2).

Key words: xylan, carbon source, *Trichoderma harzianum*, xylanase, medium

PENDAHULUAN

Xilan adalah komponen penting hemiselulosa dan bersama selulosa merupakan polisakarida terbaharui yang berlimpah di alam. Xilan merupakan komponen utama dari hemiselulosa yang berikatan secara kovalen dan non kovalen dengan selulosa, lignin, pektin dan polisakarida lain untuk menyusun dinding sel tanaman⁽¹⁾. Xilan disusun oleh unit-unit kerangka utama ikatan β -1,4-D-xilopiranosida dengan rantai samping yang pendek dari arabinofuranosa, asam glukuronat, asam metil glukuronat dan asetil. Xilan dapat dihidrolisis dengan bantuan enzim⁽²⁾.

Endo- β -1,4-xilanase atau disebut xilanase adalah enzim penghidrolisis xilan yang utama. Enzim ini menghidrolisis bagian kerangka utama xilan yang tidak tersubstitusi yaitu pada ikatan β -1,4-D-xilopiranosil⁽³⁾. Xilanase memiliki nilai komersial yang tinggi dalam bidang industri. Xilanase dapat diaplikasikan dalam berbagai bidang industri seperti industri pemutihan kertas dan tekstil, industri pembuatan roti, industri pembuatan bir dan industri pembuatan jus buah. Industri pulp kertas dan industri tekstil merupakan industri yang paling banyak membutuhkan enzim xilanase. Enzim xilanase berperan dalam mengurangi jumlah klorin yang digunakan pada proses pemutihan^(4,5).

Penambahan enzim pada proses *bleaching* berperan dalam mendegradasi xilan yang merupakan jembatan pengikat lignin dan selulosa sehingga mengurangi pemakaian klorin dalam mengekstraksi lignin. Akibatnya, pencemaran lingkungan yang ditimbulkan sebagai efek samping penggunaan klorin, dapat dikurangi⁽¹⁾. Prinsip dasar penggunaan enzim dalam pemutihan yaitu hidrolisis hemiselulosa dalam pulp oleh enzim hemiselulase terutama xilanase, dapat meningkatkan kemampuan ekstraksi lignin dari pulp *kraft* dalam rangkaian pemutihan berikutnya sehingga xilan dapat dipindahkan dan bagian lignin akan dikeluarkan pada proses pemutihan tersebut⁽⁶⁾.

Sejumlah xilanase telah diisolasi dari bermacam-macam fungi dan bakteri terutama *Bacillus* sp.⁽⁷⁾. Spesies *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma lignorum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma longibrachium* dan *Trichoderma pseudokoningii* merupakan jenis kapang yang menghasilkan xilanase⁽³⁾.

Kapang dari genus *Trichoderma* dikenal mampu merombak bermacam-macam polisakarida (selulosa, hemiselulosa, dll.). Sumber karbon yang dapat digunakan *Trichoderma* antara lain D-glukosa, D-galaktosa, D-fruktosa, D-mannosa, selobiosa, trihalosa, D-xilosa, L-arabinosa, D-manitol, D-arabitol, gliserol, salisin eskulin, arbutin, gliserol -1-manoasetat, B-metil-D-glukosida dan N-asetil-B-D-glukosamin. Namun demikian sumber karbon terbaik adalah glukosa, manosa, galaktosa, xilosa,

* Penulis korespondensi, Hp.08161119981,
e-mail: wahyudi@bppt.go.id

trihalosa dan selobiosa⁽⁸⁾.

Trichoderma harzianum adalah kapang yang memiliki distribusi yang luas dan mempunyai tingkat pertumbuhan yang cukup cepat, konidia yang dihasilkan berlimpah, yang mampu bertahan pada kondisi yang kurang menguntungkan⁽⁹⁾. Galur *Trichoderma* bukan hanya penghasil terbaik dari enzim selulase, tetapi penghasil enzim hemiselulose yang efisien dan juga diketahui menghasilkan semua enzim xilanolitik⁽³⁾.

Pertumbuhan *T. harzianum* pada media pertumbuhan memerlukan syarat-syarat antara lain tersedianya sumber nutrisi yang mencukupi. Nutrisi tersebut dapat sebagai sumber karbon, nitrogen dan faktor pertumbuhan yaitu vitamin dan mineral-mineral. Xilan adalah polisakarida yang dapat dijadikan sebagai sumber karbon. Agar dapat dimanfaatkan oleh *T. harzianum* maka xilan harus dihidrolisis terlebih dahulu. Untuk menghidrolisis xilan diperlukan enzim xilanolitik diantaranya xilanase.

