

PERBAIKAN DAYA ANTAGONIS *TRICHODERMA HARZIANUM* RIFAI TERHADAP *SEPTOBASIDIUM* Spp. MELALUI SINAR UV

Improvement of Antagonist Activity of *Trichoderma harzianum* Rifai to *Septobasidium* spp. using UV Rays

IMAN SUSWANTO*) DAN TRIS HARIS RAMADHAN

Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Untan, Pontianak

ABSTRACT

Currently velvet blight *Septobasidium* spp. is a major disease of pepper in West Kalimantan. Some control efforts have been made despite lack of satisfactory results. This study aimed to obtain mutant isolates of *Trichoderma harzianum* which can suppress velvet blight. Mutation was done by UV radiation from the UV-C lamp 15 watt, at range 3-21 minutes exposure series with an interval of 3 minutes. The research results showed that exposure to *T. harzianum* for 6-9 mins resulted in quicker life cycle of the mutant isolates and still maintain antagonistic properties against *Septobasidium* spp. UV exposure to *T. harzianum* more than 18 minutes caused disruption of mycelium growth and sporulation.

Key words : pepper, *Septobasidium* spp., *T. harzianum* mutant

PENDAHULUAN

Penyakit hawar beludru (*velvet blight*) yang disebabkan oleh *Septobasidium* spp., merupakan salah satu penyakit yang merugikan pada kebun lada masyarakat di Kalimantan Barat. Gejala penyakit berupa kerontokan bagian tanaman yang masih muda seperti cabang muda, bunga atau buah sampai tanaman hanya menyisakan cabang utama. Bagian tanaman sakit dijumpai lapisan miselium menyerupai beludru sehingga dinamakan penyakit hawar beludru. Penyakit umumnya menginfeksi tanaman dewasa produktif dan jarang ditemukan pada tanaman muda atau di pembibitan (Suswanto, 2009).

Sampai saat ini pengendalian penyakit menggunakan fungisida bubuk bordo dan bubuk kalifornia belum memperlihatkan hasil memuaskan. Pengujian *in vitro* kedua jenis fungisida tersebut memiliki daya hambat saat fase miselium primer dan sekunder. Daya hambat fungisida menurun saat cendawan membentuk hifa udara dan sporulasi (Yuniarti *et al.*, 2010).

Trichoderma spp. merupakan kelompok cendawan yang belum diketahui atau jarang

ditemukan fase seksualnya sehingga reproduksi terbatas pada produksi konidia. Banyak laporan yang menyatakan *Trichoderma* spp. memiliki potensi sebagai agens pengendali hayati. Rakasiwi *et al.* (2013) menyatakan bahwa *Trichoderma* spp. dapat diperoleh dari dalam jaringan lada dan memiliki kemampuan sebagai antagonis *Septobasidium* spp.

Eksplorasi isolat antagonis dari alam seringkali menghadapi kendala kemampuan daya antagonis yang tidak sesuai dengan keinginan. Kenyataan ini mengharuskan upaya tambahan untuk perbaikan daya antagonisme maupun keragaman isolat sehingga memperbesar peluang untuk memperoleh agens hayati yang lebih baik. Perbaikan sifat *Streptomyces viridifaciens* untuk menghasilkan antibiotik lebih tinggi berhasil dilakukan dengan induksi sinar ultraviolet (UV) berhasil ditemukan pada tahun 1976. Keberhasilan ini memicu berbagai upaya untuk memperoleh mikroorganisme yang lebih unggul dalam proses fermentasi produksi enzim, asam amino dan substansi aktif lainnya, baik dalam ukuran kecil sampai skala industri (Stanbury & Whitaker, 1984 dan Bapiraju *et al.*, 2004).

Penggunaan mutagenesis UV telah banyak dilaporkan keberhasilannya. UV sebagai agen

*) Alamat korespondensi:
Email : hayoountan@yahoo.co.id

mutagen memiliki banyak keunggulan antara lain murah, mudah dilakukan, aman dan efektif. Pengaturan radiasi yang ketat akan diperoleh karakter mutan yang dikehendaki.

Penelitian bertujuan menentukan berbagai perubahan sifat *T. harzianum* hasil penyinaran UV dan memperoleh mutans *T. harzianum* yang berguna bagi pengendali hayati *Septobasidium* spp penyebab penyakit hawar beludru pada lada.

BAHAN DAN METODE

Bahan-Bahan Penelitian. Bahan-bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah: cendawan endofit *T. harzianum*, isolat *Septobasidium* spp dan medium PDA.

