

# DETEKSI DAN IDENTIFIKASI CENDAWAN ENDOFIT *TRICHODERMA* YANG BERASOSIASI PADA TANAMAN KAKAO

## Detection and Identification of Endophyte *Trichoderma* Fungi Associated on Cocoa Plant

Rina Sriwati<sup>1)</sup>, Tjut Chamzurni<sup>1)</sup> dan Sukarman<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Staf Pengajar Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

<sup>2)</sup>Mahasiswa Jurusan HPT Fakultas Pertanian Universitas Syiah Kuala Banda Aceh

### ABSTRACT

The endophytic fungi are non pathogenic fungi and almost all of them associated with plant cells without any symptoms. Endophytes fungi that associated with cacao plant from East Aceh has been isolated. Based on morphological and molecular identification was found two species of fungi *Trichoderma* spp which is a fungal antagonist. Molecular identification have provided the species of *Trichoderma virens* and *Trichoderma longibrachiatum*. *Trichoderma virens* had good potency as biological control against pathogen.

**Keywords:** endophytic fungi, trichoderma, cacao

### PENDAHULUAN

Cendawan endofit adalah cendawan yang hidup di dalam jaringan tanaman sehat tanpa menyebabkan gejala atau kerusakan pada tanaman inang (Petrini & Petrini 1985). Keuntungan dengan adanya cendawan endofit pada tanaman inang adalah meningkatnya toleransi terhadap logam berat, meningkatkan ketahanan terhadap kekeringan, menekan serangan hama/penyakit, resistensi sistemik terhadap patogen (Saikkonen *et al.* 1998 dalam Arnold *et al.* 2003).

Penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* merupakan penyakit terpenting dalam budidaya kakao. Pengendalian penyakit ini cukup sulit dilakukan karena sumber infeksinya selalu ada yaitu inokulum cendawan yang berada dalam tanah, sehingga dari musim ke musim kerugian yang ditimbulkan cukup besar. Salah satu pengendalian yang dapat dikembangkan adalah dengan menggunakan cendawan antagonis untuk menekan inokulum cendawan yang berada dalam tanah.

Salah satu agen hayati yang sudah ditemukan dan banyak digunakan adalah cendawan antagonis. Cendawan antagonis adalah cendawan non pathogen dan

sebagian besar merupakan cendawan endofitik yang berasosiasi dengan jaringan tanaman tanpa menimbulkan penyakit bagi tanaman. Sangat sedikit informasi atau penelitian yang membuktikan tentang adanya hubungan saling menguntungkan antara cendawan endofitik dan tanaman inangnya. Salah satu hipotesis yang dikemukakan menyebutkan bahwa hubungan tersebut mampu melindungi tanaman dari serangan cendawan patogen. Maka cendawan endofitik berpeluang besar sebagai agen biocontrol untuk mengendalikan patogen tumbuhan. Oleh sebab itu perlu dilakukan serangkaian kegiatan penelitian mengisolasi dan identifikasi cendawan endofitik yang berasosiasi pada tanaman dan mengidentifikasi frekwensi munculnya cendawan sehingga mampu menjelaskan mekanisme biological control secara invitro.

### METODE PENELITIAN

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Unsyiah. Sedangkan sample buah, batang dan daun Kakao di koleksi dari beberapa Kebun Kakao Rakyat yang berada di wilayah Kabupaten Aceh Timur.

### Isolasi dan identifikasi cendawan endofitik

Survey dilakukan untuk mengisolasi cendawan-cendawan endofit di perkebunan kakao di Desa Sarah Kayee, Kecamatan Rantau Seulamat Kabupaten Aceh Timur. Sample buah, batang, daun dan akar tanaman kakao diambil dan di bawa ke Laboratorium Hama dan Penyakit Tumbuhan untuk dilakukan pengamatan dan diisolasi cendawan dengan cara penanaman jaringan buah, daun dan batang yang diduga terinfeksi pada media PDA, kemudian dilanjutkan dengan pemurnian isolat sehingga di peroleh isolat yang murni. Semua sample diambil berdasarkan random dari beberapa lokasi, jumlah sampel akan bervariasi tergantung jumlah tanaman yang ada di lapangan.

Hasil biakan cendawan yang berupa biakan murni dideterminasi berdasarkan morfologi mikroskopisnya dengan menggunakan kunci determinasi cendawan hingga tingkat genus.

