

**Pengaruh Faktor Lingkungan terhadap Pertumbuhan *Trichoderma spp.* dan Aktivitas Enzim Amilase dan Xilanase****Tristiana Hidayatul Wahidah, Dewi Mustikaningtyas, Talitha Widiatningrum, Pramesti Dewi[✉]**

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang, Indonesia

Info Artikel

Diterima: 1 November 2022

Disetujui: 15 November 2022

Dipublikasikan: 30 November 2022

Keywords:*Trichoderma spp.; temperature; pH; amylase; xylanase**Trichoderma spp.; suhu; pH; amilase; xilanase***Abstract**

Trichoderma erinaceum and Trichoderma koningiopsis have the potential to produce lignocellulolytic enzymes, such as amylase and xylanase. Molds must grow in an ideal environment to support their metabolism, so research is needed to determine the temperature and pH of the mold growth environment and its correlation with the enzymes produced. The research was carried out in several stages, including 1) Testing the effect of temperature and pH on the growth of the mold isolates T. erinaceum and T. koningiopsis, 2) Testing the activity of amylase and xylanase enzymes on the best isolates resulting from variations in temperature and pH. The results showed that the best temperature for growth of T. erinaceum based on the calculation of diameter, density, and mycelium compactness was 25°C, while T. koningiopsis was 25-35°C. The best pH for growth of T. erinaceum based on the calculation of diameter, density, and mycelium compactness was 5-7, while T. koningiopsis was 7. At 25°C and pH 7, T. koningiopsis produced the highest amylase activity, while at 25°C and pH 5, T. erinaceum produced the highest xylanase activity. It is recommended to research the effect of parameters other than temperature and pH on the growth of Trichoderma spp.

Abstrak

*Trichoderma erinaceum dan Trichoderma koningiopsis berpotensi menghasilkan enzim lignoselulolitik, seperti amilase dan xilanase. Kapang harus tumbuh di lingkungan yang ideal untuk mendukung metabolismenya, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui suhu dan pH lingkungan pertumbuhan kapang dan korelasinya dengan enzim yang dihasilkan. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap, diantaranya: 1) Uji pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan isolat kapang *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis*, 2) Uji aktivitas enzim amilase dan xilanase pada isolat terbaik hasil variasi suhu dan pH. Hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu terbaik pertumbuhan *T. erinaceum* berdasarkan penghitungan diameter, kelebatan, dan kekompakan miselium adalah 25°C, sedangkan *T. koningiopsis* adalah 25-35°C. pH terbaik pertumbuhan *T. erinaceum* berdasarkan penghitungan diameter, kelebatan, dan kekompakan miselium adalah 5-7, sedangkan *T. koningiopsis* adalah 7. Pada suhu 25°C dan pH 7, *T. koningiopsis* menghasilkan aktivitas amilase tertinggi, sedangkan pada suhu 25°C dan pH 5, *T. erinaceum* menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi. Disarankan untuk dilakukan penelitian mengenai pengaruh parameter selain suhu dan pH terhadap pertumbuhan *Trichoderma spp.*.*

© 2022 Universitas Negeri Semarang

[✉] Alamat korespondensi:

Gedung D11 Lt.1 Jl Raya Sekaran Gunugpati, Semarang

E-mail: iwed_pramesti@mail.unnes.ac.id

p-ISSN 2252-6277

e-ISSN 2528-5009

PENDAHULUAN

Struktur enzim terdiri atas rangkaian asam amino yang konformasinya berikatan erat dengan suhu. Suhu di atas optimum dapat merusak struktur lipatan protein enzim, di bawah suhu optimum mengakibatkan kakunya struktur protein, sehingga aktivitasnya menurun (Agustina *et al.*, 2019). pH memengaruhi kinerja enzim pada proses mengkatalisis reaksi (Safaria *et al.*, 2013). Bentuk dan fungsi enzim dipengaruhi oleh pH disekitarnya yang dapat merubah efektifitas sisi aktif enzim dalam membentuk kompleks enzim-substrat (Agustina *et al.*, 2019).

Pertumbuhan isolat kapang berhubungan dengan pelepasan enzim. Suhu dan pH dapat memengaruhi produksi enzim. Untuk memeroleh aktivitas tertinggi maka diperlukan optimalisasi kondisi pH dan suhu inkubasi (Nathan *et al.*, 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan isolat kapang *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis* yang diisolasi dari sampel tanah dan serasah daun di lingkungan kampus Universitas Negeri Semarang. Isolat kapang yang memiliki pertumbuhan terbaik berdasarkan variasi suhu dan pH media selanjutnya dilakukan uji semikuantitatif aktivitas enzim lignoselulotik, meliputi amilase dan xilanase.

METODE

Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai April 2022 di Laboratorium Biologi FMIPA UNNES. Pada penelitian ini dilakukan uji pengaruh suhu dan pH terhadap pertumbuhan isolat *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak faktorial dengan dua faktor (suhu dan pH), masing-masing faktor diuji dalam 3 taraf, yaitu suhu 25°C, 35°C, 45°C dan pH 3, 5, 7. Uji semikuantitatif dilakukan pada isolat terpilih untuk mengetahui aktivitas enzim amilase dan xilanase.