Preparasi isolat *wildtype T. harzianum*. Isolat *T. harzianum* berupa cendawan endofit diperoleh dari jaringan batang lada sehat yang diambil dari kebun daerah endemik *velvet blight*. Isolat diremajakan pada media PDA sampai berumur 1 minggu setelah inkubasi (MSI). Selanjutnya dibuat suspensi konidia dengan menambahkan 10 mL akuades steril. Suspensi ditumbuhkan pada media PDA dengan metoda gores/*streak* dan diinkubasi selama 12-18 jam untuk memperoleh isolat dari spora tunggal. Isolasi monospora dilakukan dengan memindahkan satu konidia yang telah membentuk buluh ke media PDA miring.

Induksi Mutan. Mutasi menggunakan metoda Hamad *et al.* (2001). Isolat *T. harzianum* pada media PDA berumur 1 MSI dibuat suspensi dengan konsentrasi 5×10^3 mL⁻¹. Penghitungan kepadatan konidia menggunakan haemositometer. Sebanyak 10 mL suspensi konidia dalam cawan petri 9 cm ditempatkan pada jarak 20 cm dibawah lampu UV-C 15 watt dalam enkas mutasi. Selama waktu pemaparan konidia, cawan petri dalam keadaan terbuka. Pemaparan dilakukan secara berseri pada kisaran 3-21 menit dengan selang waktu 3 menit. Selanjutnya suspensi konidia sebanyak 0,5 mL dipindahkan ke media PDA dan diinkubasi dalam keadaan gelap selama 3 hari. Pengamatan berupa jumlah koloni yang muncul.

Keragaman isolat mutan. Tujuan pengujian adalah mengetahui keragaman

isolat mutan melalui uji vegetatif kompatibilitas dan morfologi hifa. Uji kompatibilitas sesuai dengan metoda Soesanto *et al.* (2013) dan Patil & Lung (2012). Reinokulasi sebanyak 4 isolat mutan dan *wildtype T. harzianum* menggunakan jarum ose pada media PDA secara berhadapan. Selanjutnya diamati kompatibilitas hifa vegetatif, proporsi miselium cendawan yang menghasilkan spora dan diameter pertumbuhan miselium pada 3 HSI.

Daya antagonis isolat mutan. Isolat *Septobasidium* spp yang digunakan merupakan koleksi dari Laboratorium Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian Untan. Pengujian bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat mutan *T. harzianum* menghambat perkembangan miselium *Septobasidium* spp. Pengamatan dilakukan pada 5 HSI dengan perhitungan daya hambat sesuai Royse & Ries (1977) seperti rumus di bawah ini:

$$PP = \frac{R1 - R2}{R1} \times 100$$

Keterangan: PP=penghambatan pertumbuhan (%), R1=pertumbuhan jejari patogen pada media tanpa agens hanyati; R2=pertumbuhan jejari patogen pada media dual kultur dengan agens hanyati

Analisis Data. Percobaan disusun berdasarkan rancangan acak lengkap. Perlakuan dalam penelitian ini berupa taraf pemaparan radiasi UV pada konidia *T. harzianum*. Perbedaan pengaruh perlakuan dianalisis dengan anova dan uji perbandingan berganda Duncan pada taraf nyata 0,05.

HASIL DAN PEMBAHASAN

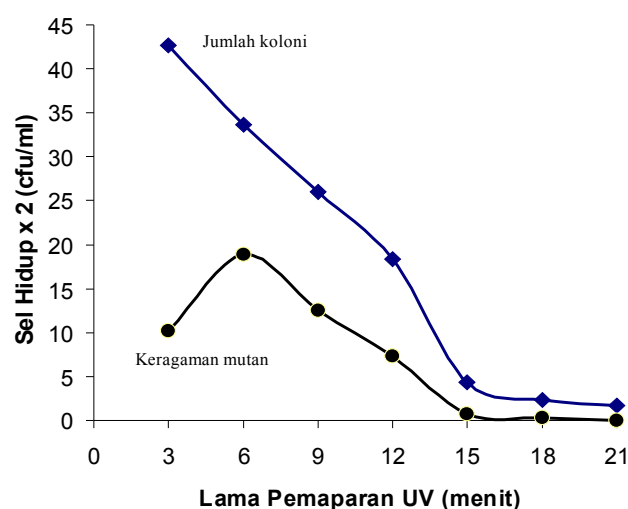
Mutan Hasil Induksi. Hasil pengamatan induksi mutan menunjukkan bahwa pola pertumbuhan mutan *T. harzianum* semakin menurun seiring dengan semakin lamanya pemaparan radiasi UV (Gambar 1). Lama waktu pemaparan 15 menit atau lebih ternyata menyebabkan kematian dan gangguan perkecambahan maupun pertumbuhan miselium cendawan. Hal ini berarti waktu pemaparan UV terhadap *T. harzianum* membutuhkan rentang waktu tertentu untuk menghasilkan mutan yang

