

Identifikasi Cendawan Endofit Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*

Detection of Endophytic Fungi Using Polymerase Chain Reaction Technique

Tuti Susanti Legiastuti*, Tri Aminingsih
Universitas Pakuan, Bogor 16143

ABSTRAK

Penyakit keriting kuning yang disebabkan oleh infeksi *Begomovirus* (*Geminiviridae*) merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman cabai di Indonesia. Eksplorasi cendawan endofit dilakukan sebagai langkah awal untuk mencari agens biokontrol yang potensial menekan penyakit keriting kuning cabai. Cendawan endofit diisolasi dari pertanaman cabai di daerah Sleman, Yogyakarta dan isolat selanjutnya diidentifikasi menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) dan peruntutan DNA. Pita DNA berukuran ± 500 pb berhasil diamplifikasi dari 10 isolat cendawan endofit menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4, tetapi urutan DNA hanya diperoleh dari 8 isolat. Berdasarkan pada analisis BLASTN diketahui kemiripan masing-masing isolat dengan spesies cendawan pada *GenBank*, yaitu isolat H1 dengan *Pleosporaceae* sp. (98%), isolat H5 dengan *Cercospora nicotianae* (100%), isolat H11 dengan *Cercospora piaropi* (98%), isolat H16 dengan *Guignardia mangiferae* (99%), isolat H17 dengan *Geomyces pannorum* (95%), isolat H18 dengan *Diaporthe phaseoloru* (99%), isolat K3 dengan *Dothideomycete* sp. (100%), dan isolat K10 dengan *Alternaria longissima* (99%).

Kata kunci: *Begomovirus*, cabai, peruntutan DNA, *polymerase chain reaction*

ABSTRACT

Yellow leaf curl disease, caused by a member of *Begomovirus* (*Geminiviridae*), is one of important diseases of chilli pepper in Indonesia. Exploration of endophytic fungi was initiated in order to find biological control agents for an alternative control strategies of this disease. Isolates of endophytic fungi were collected from chilli pepper growing area in Sleman, Yogyakarta and further identification using molecular technique involving polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing was performed. DNA fragments of ± 500 bp were successfully amplified from 10 fungal isolates by PCR using primer pair ITS1/ITS4, but only 8 DNA sequences was obtained for further genetic analysis. Based on BLASTN analysis the endophytic fungi were identified as having the highest similarity with *Pleosporaceae* sp. (98%) for H1 isolate, *Cercospora nicotianae* (100%) for H5 isolate, *Cercospora piaropi* (98%) for H11 isolate, *Guignardia mangiferae* (99%) for H16 isolate, *Geomyces pannorum* (95%) for H17 isolate, *Diaporthe phaseoloru* (99%) for H18 isolate, *Dothideomycete* sp. (100%) for K3 isolate, and *Alternaria longissima* (99%) for K10 isolate.

Key words: *Begomovirus*, chillipepper, DNA sequencing, *polymerase chain reaction*

*Alamat penulis korespondensi: Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Jalan Pakuan PO Box 452, Bogor 16143
Tel: 0251- 8375547, Faks: 0251- 8375547, Surel: tuti.legiastuti@gmail.com

PENDAHULUAN

Endofit adalah mikroorganisme yang mengkoloni bagian dalam tanaman tanpa menimbulkan pengaruh yang merugikan pada tanaman inangnya, sebaliknya dapat membantu menginduksi ketahanan tanaman terhadap gangguan biotik maupun abiotik. Setiap spesies tanaman dilaporkan merupakan inang bagi cendawan endofit. Cendawan endofit mempunyai peranan meningkatkan toleransi terhadap kekeringan serta menghambat perkembangan serangga herbivora, cendawan patogen, virus dan nematoda yang menyerang perakaran. Sebagai agens biokontrol cendawan endofit memiliki mekanisme parasitisme, antibiosis, kompetisi nutrisi, dan induksi ketahanan. Cendawan endofit menghasilkan metabolit fungsional yang termasuk dalam kelompok *terpenoids*, *steroids*, *xanthones*, *chinones*, *phenol*, *isocoumarins*, *benzopyranones*, *tetralones*, *cytochalasines* dan *enniatines* yang berperan sebagai antibakteri, antiviral, dan anticendawan (Suryanarayanan *et al.* 2009).