Proses identifikasi molekuler dilakukan di Lab. Virologi Fakultas Pertanian Institute Pertanian Bogor. Cendawan endofitik hasil isolasi dari perkebunan Kakao dimurnikan pada media PDA (Potato Dextrose Agar). Culture cendawan yang digunakan untuk identifikasi diambil secara random dari setiap ulangan untuk dilakukan ekstraksi DNA. Prosedur kimia akan digunakan untuk menghomogenkan hifa cendawan; pertama dinding sel cendawan di digest dengan menambahkan 50  $\mu$ l dari 1% Westase enzim solution dan di inkubasi pada 30°C selama 2 jam. Proses digest kemudian dilanjutkan pada tabung reaksi

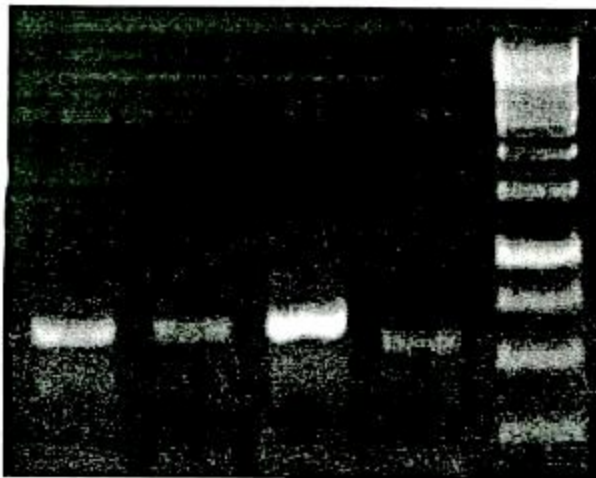
1,5 ml mengandung 100  $\mu$ l of CTAB, hexadecyltrimethylammonium bromide solution dan DNA di ekstrak, kemudian dimurnikan berdasarkan metoda Matsuda & Hiji (1999). Larutan DNA digunakan untuk aplikasi dengan PCR dan menggunakan internal primers ITS1-F (-CTT-GGTCAT-TTA-GAG-GAA-GTA-A-) and ITS4 (-TCC-TCCGCT-TAT-TGA-TAT-GC-) (Gardes & Bruns 1993, White *et al.* 1990). Genotipe cendawan yang terdeteksi kemudian di sequence berdasarkan metode White *et al.* (1990) yaitu dengan mengirim hasil PCR ke PT. Charoen Pokphan Tbk, untuk dilakukan peruntan basanya. Untuk ITS1, ITS2 dan 5.8S regions inti ribosomal DNA, DNA sequence yang telah ditemukan kemudian dibandingkan dengan species pada GenBank database. Identifikasi ditingkat genus level didasarkan pernyataan database di atas 90%.

### Deteksi frekwensi cendawan

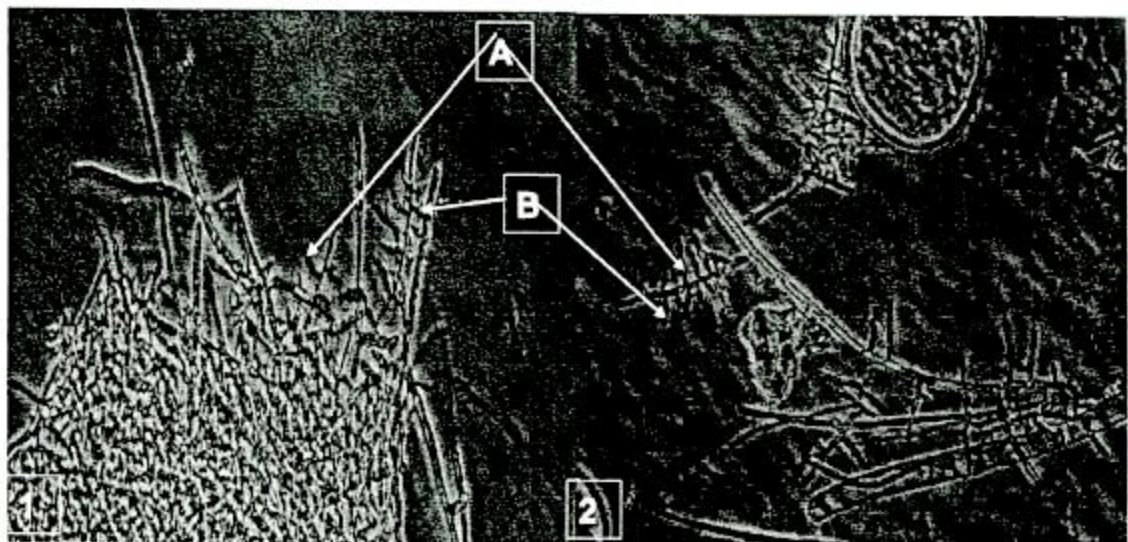
Ada atau tidak ditemukannya cendawan yang terisolasi dari tiap-tiap bagian sample akan dihitung secara morfologi dengan mengamati warna koloni yang tumbuh di PDA dimana sample diletakkan. Jika satu jenis cendawan terdeteksi dari sample, sample tersebut di klasifikasikan sebagai "positive" sedangkan yang tidak "negative". Menghitung frekwensi cendawan yaitu dengan cara membagi jumlah sample yang positif dengan total jumlah sample dari tiap katagori (akar, buah, batang, daun). Hasil perbanyakan DNA cendawan dengan menggunakan teknik PCR dapat dilihat pada Gambar 1.