Peremajaan Isolat Kapang

Isolat kapang yang digunakan adalah *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis* kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang. Kedua isolat tersebut disubkultur pada medium PDA dalam petri dish dengan bantuan jarum ose di dalam *Laminar Air Flow*. Isolat diinkubasi selama 5 hari di dalam inkubator (Purwanti, 2015).

Pengaruh Suhu dan pH Terbaik Pertumbuhan Kapang Lignoselulotik

Isolat kapang diinkubasi pada media PDA dengan perlakuan variasi pH 3, 5, 7 dan variasi suhu 25, 35, 45°C. Sampel dengan perlakuan suhu diinokulasikan pada media PDA dengan pH 5 dan sampel dengan perlakuan pH diinkubasi dalam inkubator jamur dengan suhu 25°C. Pada pH rendah ditambahkan larutan HCl 0,1 M dan pH tinggi ditambahkan larutan NaOH 0,1 M sedikit demi sedikit secara berkala menggunakan pipet tetes. Kadar pH diukur menggunakan pH *indicator strip* sebelum disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C (Abubakar *et al.*, 2014). Perlakuan dengan variasi suhu 25°C, sampel disimpan di inkubator jamur, sedangkan sampel dengan variasi suhu 35°C dan 45°C disimpan di oven. Sampel diinkubasi selama 5 hari (Gueye *et al.*, 2020). Isolat yang digunakan untuk uji enzim dipilih berdasarkan

parameter hasil uji analisis kuantitatif pada diameter miselium dan pengamatan visual pada kelebatan dan kekompakan miselium.

Uji Semikuantitatif Enzim Amilase

Uji kemampuan kapang dalam menghasilkan enzim amilase dinilai dengan menumbuhkan isolat *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis* pada medium Agar Pati (pati 20 gram, *beef extract* 3 gram, pepton 5 gram, agar 16 gram, dan aquades 1000 ml). Medium disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dipindahkan secara aseptik ke cawan petri. Satu plug kultur kapang berumur 5 hari diinokulasikan menggunakan pelubang gabus (*cork borer*) ukuran 6 mm dari masing-masing isolat. Kapang diinkubasi pada $26 \pm 2^\circ\text{C}$ dalam kegelapan selama 5 hari. Uji aktivitas enzim amilase dilakukan berdasarkan pewarnaan iodin dengan mengaliri isolat dengan 1% yodium dalam 2% kalium iodida. Zona bening yang terbentuk di sekitar koloni dianggap positif untuk aktivitas amilase (Cherkupally *et al.*, 2017).

Uji Semikuantitatif Enzim Xilanase

Isolat *Trichoderma* spp. ditumbuhkan pada media xilan yang dibuat dengan media dasar sebanyak 1 liter ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g, KH_2PO_4 1,5 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g, FeSO_4 0,2 g, MnSO_4 0,2 g, *yeast extract* 2 g) ditambahkan dedak gandum 40 g (40 mesh), 16 g agar batang, dan 100 mg chloramphenicol. Media diautoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C. Media uji semikuantitatif degradasi xilan dipindahkan ke dalam cawan petri secara aseptik dan dibiarkan hingga mengeras. Satu plug kapang yang akan di uji diinokulasikan pada media. Kapang diinkubasi pada suhu kamar di tempat gelap. Setelah koloni berukuran kira-kira 30 mm, dilakukan pewarnaan iodin dengan mengaliri isolat dengan pewarna iodin dan dibiarkan selama 5 menit kemudian dialiri dengan aquades. Aktivitas xilanase ditunjukkan dengan adanya zona terdegradasi yang berwarna kuning dengan latar belakang ungu kehitaman (Astutik *et al.*, 2011; Rahayu & Kuswyatasari, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan Isolat

Isolat *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis* koleksi Laboratorium Biologi FMIPA UNNES diremajakan terlebih dahulu sebelum diberikan perlakuan. Peremajaan dilakukan dengan memindahkan isolat dari media lama pada media baru. Fungsinya yakni untuk memeroleh isolat yang lebih muda. Hasil peremajaan dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Peremajaan Isolat *Trichoderma erinaceum* dan *Trichoderma koningiopsis*

Pertumbuhan *Trichoderma* spp. pada Variasi Suhu

Hasil pengukuran diameter pertumbuhan miselium *Trichoderma* spp. dilakukan setelah masa inkubasi selama 5 hari disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Miselium dan Perbandingan Pertumbuhan Miselium *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* dengan Metode *One Way Repeated Measures ANOVA* pada Variasi Suhu

Jenis Kapang	Suhu	Rerata Ø Pertumbuhan Miselium (mm)	Perbandingan dengan Suhu	Sig.
<i>Trichoderma erinaceum</i>	25°C ^a	59,38 ± 1,45	35°C ^a 45°C ^b	1,000 ,000
	35°C ^a	58,7 ± 8,74	25°C ^a 45°C ^b	1,000 ,003
	45°C ^b	0	25°C ^a 35°C ^a	,000 ,003
	25°C ^c	56,34 ± 9,51	35°C ^c 45°C ^d	1,000 ,004
	35°C ^c	57,44 ± 8,30	25°C ^c 45°C ^d	1,000 ,002
	45°C ^d	0	25°C ^c 35°C ^c	,004 ,002

Keterangan:

Huruf yang berbeda pada setiap angka menunjukkan bahwa diameter pertumbuhan miseliumnya terdapat beda nyata.