Pada penelitian ini hanya dibatasi untuk mengetahui apakah *T. harzianum* dapat tumbuh pada media yang mengandung xilan? Pertumbuhan *T. harzianum* pada media mengandung xilan, dapat menandakan bahwa kapang tersebut menghasilkan enzim xilanase. Enzim xilanase diproduksi oleh *T. harzianum* untuk merombak xilan menjadi senyawa-senyawa yang dibutuhkan untuk metabolisme.

Diharapkan dari penelitian ini dapat memberikan informasi tentang kemampuan pertumbuhan *T. harzianum* pada media yang mengandung xilan, dan sebagai dasar informasi untuk penelitian lebih lanjut mengenai enzim yang dihasilkan oleh *T. harzianum*

BAHAN DAN METODE

BAHAN. Isolat *T. harzianum* A, B dan C merupakan koleksi BPPT Culture Collection yang diisolasi dari tanah pertanian di Bogor dan Serpong, media *potato dextrose agar* (PDA), *yeast extract*, xilan, agar, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, glukosa, K_2HPO_4 , CaCl_2 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pepton, HCl 1M, NaOH 1M, alkohol dan aquades.

METODE. Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental yang bersifat eksploratif. Adapun media yang digunakan yaitu media modifikasi I, II, dan III dengan pH netral (7) dan pH berbeda. Isolat *T. harzianum* yang digunakan berasal dari BPPT CC yaitu A, B, dan C. Ulangan yang dilakukan sebanyak 2 kali untuk masing-masing media.

Peremajaan kultur. Isolat *T. harzianum* A diinokulasikan satu ose dan diletakkan di tengah-

tengah media pada cawan petri. Hal yang sama dilakukan untuk isolat *T. harzianum* B dan C, kemudian diinkubasi dalam inkubator. Dilakukan ulangan sebanyak dua kali.

Pembuatan media. Media yang digunakan pada penelitian ini adalah Media I, II dan III: Media I⁽¹⁰⁾ dengan komposisi: 0,1 g ekstrak khamir, 0,2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g xilan dan 4 g agar, dalam 200 ml akuades dengan pH 7 dan 8. Media II⁽¹¹⁾ dengan komposisi: 0,188 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4 g KH_2PO_4 , 0,5014 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,82 mg CaCl_2 , 0,02 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g xilan dan 4 g agar, dalam 200 ml akuades dengan pH 7 dan 4,5. Media III⁽¹²⁾ dengan komposisi: 0,2 g ekstrak khamir, 1 g xilan, 0,2 g pepton, 0,2 g glukosa, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 4 g agar, dalam 200 ml akuades dengan pH media 7 dan 6,2. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atmosfer selama 15 menit.

Penumbuhan *T. harzianum* pada media yang mengandung xilan. Media I, II dan III yang dibuat dalam media agar cawan dengan masing-masing pH berbeda berkisar antara 4,5 – 8 diinokulasi dengan satu ose konidia *T. harzianum*. Inkubasi dilakukan dalam inkubator pada suhu 30°C selama 3 x 24 jam. Setelah waktu inkubasi 3 hari dilakukan pengamatan dan pengambilan data pertumbuhan *T. harzianum* pada media yang mengandung xilan. Data yang diamati meliputi: warna, bentuk dan diameter koloni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Data yang diperoleh dari percobaan ini disajikan pada Tabel 1, 2, 3, dan 4. Pengamatan pertumbuhan *T. harzianum* pada medium yang mengandung xilan (Medium I, II, dan III) dilakukan setelah inkubasi pada suhu 30°C selama 3 hari.

Secara umum, pertumbuhan *T. harzianum* pada media I tidak sebaik pada media II dan III. Sumber nutrisi media I yaitu ekstrak khamir sebagai sumber N, xilan sebagai sumber C dan KH_2PO_4 sebagai sumber mineral berupa kalium dan fosfat. Sumber nutrisi yang hanya terdiri dari ekstrak khamir dan xilan sebagai sumber energi untuk metabolisme, serta KH_2PO_4 sebagai mineral dapat menjadi penyebab terjadinya pertumbuhan *T. harzianum* pada media ini tidak sebaik media lain. Pertumbuhan pada pH 7 terlihat lebih baik dibandingkan pH 8 (basa).