Tabel 1. Kelompok isolat-isolat cendawan yang diisolasi pada medium *potato dextrose agar*.

No	Kelompok Isolat	Katagori Isolat	Morfologi koloni
1.	I	1, 1a, 1b, 1f, 2	Koloni Cendawan berwarna abu-abu kehitaman dan tebal
2.	II	4, 13	Koloni Cendawan berwarna kuning muda
3.	III	14, 15	Koloni Cendawan berwarna hijau tua dan tebal
4.	IV	1c, 1e, 3, 3b, 4a, 4b, 5, 6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 10, 11.	Koloni Cendawan putih dan tebal



Gambar 1. Hasil amplifikasi divisualisasi menggunakan gel agarose 1,2% dengan buffer TBE 0,5x. M= Marker, 1= isolat 14, 2= isolat 15, 3= isolat 12, 4= isolat 6b



Gambar 2. Pengamatan mikroskopis cendawan Antagonis *Trichoderma virens* (1) dan *Trichoderma longibrachiatum* (2); A. percabangan konidiospor; B. Konidium

Berdasarkan hasil peruntan basa telah teridentifikasi beberapa jenis cendawan *Trichoderma* yang terlihat pada Tabel 2.

#### Deteksi frekwensi cendawan

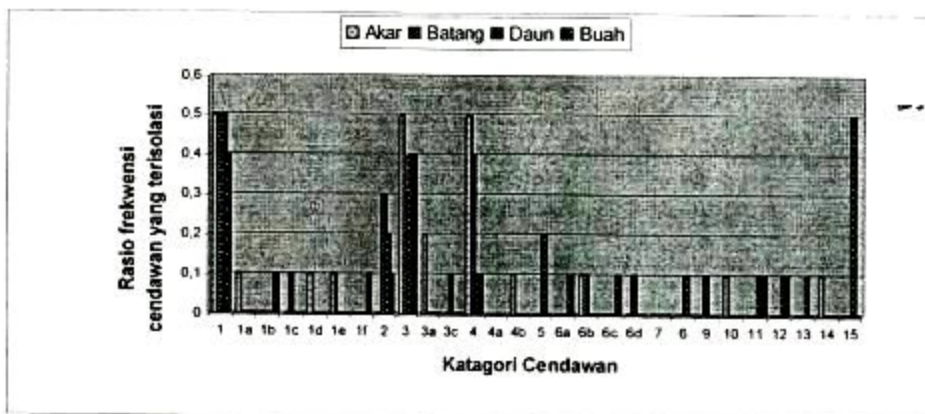
Hasil pengamatan terhadap deteksi frekwensi munculnya cendawan dari tiap-tiap katagori sampel dapat dilihat pada Gambar 2.