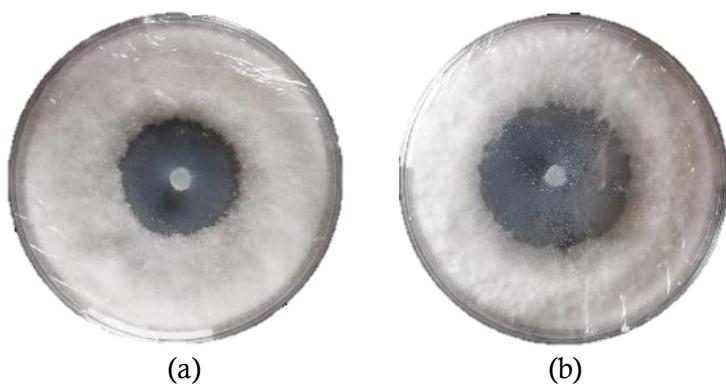
Data yang diperoleh dari penelitian menunjukkan bahwa pertumbuhan kedua isolat kapang berbeda-beda pada tiap perlakuan. Berdasarkan Tabel 1 hasil analisis data diameter miselium menggunakan uji statistik *One Way Repeated Measures ANOVA* menunjukkan bahwa perbandingan pertumbuhan miselium masing-masing isolat pada suhu 25°C dengan 35°C menunjukkan sifat homogen (tidak terdapat perbedaan nyata) karena nilai signifikansi yang diperoleh lebih besar dari taraf signifikan ($\alpha = 0,05$). Pertumbuhan miselium antara suhu 25°C dengan 45°C dan suhu 35°C dengan 45°C memiliki nilai $<0,05$ (terdapat perbedaan nyata). *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* tidak tumbuh pada suhu yang terlalu tinggi (45°C). Kedua spesies memiliki suhu optimal pertumbuhan yang berbeda. *T. erinaceum* tumbuh lebih baik pada suhu 25°C, sedangkan *T. koningiopsis* memiliki pertumbuhan terbaik pada suhu 35°C.

Penelitian ini mengonfirmasi hasil penelitian sebelumnya mengenai suhu pertumbuhan Genus *Trichoderma* yakni pada kisaran suhu 25-35°C (Mishra & Khan, 2015; Petrisor *et al.*, 2016; Sinha *et al.*, 2018; Zehra *et al.*, 2017). Diameter pertumbuhan miselium *T. erinaceum* menunjukkan hasil yang paling besar pada suhu 25°C, sedangkan *T. koningiopsis* memiliki diameter pertumbuhan miselium terbesar pada suhu 35°C (Tabel 1). Artinya, *T. koningiopsis* memiliki batas maksimal suhu pertumbuhan yang lebih tinggi daripada *T. erinaceum*. Toleransi terhadap suhu ini disebabkan oleh produksi gula yang lebih tinggi. *T. asperellum* mengalami peningkatan akumulasi *glucose*, *sucrose*, *melobiose*, *trehalose*, *mannose* dan *raffinose*. Beberapa jenis gula yang terakumulasi tersebut dapat digunakan sebagai agen penstabil struktur sel dan protein seluler di bawah kondisi stres panas (suhu tinggi) (Poosapati *et al.*, 2014).

Kedua solat tidak dapat tumbuh pada suhu 45°C, sejalan dengan penelitian Zehra *et al.* (2017) bahwa *T. viridae*, *T. harzianum*, *T. asperellum*, dan *T. hamatum* pertumbuhannya berhenti pada suhu 45°C. Isolat yang tidak dapat tumbuh (letal) pada suhu 45°C menunjukkan bahwa faktor suhu yang diberikan melebihi batas maksimal suhu pertumbuhannya. Semakin tinggi suhu lingkungan, semakin besar pula kemungkinan terjadi kerusakan sel. Viabilitas sel akan menurun ketika suhu meningkat melebihi tingkat optimal pertumbuhan.

Suhu optimal pertumbuhan kapang (termotoleransi) berkaitan dengan kemampuan sementara sel yang terkena suhu tinggi untuk bertahan hidup dari paparan mematikan berikutnya terhadap peningkatan suhu. Stres suhu tinggi (*heat shock*) pada sel kapang akan mengakibatkan kerusakan sel, sehingga mengganggu ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik yang menyebabkan denaturasi protein dan asam nukleat. Kondisi demikian sangat mungkin terjadi karena kapang tidak memiliki kemampuan untuk mengatur suhu internal mereka (Walker & White, 2018). Maka meskipun termotoleransi untuk pertumbuhan kapang cukup lebar, tetapi secara umum sebagian besar spesies tumbuh sangat baik sekitar suhu 25°C.

Parameter lain yang digunakan untuk menentukan pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* yakni kelebatan dan kekompakan miselium. Hasilnya kedua isolat memiliki miselium paling lebat dan kompak pada suhu 25°C (Gambar 2).



Gambar 2. Isolat dengan kelebatan dan kekompakan miselium pada inkubasi suhu 25°C
 (a) *T. erinaceum* (b) *T. koningiopsis*.

Faktor yang berpengaruh pada kekompakan dan kelebatan pertumbuhan miselium kapang tergantung pada parameter fisik optimal, seperti suhu dan pH sebagai substrat pertumbuhan kapang. Kelebatan miselium terbentuk akibat adanya aktivitas *Trichoderma* spp. yang baik pada variasi suhu yang digunakan (25°C), sehingga dapat melakukan metabolisme yang optimal dan menghasilkan miselium yang lebat dan kompak.

