



I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Kitinase (EC3.2.1.14 = *poly-β-1,4-(2-acetamido-2-deoxy)-D-glucoside glycan hydrolase*) adalah enzim yang mempunyai kemampuan menghidrolisis kitin. Senyawa kitin adalah polimer *N*-asetilglukosamin dengan ikatan β(1-4) yang banyak terdapat di alam sebagai komponen utama kerangka luar artropoda, moluska, dinding sel cendawan dan askarida, serta dinding sel streptomises (Smucker & Kim, 1991). *Sheromonas caviae* WS7b, yaitu suatu isolat bakteri tanah asal Pulau Bangka, Propinsi Sumatera Selatan, yang diisolasi dari areal pertanian mengandung relatif sedikit populasi nematoda patogen tumbuhan, menunjukkan aktivitas kitinolitik yang kuat pada medium agar kitin. Gen kitinase dari galur ini telah diklon oleh Wenuganen (1997) pada vektor plasmid turunan pUC19 dinamai pWS506. Gen kitinase tersebut dapat diekspresikan dengan baik pada *Escherichia coli* DH5α di bawah promotor gen penyandi enzim β-galaktosidase (*lacZ*). Hasil penelitian Wenuganen (1997) menunjukkan bahwa gen kitinase-tersebut diduga terklon tanpa promotor aslinya.

Penelitian-penelitian pemanfaatan gen kitinase telah dilakukan baik dengan mengkonstruksi galur bakteri biokontrol maupun mengkonstruksi tanaman yang membawa gen kitinase terhadap cendawan patogen (Boller *et al.*, 1983; Hedrick *et al.*, 1983; Oppenheim & Chet, 1992). Selain untuk tujuan proteksi terhadap

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang
© Hak cipta milik IPB (Institut Pertanian Bogor)

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.
2. Dilarang mengumumikan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

lendiran patogen, penelitian-penelitian tentang gen kitinase banyak dilakukan untuk tujuan mempelajari regulasi tahap degradasi dan pemanfaatan kitin, mengkarakterisasi gen-gen kitinase dan produk-produknya, serta model untuk mempelajari regulasi ekspresi dan sekresi protein (Robbins *et al.*, 1992; Fujii & Miyashita, 1993; Miyashita & Fujii, 1993; Brurberg *et al.*, 1995, Watanabe *et al.*,

1997)

Gen kitinase berpotensi untuk dimanfaatkan dalam mengkonstruksi galur-galur biokontrol potensial yang dapat mencegah timbulnya penyakit tumbuhan yang disebabkan oleh cendawan. Biokontrol, berasal dari kata *biological control*, menjadi komponen yang sangat penting dalam pertanian. Pestisida kimia telah menjadi suatu substansi yang mencemaskan beberapa tahun terakhir ini, karena efek samping yang dapat ditimbulkannya terhadap lingkungan yang membahayakan baik bagi kesehatan manusia, maupun organisme nontarget lainnya, termasuk musuh alami yang sebenarnya menguntungkan. Oleh karena itu dipandang penting untuk mengembangkan pengendali alternatif yang aman dan layak lingkungan, terutama dengan menggunakan organisme yang sudah ada di dalam suatu habitat alaminya. Organisme-organisme ini mampu bertindak melindungi tanaman terhadap berbagai macam cendawan patogen tanaman, tanpa menimbulkan efek perusakan terhadap sistem ekologis. Namun, sebelum biokontrol ini menjadi suatu komponen dalam penanganan penyakit tumbuhan, haruslah efektif, mampu bertahan, konsisten, dan ekonomis. Untuk memenuhi kriteria tersebut antara lain dapat dilakukan manipulasi



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

genetik untuk menambah ketangguhan atau memperluas spektrum aktivitas biologis (Chet *et al.*, 1993).