Cendawan endofit yang paling sering

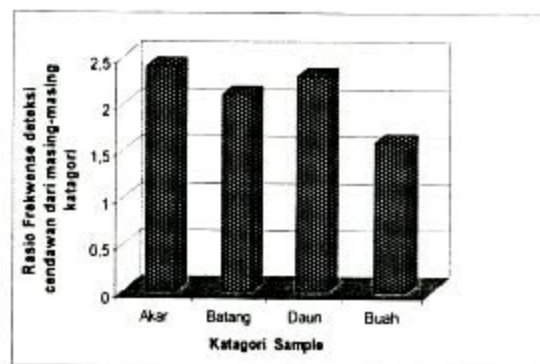
muncul dari setiap area sample adalah kelompok I yaitu cendawan *Botryosphaeria* dengan karakter morfologi sebagai berikut: warna koloni putih di awal pertumbuhan lalu berubah menjadi abu-abu kehitaman dan akhirnya berwarna hitam pekat. Karakter morfologi yang diamati di bawah microscope menunjukkan ciri-ciri konidia yang tersusun seperti rantai dan hifa bersekat (Rubini *et al* 2005).

Tabel 2. Hasil peruntan basa beberapa DNA cendawan hasil amplifikasi menggunakan teknik PCR.

No.	kode samples	Jenis cendawan	Keterangan sequencing
1.	12	<i>Debaryomyces hansenii</i> strain JHSa	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
2.	13	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> strain CIB T29	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
3.	14	<i>Trichoderma virens</i> strain GL-21	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.
4.	6b	Fungal endophyte isolate 285C	18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.



Gambar 2. Deteksi frekwensi cendawan yang terisolasi dari akar, batang, daun dan buah kakao



Gambar 3. Frekwensi cendawan endofit yang terdeteksi dari akar, batang, daun dan buah tanaman kakao.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Isolasi dan identifikasi cendawan endofitik

Dari hasil isolasi cendawan endofit dari akar, batang, daun dan buah kakao yang berasal dari perkebunan kakao di desa Sarah Kayee, Kecamatan Rantau Seulamat Kabupaten Aceh Timur telah diperoleh 28 isolat cendawan baik dari tanaman sehat maupun dari tanaman sakit, 2 species *Trichoderma*, 1 Species *Glilotidium*, dua species cendawan kelompok *Botryosphaeria* Sp dan 2 jenis cendawan *Mortierella* serta lainnya dari kelompok cendawan berkoloni putih yang masih dalam tahap identifikasi secara molekuler. Pemilihan isolat didasarkan pada perbedaan morfologi koloni (warna dan bentuk koloni) isolat cendawan pada médium PDA untuk tiap katagori simple.

Berdasarkan pengamatan morfologi, yang termasuk dalam kelompok Cendawan antagonis adalah kelompok II dan III (Tabel 1) yaitu Cendawan berwarna kuning muda dan hijau tua. Karakter morfologi Cendawan antagonis *Trichoderma* sangat sesuai dengan kelompok Cendawan III yaitu koloni yang berwarna putih diawal perkembangan dan kemudian berubah menjadi hijau sampai hijau tua (Cendawan kode 14 dan 15). Adapun kelompok I diduga marga *Botryosphaeria* sedangkan kelompok IV adalah kelompok Cendawan non patogen dan patogen yang belum diketahui jenisnya.

Berdasarkan hasil amplifikasi cendawan dengan menggunakan pasangan primer ITS 1 dan ITS 2 menghasilkan pita DNA berukuran ~650 bp (Gambar 1). Selanjutnya hasil dilakukan perunut basanya, yang sedang dalam proses. Hasil amplifikasi ini menunjukkan bahwa isolat 14 dan 15 adalah dari kelompok cendawan *Trichoderma* yaitu *Trichoderma longibrachiatum* dan *Trichoderma virens*. Hasil ini juga didukung oleh pengamatan morfologi yang menunjukkan persamaan sifat morfologi isolat 14, 15 yang mana pertumbuhan koloni putih dan kemudian berubah menjadi hijau, dan ciri tersebut merupakan salah satu ciri cendawan *Trichoderma*.

*Trichoderma* sp. (Gambar 2): Hipha septate, berdinding tipis, hyaline. Conidiophores dengan panjang yang bervariasi, membentuk cabang yang disebut phialides. Ujung Phialides membulat, pendek, hyaline. Konidia oval hingga sedikit silinder, berdinding tipis, halus, hyaline. Koloni putih diawal perkembangan kemudian menjadi hijau atau hijau tua. Diskripsi cendawan kelompok *Trichoderma* ini dilaporkan diantaranya oleh Beneke & Rogers (1980), Kwon-Chung & Bennett (1992).