Diantara parameter fisik yang ada, suhu umumnya dianggap sebagai faktor penting yang dapat memengaruhi pertumbuhan miselium *Trichoderma* spp. Identifikasi potensi *Trichoderma* spp. yang toleran terhadap suhu ini merupakan upaya untuk mengetahui kemampuan bertahannya terhadap fluktuasi suhu. Sebab fluktuasi suhu mungkin dapat terjadi akibat pemanasan global yang akan memengaruhi suhu tanah sebagai salah satu habitat alami *Trichoderma* spp.

Pertumbuhan *Trichoderma* spp. pada Variasi pH

Hasil pengukuran diameter pertumbuhan miselium *Trichoderma* spp. dilakukan setelah masa inkubasi selama 5 hari disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Pengukuran Diameter Miselium dan Perbandingan Pertumbuhan Miselium *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* dengan Metode *One Way Repeated Measures ANOVA* pada Variasi pH

Jenis Kapang	pH	Rerata Ø Pertumbuhan Miselium (mm)	Perbandingan dengan pH	Sig.
<i>Trichoderma erinaceum</i>	3 ^b	0	5 ^a 7 ^a	,000 ,001
	5 ^a	61,67 ± 1,98	3 ^b 7 ^a	,000 ,378
	7 ^a	55,7 ± 6,57	3 ^b 5 ^a	,001 ,378
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	3 ^c	0	5d ^c 7 ^d	0,067 ,001
	5 ^c	49,45 ± 22,90	3 ^c 7 ^c	0,067 1,000
	7 ^d	56,31 ± 4,91	3 ^c 5 ^d	,001 1,000

Keterangan:

Huruf yang berbeda pada setiap angka menunjukkan bahwa diameter pertumbuhan miseliumnya terdapat beda nyata.

Kedua isolat tidak tumbuh pada pH 3. Pertumbuhan tertinggi *T. erinaceum* pada pH 5, sedangkan *T. koningiopsis* pada pH 7. Hasil analisis data diameter miselium menggunakan uji statistik *One Way Repeated Measures ANOVA* menunjukkan bahwa *T. erinaceum* pada perbandingan pH 5 dengan 7 memiliki nilai signifikansi >0,05, artinya pada kedua suhu tidak terdapat perbedaan nyata. Terdapat perbedaan nyata pada pertumbuhan miselium *T. erinaceum* antara pH 3 dengan 5 dan pH 3 dengan 7 dengan nilai signifikansi <0,05. Uji statistik pada diameter pertumbuhan miselium *T. koningiopsis* diperoleh nilai signifikansi >0,05 pada variasi pH yang dibandingkan dengan pH 5, artinya antara pH 3 dengan 5 dan pH 5 dengan 7 tidak terdapat perbedaan nyata. Terdapat perbedaan nyata pada pertumbuhan miselium *T. koningiopsis* antara pH 3 dengan 7 dengan nilai signifikansi <0,05.

Kapang asidofilik tumbuh pada pH 4-6, tetapi banyak spesies dapat tumbuh dalam kondisi yang lebih asam atau basa (Walker & White, 2018). Beberapa spesies dari Genus Trichoderma lebih tumbuh dengan baik kondisi asam-netral pada kisaran pH 4-7 (Arfarita *et al.*, 2013; Kosanović *et al.*, 2015; Mishra & Khan, 2015; Sinha *et al.*, 2018). *T. viridae* tidak tumbuh pada pH yang terlalu rendah (2, 3, dan 4). Perubahan pH media dapat mengubah komposisi media, karena berhubungan dengan keadaan konstituen ionisasinya. Kandungan ion yang berubah akibat perubahan pH dapat memengaruhi efek fisiologis (Mishra & Khan, 2015).

Beberapa fungi berfilamen seperti Trichoderma akan berusaha mengubah pH eksternal lokalnya untuk menyesuaikan diri. Sel kapang melakukan penyerapan selektif dan pertukaran ion (NO_3^- atau NH_4^+/H^+) untuk mencapai keseimbangan atau dengan ekskresi asam organik seperti asam oksalat. Media

pertumbuhan yang diasamkan dengan asam organik lebih menghambat pertumbuhan dibandingkan dengan asam mineral karena asam organik dapat menurunkan pH intraseluler (Walker & White, 2018).

Jourdier *et al.* (2013) membandingkan teori paparan asam lemah dengan asam kuat menggunakan dua mekanisme yang mungkin menjadi penghambat pertumbuhan kapang. Menurut teori *uncoupling*, paparan asam menyebabkan sel menghabiskan energi mereka (ATP) ketika berusaha untuk mempertahankan pH homeostasis melalui aktivitas ATPase oleh pemompa proton di membran plasma. ATP yang dihabiskan tersebut merupakan sumber energi yang biasanya digunakan untuk biosintesis. Menurut teori akumulasi anion, terjadi difusi asam yang tidak terdisosiasi sampai keseimbangan tercapai. Kondisi keseimbangan bergantung pada perbedaan antara pH ekstraseluler dan intraseluler. Difusi asam menyebabkan konsentrasi asam di sitoplasma sangat tinggi, sehingga dapat secara langsung menghambat kerja enzim.