dikehendaki tanpa menyebabkan kerusakan. Menurut Yuwono (2008), UV dengan panjang gelombang 210-310 nm akan diserap oleh materi genetik sel dan dapat menimbulkan kematian atau mutasi sel. Mekanisme pembentukan mutan disebabkan oleh terbentuknya timin dimer hasil ikatan kovalen antara dua molekul timin. Timin dimer dalam untai DNA tidak dapat terbaca oleh ribosom, sehingga akan merubah makna untai terbuka kerangka pembacaan/*open reading frame* (ORF).

Lebih lanjut Yuwono (2008) menyatakan, dampak dari perubahan ORF menyebabkan perubahan jenis asam amino yang dihasilkan dikenal dengan mutasi missense. Perubahan struktur DNA menyebabkan terhentinya proses translasi dikenal dengan mutasi nonsense. Ada kalanya perubahan DNA tidak menyebabkan perubahan produk protein dikenal dengan mutasi netral. Mutasi penyisipan dan penghilangan dapat menyebabkan perubahan *reading frame* sehingga menyebabkan perubahan pola pembacaan (*frameshift*). Dampak dari perubahan pola pembacaan dapat menghasilkan polipeptida berbeda sama sekali sehingga bersifat tidak fungsional. Kemungkinan lain adalah tidak dijumpai kodon stop dalam *reading frame* sehingga translasi suatu polipeptida sampai diluar gen.

Pada Gambar 1 juga dapat diketahui bahwa keragaman mutan *T. harzianum* akan diperoleh secara melimpah pada pemaparan

UV selama 3 - 12 menit. Pemaparan UV lebih dari 12 menit sebenarnya juga akan diperoleh mutan, akan tetapi jumlahnya terbatas. Dengan demikian berdasarkan pengamatan jumlah koloni dan keragaman mutan dilakukan dalam waktu pemaparan antara 3-12 menit. Hal ini sesuai dengan Shazia *et al.* (2011), menyatakan bahwa upaya peningkatan kualitas *T. viridae* dalam memproduksi enzim-enzim selulase dilakukan menggunakan radiasi UV pada kisaran waktu 10 menit.



Gambar 1. Jumlah koloni dan keragaman mutan yang diperoleh dari mutasi sinar UV pada beberapa tingkat pemaparan

Tabel 1. Pertumbuhan miselium dan sporulasi isolat mutan hasil radiasi UV-C pada beberapa tingkat pemaparan pada 3 HIS

Lama Pemaparan Radiasi UV (menit)	Jumlah Sampel (isolat)	Diameter miselium (cm)	Zone sporulasi koloni (%)
Kontrol	10	4,26 a	30,00 d
3	25	4,24 a	34,80 cd
6	25	4,17 ab	40,00 bc
9	20	4,04 bc	45,00 ab
12	15	3,98 c	50,67 a
15	13	3,63 d	4,62 e
18	7	2,49 e	4,28 e
21	5	2,00 f	2,00 e

Keterangan: Angka dalam satu kolom yang diikuti huruf sama menunjukkan perbedaan tidak nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 0,05.

Keragaman Isolat Mutan. Pengamatan keragaman mutan juga diketahui dari morfologi mutan yang memperlihatkan

perbedaan dengan *wildtype* seperti yang tertera pada Tabel 1. Pada penelitian ini, mutan yang secara morfologi baik dapat

diperoleh pada paparan radiasi UV antara 3-9 menit. Pertumbuhan miselium mulai memperlihatkan gangguan pada paparan 12 menit. Paparan UV selama 15, 18 dan 21 menit secara nyata menyebabkan hambatan pertumbuhan miselium. Secara umum dapat disimpulkan semakin lama paparan UV menyebabkan hambatan pertumbuhan miselium.

Pada Tabel 1 juga dapat diketahui bahwa paparan radiasi UV sampai pada batas waktu tertentu akan memacu terjadinya sporulasi. Sebaliknya, paparan lebih lanjut justru menyebabkan hambatan atau kegagalan proses sporulasi. Paparan radiasi UV antara 6-12 menit terbukti secara nyata mempercepat masa sporulasi cendawan.