Untuk memanipulasi dan mengintroduksi gen kitinase ke berbagai bakteri selain *E. coli* dan kerabatnya, gen ini harus dikonstruksi pada plasmid vektor berspektrum inang luas dan di bawah promotor yang sesuai agar dapat terekspresi, sebagaimana yang dilakukan dalam penelitian ini. Vektor plasmid yang berspektrum inang luas yang sudah banyak digunakan antara lain adalah pRK415, (Keen *et al.* 1988). Selain mengkonstruksi suatu gen di plasmid vektor berspektrum inang luas, beberapa peneliti mengkonstruksi gen yang diminati di dalam suatu transposon. Beberapa penelitian membuktikan bahwa konstruksi suatu gen di dalam transposon, yang kemudian akan terintegrasi ke dalam kromosom inang yang dituju sebagai resipien, akan lebih stabil dibandingkan dengan konstruksi pada vektor plasmid yang dapat hilang karena adaptasi dan seleksi di alam (Koby *et al.*, 1994; de Lorenzo *et al.*, 1990; Herrero *et al.*, 1990). Selain itu, lokasi penyisipan elemen sisipan beserta gen yang diminati di kromosom juga menjadi masalah yang harus diperhatikan, apakah penyisipan tersebut akan mempengaruhi kemampuan sel inang dalam proses pertumbuhan, dan kemampuan mengkolonisasi, serta karakter-karakter penting lainnya. Berdasarkan hal tersebut konstruksi plasmid rekombinan fusi transkripsi pada penelitian ini dilakukan pada beberapa vektor berspektrum inang luas dan juga transposon Tn5 dengan menambahkan gen penanda antibiotik yang sesuai untuk introduksi fragmen fusi transkripsi ke galur-galur biokontrol *Pseudomonas fluorescens* (Pf).

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



Eksresi yang diharapkan dari suatu agens biokontrol antara lain adalah ekspresi tanpa induksi, yaitu menghasilkan produk gen secara konstitutif dalam tingkat konsentrasi tertentu, sehingga dapat berfungsi sebagai pencegah serangan patogen. Untuk tujuan tersebut dalam penelitian ini gen kitinase difusikan di bawah promotor gen yang bersifat konstitutif, yaitu promotor gen resistensi antibiotik Kanamisin (PKm^R) dan promotor hibrid *trp* dan *lac*, *P_{tac}*. Promotor PKm^R diambil dari aset gen resistensi Kanamisin dari plasmid pUC4K yang berasal dari transposon Tn903 (Oka *et al.*, 1981). Promotor *tac* yang diambil dari plasmid pKK23-3 (Pharmacia) adalah suatu promotor kuat dalam kondisi konstitutif maupun terinduksi (Glick & Pasternak, 1994). Koby *et al.* (1994) dan Downing & Thomson (2000), telah berhasil mengklon gen kitinase asal *Serratia marcescens* dan diekspresikan di bawah promotor *tac* di dalam Pf, baik yang terkonstruksi di dalam vektor plasmid maupun pada transposon.

Galur biokontrol yang tengah dikembangkan terhadap patogen tanaman kedelai *Xanthomonas campestris* pathovar *glycines* adalah *Pseudomonas fluorescens* B29 (Mariani, 1995; Suwanto *et al.*, 1996; Manuella *et al.*, 1997). Galur Pf B29 diisolasi dari daun tanaman kedelai yang terserang bakteri patogen tersebut. Peneliti-peneliti terdahulu membuktikan bahwa galur Pf B29 mampu mengendalikan bakteri penyebab pustul pada kedelai secara kompetitif (Nawangsih, 1997; Khaeruni, 1998). Galur Pf B29 akan dikembangkan kemampuannya sebagai biokontrol terhadap cendawan dengan mengkonstruksi galur B29 yang kitinolitik. Dari studi pendahuluan diketahui bahwa Pf B29 mampu hidup pada media yang dibubuhi



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.
b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumunkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

antibiotik Tetrasiklin (10 µg/ml), Kanamisin (25 µg/ml), Streptomisin dan Spektinomisin (masing-masing 50 µg/ml). Untuk keperluan pemeliharaan dan seleksi, Mariani (1995), telah melakukan mutasi spontan pada Pf B29 sehingga menjadi resisten terhadap antibiotik Rifampisin (100 µg/ml).

Galur Pf lainnya yang juga sedang dikembangkan sebagai agens biokontrol adalah isolat Pf5024 dan isolat Pf5100, yang termasuk Pf kelompok Vb berdasarkan pengelompokan secara taksonomi yang diuraikan oleh Lelliott *et al.* (1966). Isolat-isolat tersebut merupakan galur-galur nonpatogen yang diisolasi dari pucuk brokoli (*Brassica oleracea* var *italica*), dan telah dimanfaatkan sebagai biokontrol pada pertanian brokoli karena kemampuannya menghasilkan biosurfaktan (Campbell *et al.*, 1995). Isolat-isolat Pf tipe liar tersebut telah dimutasikan secara spontan sehingga menjadi resisten terhadap antibiotik Rifampisin di dalam penelitian ini, untuk membantu proses seleksi balik (*counter-selection*) pada teknik introduksi gen kitinase secara konjugasi bakterial.