Trichoderma menunjukkan pertumbuhan yang lebih cocok pada kondisi asam⁽⁸⁾ dan kapang pada umumnya akan menunjukkan pertumbuhan terbaik pada kondisi asam atau pH rendah⁽¹³⁾. Faktor nutrisi dan pH yang basa memungkinkan pertumbuhan *T. harzianum* tidak sebaik pada media II dan III.

Tabel 1. Pertumbuhan isolat *T. harzianum* pada media mengandung xilan

| Isolat <i>T.</i> <i>harzianum</i> | Media Modifikasi | | | | | |
|---|------------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | I | | II | | III | |
| | pH 7 | pH 8 | pH 7 | pH 4,5 | pH 7 | pH 6,2 |
| A | ++ ++ | ++ +++ | +++ +++ | ++++ ++++ | ++++ +++ | ++++ ++++ |
| B | ++ +++ | +++ +++ | ++++ ++++ | ++++ ++++ | +++ ++++ | ++++ ++++ |
| C | ++ ++ | ++ +++ | ++++ ++++ | ++++ ++++ | ++++ ++++ | ++++ ++++ |

Keterangan:

- (++) pertumbuhan *T. harzianum* baik dengan diameter koloni dari 5-6 cm,
 (+++) pertumbuhan *T. harzianum* baik dengan diameter koloni dari 7-7,5 cm,
 (++++) pertumbuhan *T. harzianum* baik sekali dengan diameter koloni dari 8-9 cm.

Tabel 2. Diameter pertumbuhan *T. harzianum* dan ciri-ciri pertumbuhan pada media I setelah inkubasi 3x24 jam

| Media I | Diameter (cm) | Keterangan |
|-----------|---------------|---|
| A1 pH = 7 | 6 | |
| A2 pH = 7 | 6 | Pertumbuhan koloni sirkuler membentuk filamen-filamen bagian dalam berwarna hijau dan bagian terluar berwarna putih |
| A1 pH = 8 | 7,5 | |
| A2 pH = 8 | 7,5 | |
| B1 pH = 7 | 5 | |
| B2 pH = 7 | 7 | Pertumbuhan koloni sirkuler membentuk filamen-filamen bagian dalam berwarna hijau tua, bagian tengah hijau dan bagian terluar berwarna putih |
| B1 pH = 8 | 7,5 | |
| B2 pH = 8 | 7 | |
| C1 pH = 7 | 6 | |
| C2 pH = 7 | 6 | Pertumbuhan koloni sirkuler membentuk filamen-filamen koloni bagian dalam berwarna hijau tua, bagian tengah hijau dan bagian terluar berwarna putih |
| C1 pH = 8 | 7,5 | |
| C2 pH = 8 | 6 | |

Pertumbuhan *T. harzianum* pada media I disajikan pada Gambar 1.

Pertumbuhan *T. harzianum* pada media II lebih baik dibandingkan pada media I. Sumber nutrisi media II yaitu xilan sebagai sumber C, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber N dan sumber sulfur. Mineral-mineral yang terkandung antara lain: kalium, natrium, magnesium, kalsium, seng, fosfat dan sulfat dengan pH media yaitu 7 dan 4,4. Adanya sumber C, sumber N dan banyak mineral serta kondisi media yang asam dapat menyebabkan pertumbuhan *T. harzianum* lebih baik dibandingkan media I. Pertumbuhan pada media dengan pH 7 lebih baik dibandingkan pH 4,2. Berarti pH 4,2 terlalu asam untuk *T. harzianum*. Keadaan media pada media II yaitu lembek ini dimungkinkan karena pH asam dan banyaknya garam mineral yang menyebabkan agar tidak padat. Keadaan tersebut menyebabkan pertumbuhan koloni *T. harzianum* tidak sirkuler tetapi menyebar

membentuk titik-titik (Gambar 1).

Pertumbuhan *T. harzianum* pada media III paling baik, dimana terdapat pertumbuhan yang sirkuler membentuk filamen dan rapat. Komposisi media III yaitu terdapat sumber C berupa glukosa dan xilan, sebagai sumber N adalah pepton dan ekstrak khamir, dan K_2HPO_4 sumber mineral. *T. harzianum* dapat memanfaatkan sumber energi tersebut untuk pertumbuhan sehingga dapat mencapai pertumbuhan koloni yang paling baik dibandingkan pada media lain. Disamping itu, pH netral dan 6,2 (sedikit asam) juga membantu memaksimalkan pertumbuhan *T. harzianum* pH media 6,2 menunjukkan pertumbuhan lebih baik dibandingkan pH 7. Pertumbuhan *T. harzianum* pada media III dapat dilihat pada Gambar 2.