*Trichoderma longibrachiatum* merupakan satu satunya species dari kelompok *Trichoderma* yang dilaporkan oleh Tang *et al.* (2003), yang memberikan dampak buruk bagi kesehatan manusia, oleh sebab itu khusus untuk isolat ini tidak perlu dilanjutkan lagi untuk menguji potensinya sebagai antagonis. Selanjutnya species *T. virens* diketahui mampu memproduksi auksin yang berhubungan dengan bahan indole-3-acetic acid, indole-3-acetaldehyde, and indole-3-ethanol, termasuk analisis pada ketiga bahan indolic yang memberikan informasi secara lengkap mengenai struktur-hubungan dasar aktivitas terhadap efikasinya pada modulasi system pembentukkan akar (Hexon *et al.* 2009). *Trichoderma virens* juga diketahui memiliki mekanisme antagonis mycoparasit dan antibiosis (interaksi langsung dengan patogen), merangsang resisten tanaman dan membantu menstimulasi perkecambahan benih dan meningkatkan toleransi tanaman terhadap cekaman lingkungan (efek tidak langsung) (Howell 2004).

### Deteksi frekwensi cendawan

Hasil pengamatan terhadap frekwensi munculnya cendawan endofit dapat dilihat pada Tabel 3 di atas. Cendawan endofit telah diisolasi dari area akar, batang, daun dan buah. Hasil isolasi terhadap cendawan endofit ditemukan bahwa kehadiran cendawan pada tiap-tiap katagori sampel dengan rasio frekwensi 2.4, 2.1, 2.3, dan 1.6 beturut-turut pada akar, batang, daun dan buah. Rasio ini menjelaskan bahwa cendawan endofit berkolonisasi dengan variasi dan frekwensi yang tinggi pada akar dan daun dibandingkan pada batang dan

buah. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa cendawan antagonis kelompok *Trichoderma* (kategori 14 dan 15) hanya terisolasi dari sample akar dan daun saja. Faktor yang mempengaruhi pemilihan habitat cendawan ini masih belum jelas dipahami.

## SIMPULAN DAN SARAN

Cendawan endofit terdeteksi tertinggi pada akar dan daun dibandingkan pada batang dan buah. Berdasarkan identifikasi morfologi dan molekuler ditemukan dua species cendawan *Trichoderma* yaitu *Trichoderma virens* dan *Trichoderma brachyatum* cendawan antagonis. Cendawan *Trichoderma* secara invitro berpotensi sebagai antagonis.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, A.E., Meji'a, L.C., Kylo, D., Rojas, E., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E.A., 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15649–15654.
- Beneke, E.S., & Rogers, A.L., 1980. Representative common saprophytic fungi, In: Holtmeter, J. Reindl L., M., (Eds.), *Medical Mycology Manual with Human Mycoses Monograph*. 4<sup>th</sup> Ed. Burgess, Minneapolis, USA
- Gardes, M., & T. D. Bruns. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- Hexon A. C., Macias-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio J., (2009). *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth through an Auxin-Dependent Mechanism in Arabidopsis. *Plant Physiol. J.* 149(3): 1579–1592.
- Howell, C. R., 2004. Understanding the Mechanisms Employed by *Trichoderma virens* to Effect Biological Control of Cotton Diseases. Presented at the Annual Meeting of The American Phytopathological Society, August 3, 2004, Anaheim, CA.
- Kwong-Chung, KJ, Bennet, JE. *Mycetoma*. In: *Medical mycology*, Kwong-Chung, KJ, Bennet, JE (Ed), *Lea and Febiger, Philadelphia* 1992, pp 560.
- Meji'a , L.C, Rojas, E. I., Maynard, Z., Bael, S.V., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G. J., Robbins, N., & Herre, E. A., 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cocoa* pathogens, *Biological Control* 46, 4–14
- Petrini L, Petrini O (1985). Xylariaceae fungi as endophytes. *Sydowia* 38: 216-234.
- Rubini, M.R., Silva-Ribeiro, R.T., Pomella, A.W.V., Maki, C.S., Araujo, W.L., dos Santos, D.R., Azevedo, J.L., 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of Witches' Broom Disease. *International Journal Biological Science* 1, 24–33.
- Tang, P, Subhash, M., Lynne, S., Ian, W., Richard, S., Iivi, C., and Tony, M. 2003. Allergic Fungal Sinusitis Associated with *Trichoderma longibrachiatum* J. *Clin. Microbiol.* V. 41(11).
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc., New York, pp. 315–322.