Cendawan endofit berpotensi sebagai agens biokontrol karena keberadaan cendawan endofit ini sangat beragam dan berlimpah, dapat ditemukan baik pada tanaman pertanian maupun pada rumput-rumputan. *Chaetomium globosum* dan *Phoma* sp. merupakan cendawan endofit yang diisolasi dari tanaman gandum, keduanya dapat menekan keparahan penyakit yang disebabkan *Puccinia titricina* dan *Pyrenophora* spp. (Dingle dan McGee 2003; Istifadah dan McGee 2006). Aplikasi cendawan endofit untuk menekan keparahan penyakit pada tanaman kakao yang disebabkan oleh *Phytophthora* sp. dilaporkan oleh Arnold *et al.* (2003). Penelitian tentang cendawan endofit serta potensinya sebagai agens biokontrol untuk virus tanaman masih terbatas (Zabalgogezcoa 2008). Lehtonen *et al.* (2006) melaporkan aplikasi cendawan endofit dapat mengurangi frekuensi *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) yang menyerang tanaman *Lolium pratense*.

Dalam rangka mencari agens biokontrol untuk mengendalikan penyakit daun keriting kuning cabai yang disebabkan oleh *Begomovirus* dilakukan eksplorasi cendawan endofit dari tanaman cabai di daerah endemik penyakit daun keriting kuning cabai di Yogyakarta. Penelitian selanjutnya bertujuan mengidentifikasi cendawan endofit yang diperoleh menggunakan teknik *polymerase chain reaction* (PCR) yang sudah banyak digunakan sebagai metode identifikasi yang akurat.

BAHAN DAN METODE

Isolasi Cendawan Endofit

Sampel daun diambil dari pertanaman cabai dengan insiden penyakit keriting kuning yang tinggi di daerah Sleman, Yogyakarta. Cendawan endofit dari daun cabai diisolasi menggunakan metode Rodrigues (1994). Sterilisasi daun secara bertahap dilakukan sebanyak dua kali menggunakan berturut-turut etanol 96% selama 30 detik, NaOCl 1% selama 1 menit, dan etanol 70% selama 30 detik. Daun cabai kemudian dipotong kecil, diletakkan pada agar-agar cawan *potato dextrose agar* (PDA), dan diinkubasi pada suhu ruang. Miselium yang tumbuh dari potongan daun, dipindahkan ke agar-agar cawan PDA yang baru sampai diperoleh biakan murni. Masing-masing biakan murni cendawan diamati warna dan morfologi koloninya.

Isolasi dan Amplifikasi DNA Cendawan

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan pada metode Castillo *et al.* (1994) yang telah dimodifikasi, yaitu dengan penambahan *polyvinylpyrrolidone* (PVP) pada bufer ekstraksi CTAB dan natrium asetat pada tahap pengendapan DNA. Pelet yang diperoleh dicuci dengan 500 μ L etanol 70%, dikeringkan, kemudian diresuspensi dengan 100 μ L bufer TE. Suspensi DNA disimpan pada -20 °C atau dapat langsung digunakan untuk proses selanjutnya.