Di dalam penelitian ini, juga dilakukan sekuensing fragmen DNA gen penyandi kitinase (*chi*) untuk memastikan struktur daerah promotor, selain memperoleh informasi-informasi lain seperti hubungan karakternya dengan data sekuens DNA yang sudah ada di *database*, sekuens asam-amino gen kitinase dugaan dan informasi tentang protein kitinase, berdasarkan data sekuens DNA yang diperoleh. Gen penyandi kitinase dari isolat bakteri tanah berasal dari Israel, *Aeromonas caviae*, telah diisolasi dan disekuens sepanjang 2.710 basa nukleotida tanpa daerah promotor yang lengkap (Sitrit *et al.*, 1995). Informasi ini dapat menjadi

Hak cipta Dilindungi Undang-Undang

Hak cipta dilindungi oleh Undang-Undang

Bogor Agricultural University

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber;

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.

data pembandingan bagi gen kitinase isolat asal Indonesia berdasarkan data sekuens DNA yang diperoleh, dan akan merupakan suatu hal yang menarik, karena kedua bakteri ini berasal dari daerah yang secara geografis sangat berjauhan.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan organisme rekombinan, dalam hal ini *P. fluorescens*, yang memproduksi kitinase ekstraselular. Berdasarkan hal tersebut, maka penelitian ini dilakukan dengan suatu strategi yang meliputi beberapa tahapan, yaitu (i) mengkarakterisasi DNA gen kitinase (*chi*) dengan sekuensing. Data sekuens DNA gen *chi* yang diperoleh dimanfaatkan dalam mempelajari dan meneliti kekerabatan gen *chi* ini dengan gen-gen kitinase lain yang telah ada dengan membandingkannya dengan data sekuens DNA di *database*, dan membandingkan sekuens asam amino turunannya; (ii) melakukan fusi gen *chi* di bawah promotor konstitutif yang sesuai untuk ekspresi gen kitinase di inang selain *E.coli*, sehingga produk kitinase dapat diekspresikan secara konstitutif; (iii) mengintroduksi fusi transkripsi gen *chi* ke galur-galur biokontrol *P. fluorescens*; dan (iv) menganalisis ekspresi gen *chi* pada galur-galur bakteri biokontrol dengan esei kualitatif dan semikuantitatif aktivitas enzim kitinase.

C. Tahap Pengerjaan

Di dalam disertasi ini pekerjaan penelitian dibagi sebagai berikut, (i) sekuensing fragmen DNA gen *chi*, (ii) konstruksi gen *chi* difusikan di bawah promotor konstitutif, promotor gen resisten Kanamisin, dan promotor *tac*, yang



1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber;

a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan artikel atau tinjauan suatu masalah.

b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengunutkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.



bersifat terinduksi dan konstitutif, pada vektor-vektor plasmid yang berspektrum inang luas, dan pada vektor transposon, (iii) introduksi gen *chi* ke galur-galur bakteri biokontrol *Pseudomonas fluorescens*, beserta esei ekspresinya pada media agar kitin dan esei kuantitatif.

D. Manfaat penelitian

Di dalam mengkonstruksi agens biokontrol, diharapkan suatu gen potensial yang klon dapat diekspresikan secara konstitutif. Dengan demikian produk gen yang dihasilkan tidak berlebihan sehingga tidak menyebabkan toksik, dan inang klon gen tersebut, dalam hal ini agens biokontrol, dapat mengadaptasi kondisi baru ini dengan baik, tanpa terjadi mutasi untuk mengatasi efek produk gen tersebut.

Ekspresi fusi transkripsi gen *chi* pada galur-galur biokontrol Pf akan sangat berguna sebagai anticendawan alternatif pengganti penggunaan fungisida kimia yang sudah terbukti memberikan dampak negatif bagi lingkungan dan mahluk hidup lain.

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar IPB.

2. Dilarang mengumbar dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin IPB.