Berdasarkan kedua teori tersebut, diketahui bahwa asam lemah memiliki pengaruh secara langsung untuk pertumbuhan kapang, bahkan secara internal. Meski demikian, HCl yang tergolong asam kuat telah digunakan sebagai senyawa tambahan untuk menurunkan pH media pada beberapa penelitian terdahulu yang berhubungan dengan pertumbuhan kapang seperti penelitian yang dilakukan oleh Anuradha *et al.* (2014), Arfarita *et al.* (2013) dan Kosanović *et al.* (2015). HCl hanya akan menurunkan nilai pH media sebagai lingkungan tumbuh kapang tanpa secara langsung memberikan dampak terhadap metabolisme internal kapang. Kondisi tersebut membuktikan bahwa pH media memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan kapang meski hanya memberikan perlakuan pada lingkungannya.

Penambahan NaOH pada media PDA hingga nilai pH media PDA menjadi 7 (normal) tidak memberikan pengaruh buruk pada *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis*. Sebab pH 7 tergolong rentang pH yang mendukung pertumbuhan keduanya. Pemberian NaOH yang melebihi nilai rentang pH pertumbuhan *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* dan membuat pH media menjadi sangat basa, maka pertumbuhan keduanya tentu akan mengalami penurunan hingga terjadi kematian. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Mishra & Khan (2015) pada *T. viridae* yang mengalami penghambatan pada pertumbuhan dan perkembangan miseliumnya pada pH 9 dan 10, serta tidak dapat tumbuh (letal) pada pH 11 dan 12.

Parameter lain yang digunakan untuk menutup pengaruh suhu dan pH pada pertumbuhan *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* yakni kelebatan dan kekompakan miselium. Hasilnya kedua isolat memiliki miselium paling lebat dan kompak pada pH 7 (Gambar 3).



Gambar 3. Isolat dengan kelebatan dan kekompakan miselium pada pH 7

(a) *T. erinaceum* (b) *T. koningiopsis*.

Berdasarkan beberapa teori dan hasil penelitian yang telah dilakukan diketahui bahwa pH memengaruhi pertumbuhan Trichoderma, seperti pada fenomena cekaman garam maupun stres alkali. Kondisi tersebut dapat menyebabkan ketidakseimbangan ion dan memicu keracunan ion yang menyebabkan gangguan pada metabolismenya. Kelebatan miselium terbentuk akibat adanya aktivitas *Trichoderma* spp. yang baik pada variasi pH yang digunakan seiring dengan aktivitas metabolisme yang optimal, sehingga mampu menghasilkan miselium yang kompak.

Aktivitas Enzim Amilase

Isolat yang memiliki pertumbuhan terbaik dari hasil variasi suhu dan pH selanjutnya dilakukan uji secara semikuantitatif untuk mengetahui kemampunnya dalam menghasilkan enzim lignoselulolitik, meliputi enzim amilase dan xilanase. Diameter zona bening oleh masing-masing isolat disajikan dalam Tabel 3.

Tabel 3. Diameter Zona Bening yang Dihasilkan dari Uji Enzim Amilase

Isolat	Diameter Zona Bening (mm)							
	Isolat Variasi Suhu Terbaik				Isolat Variasi pH Terbaik			
	U1	U2	U3	Rerata	U1	U2	U3	Rerata
<i>Trichoderma erinaceum</i>	21,19	19,05	18,73	19,66	34,99	26,99	28,82	31,27
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	40,64	40,03	29,33	36,7	21,15	43,86	39,11	34,7

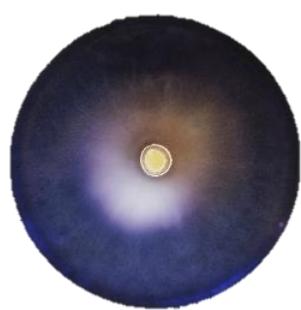
Media pertumbuhan uji amilase mengandung *starch* 1%. *Starch* merupakan karbohidrat yang terdiri dari banyak unit glukosa yang digabungkan oleh ikatan glikosidik. *Starch* dihidrolisis oleh amilase menjadi glukosa dengan memutuskan ikatan glikosida pada amilum. Glukosa yang dihasilkan diangkut ke dalam sel untuk metabolisme *Trichoderma* spp. (Li *et al.*, 2019). Kemampuan amilolitik kapang yang memanfaatkan pati untuk metabolismenya diketahui dengan pewarnaan menggunakan iodin. Terbentuknya zona bening pada media menunjukkan bahwa pati dihidrolisis oleh amilase dan media berwarna biru kehitaman menandakan pati belum terhidrolisis (Gambar 4 dan 5) (Marzuki *et al.*, 2014).



(a)



(b)



(a)



(b)

Gambar 4. Produksi enzim amilase oleh *T. erinaceum* (a) isolat dari perlakuan pH terbaik (7) (b) isolat dari perlakuan suhu terbaik (25°C)

Gambar 5. Produksi enzim amilase *T. koningiopsis* (a) isolat dari perlakuan pH terbaik (7) (b) isolat dari perlakuan suhu terbaik (25°C)

Isolat *T. erinaceum* dari hasil perlakuan pH terbaik (pH 7, suhu 25°C) menunjukkan diameter zona bening yang lebih luas daripada isolat dari perlakuan suhu terbaik (suhu 25°C, pH 5) (Gambar 5). *T.*

koningiopsis menunjukkan diameter zona bening yang lebih luas pada isolat dari hasil perlakuan suhu terbaik (suhu 25°C, pH 5) daripada isolat dari perlakuan pH terbaik (pH 7, suhu 25°C) (Gambar 6). *T. viride* menunjukkan aktivitas amilase tertinggi pada pH 5,78 (Juwon & Emmanuel, 2012). *T. reesei* memiliki pH optimum 5 (Reddy *et al.*, 2015).