Amplifikasi DNA cendawan menggunakan pasangan primer ITS1 (5' TCCGTAGG TGAACCTGCGG 3') dan ITS4 (5' TCCTCC GCTTATTGATATGC 3'). Reaksi PCR (volume 25 μL) terdiri atas 1 μL DNA sampel dengan konsentrasi 25-50 ng μL^{-1} ; 18.8 μL air bebas nuklease; 2.5 μL 10x bufer PCR (10 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 8.8, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgCl_2 , dan 0.1% Triton X-100) (Fermentas, USA); 0.5 μL dNTP 10 mM (Fermentas, USA); masing-masing 1 μL primer ITS1 dan ITS4 dengan konsentrasi 10 μM ; 0.2 μL enzim *Taq* DNA polimerase rekombinan 5U μL^{-1} (Dream *Taq* DNA Polymerase Fermentas, USA). Amplifikasi didahului dengan denaturasi awal selama 5 menit pada 94 °C, dilanjutkan sebanyak 35 siklus melalui tiga tahapan meliputi denaturasi selama 1 menit pada 94 °C, penempelan primer (*annealing*) selama 1 menit pada 55 °C, sintesis selama 2 menit pada 72 °C, pada tahap akhir ditambah 10 menit pada 72 °C. Analisis DNA hasil amplifikasi dilakukan dengan elektroforesis menggunakan gel agarosa 1% dalam bufer *Tris Boric EDTA* (TBE 0.5x) dan visualisasi menggunakan sinar UV (Sambrook dan Russel 2001).

Analisis Perunutan DNA

DNA hasil amplifikasi digunakan untuk tahapan perunutan DNA berdasarkan pada metode *dideoxy nucleotide chain termination* (Macrogen Inc., Korea Selatan). Hasil perunutan DNA selanjutnya disusun dengan program Bioedit dan dianalisis menggunakan program BLASTN dengan memanfaatkan informasi dari *Genbank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

HASIL

Morfologi Koloni Cendawan Endofit

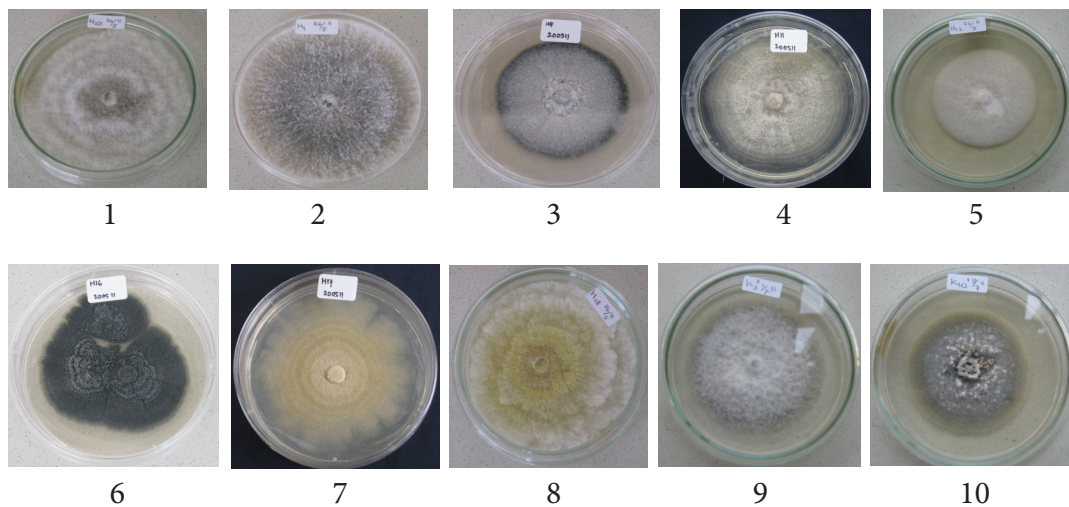
Tiga puluh empat isolat cendawan endofit berhasil diisolasi dari daun cabai (data tidak ditampilkan). Berdasarkan pada pengamatan warna dan morfologi koloni dipilih 10 isolat untuk tahap identifikasi lanjut (Gambar 1). Sebagian besar koloni cendawan berwarna

putih pada awal pertumbuhannya, tetapi kemudian berubah warna menjadi keabuan (H0, H1, K3), atau kehitaman (H5, H16), dan ada pula koloni cendawan yang tetap berwarna putih (H11, H12). Beberapa koloni cendawan berwarna abu-abu kehitaman sejak awal pertumbuhan (K10), kuning di bagian tengah (H18), atau putih kusam di bagian tengah (H17). Berdasarkan pada bentuk tepi koloni dapat dibedakan koloni dengan tepi menyebar tidak beraturan dan koloni dengan tepi halus. Beberapa koloni menunjukkan sifat morfologi yang berbeda, di antaranya pola pertumbuhan konsentris (H0, H16), pertumbuhan miselium mengudara (*aerial*) (H1, K3), tekstur koloni yang tebal (H11, H12, H16) atau tipis (H1, K3).