Sumber karbon utama dari media I, II, dan III, yaitu glukosa dan xilan. Glukosa dapat langsung digunakan oleh *T. harzianum* dapat proses

Tabel 3. Diameter pertumbuhan *T. harzianum* dan ciri-ciri pertumbuhan pada media II setelah inkubasi 3x24 jam

| Media II | Diameter (cm) | Keterangan |
|-------------|---------------|--|
| A1 pH = 7 | 6 | Pertumbuhan sirkuler bagian dalam hijau tua, bagian tengah hijau dan terluar putih |
| A2 pH = 7 | 6 | Pertumbuhan sirkuler, bagian tengah putih kehijauan seperti kapas dan bagian luar hijau tua |
| A1 pH = 4,5 | 8,5 | Pertumbuhan menyebar membentuk titik-titik di bagian tengah dan di bagian pinggir membentuk lingkaran berwarna hijau tua |
| A2 pH = 4,5 | 8,5 | Pertumbuhan sirkuler, berwarna kuning seperti buluh kapas |
| B1 pH = 7 | 8,5 | Pertumbuhan sirkuler, bagian tengah berwarna hijau muda dan bagian terluar putih bagian tengah berbuluh (transparan). |
| B2 pH = 7 | 8,3 | |
| B1 pH = 4,5 | 9 | Pertumbuhan menyebar membentuk titik-titik. Pada Bagian tengah jarang ada buluh-buluh. |
| B2 pH = 4,5 | 8 | |
| C1 pH = 7 | 8,8 | Pertumbuhan sirkuler, daerah tengah berwarna kuning kehijauan, terang dengan serabut-serabut hijau kekuningan daerah tepi padat berwarna hijau tua |
| C2 pH = 7 | 8,4 | |
| C1 pH = 4,5 | 8,3 | Pertumbuhan sirkuler menyebar rata berwarna hijau kekuningan hingga kuning |
| C2 pH = 4,5 | 8,3 | Pertumbuhan menyebar membentuk titik-titik di tengah dan jarang, bagian tepi berwarna hijau tua. |

Keterangan: Pada media pH = 4,5; media kurang padat (lembek).

Gambar 1. Pertumbuhan *T. harzianum* pada media I dan II.

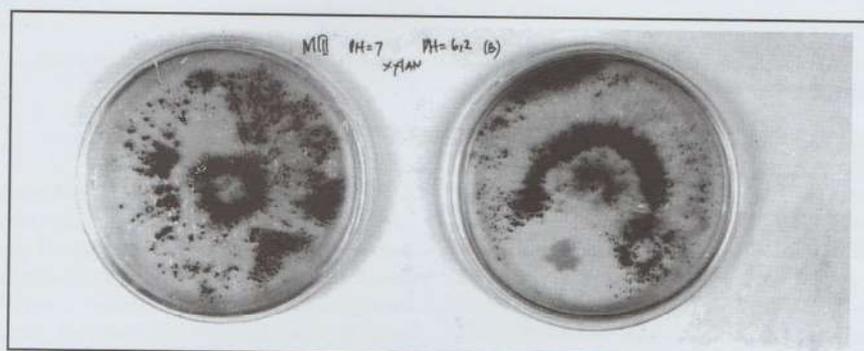
metabolisme untuk menghasilkan energi bagi pertumbuhannya. Sedangkan xilan harus dihidrolisis oleh enzim-enzim xilanolitik. Untuk memecah xilan secara sempurna diperlukan enzim-enzim sehingga dihasilkan monosakarida yaitu xilosa⁽²⁾. Xilosa dapat digunakan untuk proses metabolisme sebagai sumber C dan dapat dihasilkan energi^(1,4). Proses metabolisme untuk menghasilkan energi dapat berupa jalur

glikolisis.

Sumber nitrogen dari media I, II, dan III yaitu *yeast extract*, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan pepton. *Yeast extract* adalah ekstrak dari sel khamir mengandung sumber vitamin B, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ adalah amonium yang merupakan sumber nitrogen juga. Sumber N tersebut digunakan dalam metabolisme untuk menghasilkan energi dan untuk proses biosintesis asam amino yang