Fungi umumnya mengubah pH media dengan penyerapan anion atau kation. Di luar pH optimalnya, penurunan aktivitas enzim dikaitkan dengan perubahan gugus ion dalam kesesuaian sisi aktif enzim. pH ekstrim mengakibatkan berbagai reaksi kimia, sehingga dapat mengubah atau bahkan menghancurkan residu amino dari molekul protein yang mengakibatkan inaktivasi ireversibel. pH akan memengaruhi karakter ionik dari gugus asam dan basa yang berperan penting untuk katalitik aktivitas enzim (Juwon & Emmanuel, 2012). Menurunnya kesesuaian sisi aktif enzim dan katalitik aktivitas enzim akan berpengaruh pada stabilitas enzim hingga menyebabkan denaturasi dan inaktivasi enzim.

Aktivitas Enzim Xilanase

Media yang digunakan pada uji semikuantitatif enzim xilanase dilakukan pada isolat *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* adalah media xilan yang mengandung larutan garam mineral dan *yeast extract* sebagai sumber nitrogen organik. Hasilnya pada masing-masing isolat menunjukkan adanya degradasi xilan oleh kapang pada media, sehingga di sekitar koloni timbul zona terdegradasi yang berwarna kuning-buram kontras dengan latar belakang warna ungu kehitaman (Gambar 6 dan 7). Zona terdegradasi tersebut merupakan indikator bahwa kedua isolat memiliki aktivitas enzim xilanase. Diameter zona terdegradasi yang dihasilkan pada masing-masing isolat disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 4. Diameter Zona Terdegradasi yang Dihasilkan dari Uji Enzim Xilanase

Isolat	Diameter Zona Terdegradasi (mm)								
	Isolat Variasi Suhu Terbaik				Isolat Hasil Variasi pH Terbaik				Rerata
	U1	U2	U3	Rerata	U1	U2	U3	Rerata	
<i>Trichoderma erinaceum</i>	65,7	65,76	62,63	64,7	43,23	52,04	49,76	48,34	
<i>Trichoderma koningiopsis</i>	53,09	34,71	53,75	47,18	48,41	46,29	30,15	41,62	

Bahan utama yang digunakan untuk uji xilanase adalah dedak gandum (*wheat bran*), sebab menurut Guimaraes *et al.* (2013) dedak gandum merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi xilanase. Dedak gandum dianggap sebagai penginduksi yang efektif dalam produksi xilanase oleh kapang, karena mengandung 40% xilan. Dedak gandum yang terhidrolisis akan menghasilkan sejumlah besar gula terlarut (glukosa, xilosa, arabinosa, dan galaktosa) yang dimanfaatkan oleh kapang sebagai sumber karbon untuk pertumbuhannya (Anand *et al.*, 2021).

Pada penelitian ini, luas diameter zona terdegradasi sebagai hasil adanya aktivitas enzim xilanase oleh *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* menunjukkan bahwa isolat *T. erinaceum* dan *T. koningiopsis* dari perlakuan variasi suhu terbaik (suhu 25°C, pH 5) memiliki zona terdegradasi yang lebih luas daripada isolat dari perlakuan variasi pH terbaik (pH 7, suhu 25°C) (Gambar 6 dan 7). Kedua isolat menghasilkan xilanase tertinggi pada pH 5. Kemampuan kedua isolat menghasilkan xilanase lebih tinggi pada pH yang sedikit asam, yaitu 5 telah mengonfirmasi beberapa penelitian sebelumnya. Beberapa spesies dari Genus

Trichoderma memiliki aktivitas xilanase tertinggi pada kisaran pH 4,7-5,5 (Abd El Aty *et al.*, 2018; Carvalho *et al.*, 2017; Fortkamp, & Knob, 2014).

pH media berpengaruh terhadap produksi enzim oleh *Trichoderma* spp., sehingga diperlukan pH yang optimum untuk stabilitas sisi aktif enzim. Sisi aktif enzim tersusun dari sejumlah residu asam amino yang terlibat dalam pengenalan substrat. Residu-residu pada sisi aktif enzim akan bertindak sebagai donor atau aseptor proton atau gugus lain terhadap substrat agar terjadi reaksi (Nauli, 2014). Meskipun tidak semua enzim merupakan protein, namun sebagian besar enzim adalah protein yang tersusun atas asam-asam amino. Struktur enzim dipengaruhi oleh faktor lingkungan dan molekul protein penyusunnya. Selanjutnya struktur enzim yang beraneka pilinan, lipatan atau konformasi tersebut memberikan keunikan dan menimbulkan sisi aktif yang khas pada setiap enzim (Susanti & Febriana, 2017).