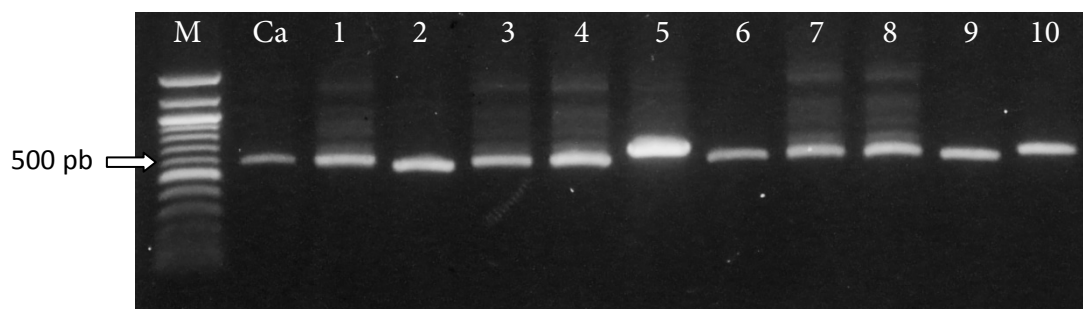
Amplifikasi dan Perunutan DNA

Pita DNA cendawan berukuran ± 500 pb berhasil teramplifikasi dari 10 isolat cendawan endofit (Gambar 2). Ukuran pita DNA tersebut sesuai dengan yang diharapkan. Hasil perunutan DNA dari 8 isolat cendawan endofit dapat digunakan untuk analisis lanjut karena hasil perunutan DNA dari 2 isolat lainnya (H0 dan H12) menunjukkan elektroferogram yang tidak terpisah dengan baik.

Hasil analisis urutan DNA dari 8 isolat cendawan endofit menunjukkan identitas yang berbeda untuk masing-masing isolat cendawan tersebut dengan tingkat kemiripan $\geq 95\%$ (Tabel 1). Hasil analisis dengan program BLASTN yang digunakan adalah data yang menunjukkan kemiripan yang paling tinggi ($> 90\%$ dengan *e value* 0.0) sesuai ketentuan Clavarie dan Notredam (2003). Isolat H1 mempunyai kemiripan dengan *Pleosporaceae* sp. (98%), isolat H5 dengan *Cercospora nicotianae* (100%), isolat H11 dengan *Cercospora piaropi* (98%), isolat H16 dengan *Guignardia mangiferae* (99%), isolat H17 dengan *Geomyces pannorum* (95%), isolat H18 dengan *Diaporthe phaseoloru* (99%), isolat K3 dengan *Dothideomycete* sp. (100%), dan isolat K10 dengan *Alternaria longissima* (99%).



Gambar 1 Koloni 10 isolat cendawan endofit asal tanaman cabai yang ditumbuhkan pada medium PDA. Nomor 1-10 berturut-turut ialah isolat H0, H1, H5, H11, H12, H16, H17, H18, K3, dan K10



Gambar 2 Hasil amplifikasi DNA cendawan endofit asal tanaman cabai menggunakan pasangan primer ITS1/ITS 4. M, 100 pb DNA ladder (Fermentas); Ca, *Colletotrichum acutatum* sebagai pembandingan; Lajur 1-10 berturut turut isolat H0, H1, H5, H11, H12, H16, H17, H18, K3, dan K10.