Tabel 4. Diameter pertumbuhan *T. harzianum* dan ciri-ciri pertumbuhan pada media III setelah inkubasi 3x24 jam

| Media III | Diameter (cm) | Keterangan |
|-----------|---------------|--|
| A1 pH = 7 | 8 | |
| A2 pH = 7 | 8 | Pertumbuhan sirkuler membentuk filamen-filamen Bagian tengah berwarna kuning kehijauan, bagian tepi berwarna hijau tua |
| A1 pH = 8 | 8 | |
| A2 pH = 8 | 8 | |
| B1 pH = 7 | 7,5 | |
| B2 pH = 7 | 8 | Pertumbuhan sirkuler membentuk filamen-filamen bagian tengah berwarna kuning kehijauan, bagian tepi berwarna hijau tua |
| B1 pH = 8 | 8,3 | |
| B2 pH = 8 | 7,5 | |
| C1 pH = 7 | 8 | |
| C2 pH = 7 | 8,1 | Pertumbuhan sirkuler ada bagian yang berwarna putih dan hijau tua |
| C1 pH = 8 | 8 | |
| C2 pH = 8 | 8,7 | |

Gambar 2. Pertumbuhan *T. harzianum* pada media III

dibutuhkan untuk pertumbuhan *T. harzianum*. Metabolisme nitrogen yang berupa asam amino dapat berupa reaksi transaminasi dan deaminasi. Transaminasi adalah reaksi pemindahan gugus NH_2 sedangkan deaminasi adalah pembebasan gugus amino menjadi amonia Kondisi pH terbaik untuk pertumbuhan *T. harzianum* adalah pH netral dan sedikit asam. Hal ini terlihat dari pertumbuhan *T. harzianum* yang menunjukkan pertumbuhan terbaik pada pH 6,2 dan 7 sesuai dengan hasil penelitian ini.

SIMPULAN

Trichoderma harzianum dapat tumbuh baik pada media yang mengandung xilan. Dengan pertumbuhan terbaik pada media III (Media modifikasi Yabuki). Kondisi pH yang sesuai untuk pertumbuhan *T. harzianum* adalah pH netral (7) dan sedikit asam (6,2).

DAFTAR PUSTAKA

1. Utari E. Produksi dan karakteristik enzim xilanase bakteri termofilik *Bacillus* sp. [tesis]. Bogor: IPB; 2001. hal. 35.
2. Degrafi GBC, Okeke CV, Bruschi & Venturi V. Purification and characterization of an acetyl xylan esterase from *Bacillus pumilus*. Appl & Enz Microbiol. 1998;64:789-792
3. Biely P & Tenkanen N. Enzymology of hemicellulose degradation. In: Harman GE & Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium: enzymes, biological control and commercial application*. Vol 2. London: Taylor & Francis Ltd; 1998. p. 25-47.
4. Marques SL, Alves S, Ribeiro G & Amaral-Collaco MT. Characterization of a thermostable and alkalotolerant xylanase from a *Bacillus* sp. Appl Biochem & Biotechnol. 1998;73:159-172.
5. Cortez EV, Pessoa A, Jr & Assis AN. Xylanase recovery by ethanol and Na_2SO_4 precipitation. Appl Biochem & Biotechnol. 1998;70-72:660-666.

6. Buchert JT, Oksanen J, Pere M., Siika – Aho A., Suurnakki & Viikari L. Application of *T. reesei* enzymes in the pulp and paper industri. In: Harman GE & Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium: enzymes, biological control and commercial application*. Vol 2. London: Taylor & Francis Ltd.; 1998. p. 343-363.
7. Breccia JD, Torto N, Gorton L, Sineriz F & Hatti-Kaul R. Specificity and mode of action of thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens* on – line monitoring of hydrolysis products. *Appl Biochem & Biotechnol*. 1998;69:31-39.
8. Klein D & Eveleigh DE. Ecology of *Trichoderma*. In: Harman GE & Kubicek CP, editors. *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy & genetics*. Vol 1. London: Taylor & Francis Ltd.; 1998. p. 57-69.
9. Suwahyono U & Wahyudi P. *Trichoderma harzianum* dan aplikasinya. Jakarta: Direktorat Teknologi Bioindustri BPPT; 2000.
10. Nakamura SK, Wakabayashi R, Nakai R, Aono & Horikoshi K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain 41 M-1. *Appl Environ Microbiol*. 1993;59(7):2311-2316.
11. Tripanji & Siswanto. Production of chitinase and cellulase from *Trichoderma harzianum* cocoa sweating as a culture medium. *Prosiding Seminar Kimia II*; 1999; Yogyakarta; UGM. 1999.
12. Yabuki M. Characterization of chitosanase produced by *Bacillus circulans* MH-KI. London: Elsevier applied science; 1989.
13. Fardiaz S. *Mikrobiologi pangan*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama; 1992.
14. Atlas RM. *Principles of microbiology*. Iowa: Brown Publishers; 1997.