Sisi aktif xilanase pada *Trichoderma reseei* berupa Glu 75 dan Glu 164. Keduanya bertindak sebagai katalitik residu untuk enzim, sehingga hidrolisis substrat oleh xilanase disebut mekanisme perpindahan ganda (*double-displacement*). Glu 75 sebagai nukleofil yang menstabilkan zat antar reaksi dan Glu 164 bekerja sebagai asam yang menstabilkan proses *transition state*. Pada proses tersebut terjadi reaksi katalisis dengan cara mendonorkan proton ke *xylose* atau *xylo-oligosaccharide* (Dey & Roy, 2018; Susanti & Febriana, 2017). Pada kondisi pH di bawah atau di atas pH optimum, konsentrasi H⁺ dan OH⁻ dapat memengaruhi gugus karboksil (-COO-) yang terdapat pada Glu 75 dan Glu 164. Kondisi tersebut berakibat pada sisi aktif xilanase yang tidak dapat tepat berikatan dengan substrat, sehingga kompleks enzim-substrat yang terbentuk tidak optimal.



(a)



(b)

Gambar 6. Produksi enzim xilanase oleh *T. erinaceum* (a) isolat dari perlakuan pH terbaik (7) (b) isolat dari perlakuan suhu terbaik (25°C)



(a)



(b)

Gambar 7. Produksi enzim xilanase oleh *T. koningiopsis* (a) isolat dari perlakuan pH terbaik (7) (b) isolat dari perlakuan suhu terbaik (25°C)

SIMPULAN

Suhu terbaik pertumbuhan *T. erinaceum* berdasarkan penghitungan diameter, kelebatan, dan kekompakan miselium adalah 25°C, sedangkan *T. koningiopsis* adalah 25-35°C. pH terbaik pertumbuhan *T. erinaceum* berdasarkan penghitungan diameter, kelebatan, dan kekompakan miselium adalah 5-7, sedangkan *T. koningiopsis* adalah 7. Pada suhu 25°C dan pH 7, *T. koningiopsis* menghasilkan aktivitas amilase tertinggi, sedangkan pada suhu 25°C dan pH 5, *T. erinaceum* menghasilkan aktivitas xilanase tertinggi.

DAFTAR PUSTAKA

- Abd El Aty, A. A., Saleh, S. A. A., Eid, B. M., Ibrahim, N. A., & Mostafa, F. A. (2018). Thermodynamics Characterization and Potential Textile Applications of *Trichoderma longibrachiatum* KT693225 Xylanase. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.011>
- Abubakar, A., Suberu, H., Bello, I., Abdulkadir, R., Daudu, O., & Lateef, A. (2014). Effect of pH on Mycelial Growth and Sporulation of *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Plant Sciences*, 1(4), 64–67. <https://doi.org/10.11648/j.jps.20130104.13>
- Agustina, D. kemeluh, Silitiana, D., & Anggraini, D. pusrita. (2019). *Bioteknologi Mikroba Tinjauan Umum dan Aplikasi*. CV. AA. Rizky.
- Anand, G., Leibman-Markus, M., Elkabetz, D., & Bar, M. (2021). Method for The Production and Purification of Plant Immuno-Active Xylanase from Trichoderma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8). <https://doi.org/10.3390/ijms22084214>
- Anuradha, S., Shahid, M., Srivastava, M., Pandey, S., Sharma, A., & Kumar, V. (2014). Optimal Physical Parameters for Growth of Trichoderma Species at Varying pH, Temperature and Agitation. *Virology & Mycology*, 03(1), 1–7. <https://doi.org/10.4172/2161-0517.1000127>
- Arfarita, N., Imai, T., Kanno, A., Yarimizu, T., Xiaofeng, S., Jie, W., Higuchi, T., & Akada, R. (2013). The Potential use of *Trichoderma viride* Strain FRP3 in Biodegradation of the Herbicide Glyphosate. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 27(1), 3518–3521. <https://doi.org/10.5504/bbeq.2012.0118>
- Astutik, R. P., Kuswytasari, N. D., & Shovitri, M. (2011). *Uji Aktivitas Enzim Selulase dan Xilanase Isolat Kapang Tanah Wonorejo Surabaya*. Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.
- Carvalho, E. A., dos Santos Góes, L. M., Uetanabaro, A. P. T., da Silva, E. G. P., Rodrigues, L. B., Pirovani, C. P., & da Costa, A. M. (2017). Thermoresistant Xylanases from *Trichoderma stromaticum*: Application in Bread Making and Manufacturing Xylo-Oligosaccharides. *Food Chemistry*, 221, 1499–1506. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.10.144>
- Cherkupally, R., Amballa, H., & Bhoomi, N. R. (2017). In Vitro Screening for Enzymatic Activity of Trichoderma Species for Biocontrol Potential. *Annals of Plant Sciences*, 6(11), 1784–1789. <https://doi.org/10.21746/aps.2017.6.11.11>
- Dey, P., & Roy, A. (2018). Molecular Structure and Catalytic Mechanism of Fungal Family G Acidophilic Xylanases. *3 Biotech*, 8(2), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1091-8>
- Fortkamp, D., & Knob, A. (2014). High Xylanase Production by *Trichoderma viride* Using Pineapple Peel As Substrate and its Application in Pulp Biobleaching. *African Journal of Biotechnology*, 13(22), 2248–2259. <https://doi.org/10.5897/ajb2013.13479>
- Gueye, N., Kumar, G. K., Ndiaye, M., Sall, S. Y. D., Ndiaye, M. A. F., Diop, T. A., & Ram, M. R. (2020). Factors Affecting The Chitinase Activity of *Trichoderma asperellum* Isolated from Agriculture Field Soils. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 8(2), 41–44. <https://doi.org/10.7324/JABB.2020.80207>
- Guimaraes, N. C. de A., Sorgatto, M., Peixoto-Nogueira, S. de C., Betini, J. H. A., Zanoelo, F. F., Marques, M. R., Polizeli, M. de L. T. de M., & Giannesi, G. C. (2013). Bioprocess and biotechnology: Effect of xylanase from *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* on pulp biobleaching and enzyme production using agroindustrial residues as substract. *SpringerPlus*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-380>
- Jourdier, E., Poughon, L., Larroche, C., & Ben Chaabane, F. (2013). Comprehensive Study and Modeling of Acetic Acid Effect on *Trichoderma reesei* Growth. *Industrial Biotechnology*, 9(3), 132–138. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0002>
- Juwon, A. D., & Emmanuel, O. F. (2012). Experimental Investigations on the Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Concomitant Amylase and Polygalacturonase Production by *Trichoderma viride* BITRS-1001 in Submerged Fermentation . *Biotechnology Research International*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/904763>
- Kosanović, D., Potočnik, I., Vukojević, J., Stajić, M., Rekanović, E., Stepanović, M., & Todorović, B. (2015). Fungicide Sensitivity of *Trichoderma* spp. from *Agaricus bisporus* Farms in Serbia. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50(8), 607–613. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1028849>