Tabel 1 Tingkat kemiripan isolat cendawan endofit asal tanaman cabai berdasarkan pada analisis BLASTN

Kode isolat	Panjang Nukleotida (pb)	Identitas	Kemiripan (%)	Kode aksesi GeneBank	Asal inang/ Asal geografi
H1	586	<i>Pleosporaceae</i>	98	EF 060411	<i>Pleosporaceae</i> sp./Hawaii, USA
H5	546	<i>Cercospora nicotianae</i>	100	AF 29230	<i>Nicotiana tabacum</i> /Tennessee
H11	520	<i>Cercospora piaropi</i>	98	HQ902254.	Bunga bakung/Fujian, Cina
H16	619	<i>Guignardia mangiferae</i>	99	FJ538333.1	<i>Musa paradisiaca</i> /Thailand
H17	556	<i>Geomyces pannorum</i>	95	GU222395	<i>Morinda citrifolia</i> / India
H18	556	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	99	HM012819	<i>Mangrove</i> /Thailand
K3	551	<i>Dothideomycete sp</i>	100	EU680557	<i>Mocis latipes</i> /Florida, USA
K10	566	<i>Alternaria longissima</i>	99	AF229489	<i>Alternaria</i> sp./California, USA

PEMBAHASAN

Endofit telah berhasil diisolasi dari berbagai spesies tanaman, diantaranya dari

tanaman berkayu *Podocarpaceae*, *Fagaceae*, *Winteraceae* (Gonthier *et al.* 2006; Oses *et al.* 2008), palma (Frohlich *et al.* 2000), rumput laut (Alva *et al.* 2002), juga lumut kerak (Li *et*

al. 2007). Hernawati *et al.* (2011) mengisolasi lima cendawan endofit dari tanaman cabai di Bogor. Isolat cendawan endofit lebih banyak diperoleh dari tanaman yang tidak menunjukkan gejala infeksi *Begomovirus* dibandingkan dengan tanaman yang menunjukkan gejala (data tidak ditampilkan). Delapan isolat cendawan endofit yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari tanaman cabai yang tidak menunjukkan gejala infeksi *Begomovirus* (H0, H1, H5, H11, H12, H16, H17, H18) dan 2 isolat dari tanaman yang menunjukkan gejala infeksi *Begomovirus*, yaitu daun mosaik dan menguning (K3 dan K10). Jumlah dan keragaman endofit sangat ditentukan oleh intensitas pekerjaan eksplorasi yang dilakukan. Hyde dan Soyong (2008) menyimpulkan jumlah dan keragaman endofit ditentukan oleh kemampuan dan ketersediaan waktu untuk mengisolasi endofit pada medium agar-agar; sumber asal tanaman (isolasi dari tanaman asal daerah beriklim sedang akan menghasilkan komunitas endofit berbeda dari daerah tropik atau isolasi dari jaringan tanaman yang berbeda akan menghasilkan komunitas endofit yang berbeda).

Penelitian tentang kelimpahan dan keragaman cendawan endofit memerlukan metode yang tepat terutama dalam identifikasi. Identifikasi cendawan endofit berdasarkan pada morfologi koloni dan spora yang terbentuk sering kali tidak dapat memberikan kepastian identitas suatu isolat. Hal tersebut disebabkan karena morfologi koloni cendawan endofit dapat berubah-ubah, sebagian cendawan endofit tumbuh sangat lambat dan sering kali tidak terjadi sporulasi (Hyde dan Soyong 2008). Tiga dari 5 isolat cendawan endofit yang diperoleh Hernawati *et al.* (2011) dapat diidentifikasi berdasarkan pada morfologi koloni dan spora yang terbentuk, sedangkan 2 isolat lainnya merupakan hifa steril sehingga identitasnya hanya dapat diketahui melalui teknik PCR yang dilanjutkan dengan perunutan DNA.

Amplifikasi DNA cendawan dengan teknik PCR sering kali menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4 yang akan mengamplifikasi

daerah ITS DNA ribosom (rDNA). DNA ribosom (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom (rRNA). Gen ini banyak digunakan dalam filogenetika, klasifikasi, dan identifikasi untuk cendawan karena sifat keberadaannya yang universal, struktur sekuennya yang konservatif dan terdapat dalam jumlah banyak. Amplifikasi DNA cendawan endofit asal tanaman cabai yang dilanjutkan dengan perunutan nukleotida berhasil mengidentifikasi 8 isolat cendawan endofit. Semua tergolong dalam filum *Ascomycota*, tetapi berbeda kelas yaitu *Dothideomycetes* (H1, H5, H12, H16, K3, K10), *Leotiomyces* (H17), dan *Sordariomyces* (H18). Anggota ketiga kelas cendawan tersebut telah dilaporkan sebagai patogen tanaman, endofit, dan saprobit yang hidup pada sisa-sisa tanaman atau di dalam tanah (Zabalgoitia 2008).

Identifikasi cendawan endofit menggunakan teknik PCR dan perunutan DNA memiliki kepekaan yang tinggi, cepat, dan akurat. Identitas cendawan endofit dapat diketahui hingga tingkat spesies berdasarkan pada analisis BLASTN hasil perunutan DNA. Seiring dengan perkembangan biologi molekuler, metode ini menjadi pilihan untuk mengidentifikasi, terutama bila identifikasi secara morfometri sulit untuk dilakukan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Damayanti yang membantu dalam pengambilan sampel daun cabai di Sleman, Yogyakarta dan pemurnian isolat-isolat cendawan endofit serta Sri Hendrastuti Hidayat yang menyediakan fasilitas selama pelaksanaan penelitian di Laboratorium Virologi Tumbuhan, Departemen Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor.

DAFTAR PUSTAKA

Alva P, McKenzie EHC, Pointing SB, Pena-Muralla R, Hyde KD. 2002. Do sea grasses

- harbour endophytes? *Fungal Divers Res Series*. 7:167-178.
- Arnold AE, Mejia LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N, Herre EA. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS USA*. 100(26):15649-15654. doi: 10.1073/pnas.2533483100
- Castillo CO, Chalmers KJ, Waugh R, Powell W. 1994. Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet*. 87(8):934-940. doi: 10.1007/BF00225787.
- Dingle J, McGee PA. 2003. Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* in wheat. *Mycol Res*. 107(3):310-316.
- Faeth, SH. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *Oikos*. 98(1):25-36. doi: 10.1034/j.1600-0706.2002.980103.x
- Franzluebbers AJ, Nazih N, Stuedemann JA, Fuhrmann JJ, Schomberg HH, Hartel PG. 1999. Soil carbon and nitrogen pool under low- and high- endophyte infected tall fescue. *Soil Sci AM J*. 63(6):1687-1694
- Frohlich J, Hyde KD, Petrini O. 2000. Endophytic fungi associated with palms. *Mycol Res*. 104(10):1202-1212.
- Hernawati H, Wiyono S, Santoso S. 2011. Leaf endophytic fungi of chili (*Capsicum annum*) and their role in the protection against *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae). *Biodiversitas*. 12(4):187-191.
- Hyde KD, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers*. 33:163-173.
- Istifadah N, McGee PA. 2006. Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Aus Plant Path*. 35(4):411-418. doi:./10.1071/AP06 038
- Lehtonen PT, Helander M, Siddiqui SA, Lehto K, Saikkonen K. 2006. Endophytic fungus decreases plant virus infections in meadow ryegrass (*Lolium pratense*). *Biol Lett*. 2(4):620-623. doi: 10.1098/rsbl.2006.0499.
- Li WC, Zhou J, Guo SY, Guo LD. 2007. Endophytic fungi associated with lichens in Baihua mountain of Beijing China. *Fungal Divers*. 25:69-80.
- Oses R, Valenzuela S, Freer J, Sanfuentes E, Rodriguez J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Divers*. 33:77-86.
- Rodrigues KF. 1994. The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia*. 86(3):376-385.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*. Ed ke-3. New York (US): Cold Spring Harbor Laboratory Pr.
- Suryanarayanan TS, Thirunavukkarasu N, Govindarajulu MB, Sasse F, Jansen R, Murali TS. 2009. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biol Rev*. 23(1-2):9-19. doi: 10.1016/j.fbr.2009.07.001
- Zabalgogezcoa I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish J Agric Res*. 6:138-146.