- Li, C., Li, D., Feng, J., Fan, X., Chen, S., Zhang, D., & He, R. (2019). Duckweed (*Lemna minor*) is a Novel Natural Inducer of Cellulase Production in *Trichoderma reesei*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127(4), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.09.017>
- Marzuki, I., Noor, A., Nafie, N. La, & Djide, M. N. (2014). Isolasi dan Identifikasi Bakteri Shimbion Spons Penghasil Enzim. *Jurnal Ilmiah*, 1(2), 2.
- Mishra, P. K., & Khan, F. N. (2015). *Effect of Different Growth Media and Physical Factors on Biomass Production of Trichoderma Viride*. 8(2), 11–17.
- Nathan, V. K., Rani, M. E., Rathinasamy, G., Dhiraviam, K. N., & Jayavel, S. (2014). Process Optimization and Production Kinetics for Cellulase Production by *Trichoderma viride* VKF3. *SpringerPlus*, 3(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-92>
- Nauli, T. (2014). Penentuan Sisi Aktif Selulase *Aspergillus niger* dengan Docking Ligan. *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*, 16(2).
- Petrisor, C., Paica, A., & Constantinescu, F. (2016). Influence of Abiotic Factors on in Vitro Growth of *Trichoderma* Strains. *Proceedings of the Romanian Academy, Series B*, 18(1), 11–14. <http://www.acad.ro/sectii2002/proceedingsChemistry/doc2016-1/art02Petrisor.pdf>
- Poosapati, S., Ravulapalli, P. D., Tippirishetty, N., Vishwanathaswamy, D. K., & Chunduri, S. (2014). Selection of High Temperature and Salinity Tolerant *Trichoderma* Isolates with Antagonistic Activity Against *Sclerotium rolfsii*. *SpringerPlus*, 3(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-641>
- Purwanti, A. C. (2015). *Pengaruh Suhu dan pH Terhadap Aktivitas Enzim Xilanase dari Trichoderma viridae yang Ditumbuhkan pada Media Tongkol Jagung*. Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Rahayu, A., & Kuswytasari, N. D. (2013). Pengaruh Masa Inkubasi dan Konsentrasi Inokulum *Penicillium* sp. terhadap Aktivitas Enzim Selulase pada Medium Tongkol Jagung. *Jurnal Sains dan Seni Pomits*, 2(1), 1–4.
- Reddy, G. B., Page, |, Venkateswarlu, G., Swarnabala, G., Vijayavani, S., Reddy, K. V., Haritha, V., Siva Kumar, C., & Ganesh, J. (2015). Production of High Activity Amylase from *Trichoderma reesei* Ncim 1052 In Solid State Fermentation. *Quest Journals Journal of Research in Humanities and Social Science*, 3(11), 1–6. www.questjournals.org
- Safaria, S., Idiawati, N., & Zaharah, T. A. (2013). Efektivitas Campuran Enzim Selulase dari *Aspergillus niger* dan *Trichoderma reesei* dalam Menghidrolisis Substrat Sabut Kelapa. *JKK*, 2(1), 46–51.
- Sinha, A., Singh, R., Rao, S. G., & Verma, A. (2018). Comprehensive Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* On Different Culture Media and At Different Temperature and pH. *The Pharma Innovation Journal*, 7(2), 193–195. <http://thiqaruni.org/engpdf9/42.pdf>
- Susanti, R., & Febriana, F. (2017). *Teknologi Enzim* (1st ed.). CV Andi Offset.
- Walker, G. M., & White, N. A. (2018). Introduction to Fungal Physiology. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (3rd ed., pp. 1–34). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0470015330.ch1>
- Zehra, A., Dubey, M. K., Meena, M., & Upadhyay, R. (2017). Effect of Different Environmental Conditions on Growth and Sporulation of Some *Trichoderma* Species. *Journal of Environmental Biology*, 38(January), 197–203.