Paparan UV selama 15 menit atau lebih, menyebabkan penurunan diameter miselium yang diikuti pula dengan kegagalan cendawan untuk sporulasi. Secara morfologi koloni *T. harzianum* normal memperlihatkan zone steril dan fertil yang ditunjukkan dengan munculnya konidia. Paparan UV lebih dari 15 menit, menyebabkan miselium *T. harzianum* memperlihatkan warna pucat, pertumbuhan terhambat dan gagal membentuk konidia. Dengan demikian paparan UV pada isolat cendawan endofit *T. harzianum* lebih dari 15 menit cenderung menyebabkan kematian dan kerusakan fungsi fisiologi cendawan.

Daya Antagonis Isolat Mutan. Hasil pengamatan daya antagonis mutan *T. harzianum* terhadap *Septobasidium* spp. pada Tabel 2 menunjukkan bahwa daya hambat mutan *T. harzianum* dapat bekerja sampai pada paparan UV selama 9 menit. Paparan UV selama 12 menit atau lebih justru menyebabkan penurunan atau bahkan kehilangan kemampuan mutan *T. harzianum* terhadap *Septobasidium* spp.

Hasil pengujian ini menunjukkan bahwa seri paparan radiasi UV antara 3-21 menit dengan selang 3 menit belum diperoleh agen antagonis yang memuaskan. Perbaikan sifat mutan seperti yang terlihat pada Tabel 1, hanya memperlihatkan peningkatan sporulasi. Hal ini berarti penyinaran UV berpengaruh terhadap perubahan sifat dari isolat *wilt type*, namun belum menghasilkan sifat utama yang dikehendaki berupa peningkatan kemampuan daya antagonis. Upaya perbaikan sifat mutan *T. harzianum* dapat ditempuh dengan cara mencari rentang waktu paparan UV secara

lebih sempit terutama pada rentang 6 dan 9 menit.

Tabel 2. Zone hambatan pengujian antagonisme dual kultur antara *Septobasidium* spp dengan mutan *T. harzianum* pada beberapa tingkat paparan UV

Lama Paparan Radiasi UV (menit)	Zone Hambatan <i>Septobasidium</i> spp (%)
Kontrol	57,68 ab
3	57,68 ab
6	57,92 a
9	56,61 b
12	55,20 c
15	10,26 d
18	0 e
21	0 e

Keterangan: Angka yang diikuti huruf sama menunjukkan perbedaan tidak nyata menurut uji Duncan pada taraf nyata 0,05.

Menurut Patil & Lung (2012), perbaikan kemampuan mendegradasi kitin oleh *T. harzianum* mutan dengan UV berhasil diperoleh dengan lama paparan 4-8 menit. Mutan memiliki sifat waktu sporulasi lebih cepat dan kemampuan degradasi kitin lebih kuat.

SIMPULAN

Simpulan penelitian ini adalah mutasi dengan radiasi UV untuk memperoleh kandidat agens pengendali hayati cendawan endofit *T. harzianum* terhadap *Septobasidium* spp. dilakukan dengan lama paparan 6 sampai 9 menit. Mutan *T. harzianum* memiliki sifat, siklus hidup lebih cepat dan tetap mempertahankan sifat antagonisnya terhadap *Septobasidium* spp. Paparan *T. harzianum* lebih dari 18 menit menyebabkan gangguan pertumbuhan miselium dan sporulasi. Penelitian ini belum memperoleh isolat mutan dengan kemampuan daya hambat yang lebih baik dari *T. harzianum* alami.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementerian Pendidikan Nasional yang telah membantu pendanaan penelitian ini melalui penelitian Hibah Strategis Nasional Tahun Anggaran 2013-2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Bapiraju KVVSN, Sujatha P, Ellaiah P & Ramana T. 2004. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. *African Journal of Biotechnology*. 3(11): 618-621.
- Hamad A, Haq I, Qadeer MA & Javed I. 2001. Screening of *Bacillus licheniformis* mutants for improved production of alpha-amylase. *Pak. Jour. Bot.* 33: 517-525.
- Patil AS & Lung AG. 2012. Strain improvement of *Trichoderma harzianum* by UV mutagenesis for enhancing its biocontrol potential against aflatoxigenic *Aspergillus* species. *The Experiment* 4(2): 228-242.
- Rakasiwi R, Suswanto I, Sarbino. 2013. Eksplorasi cendawan endofit sebagai antagonis terhadap patogen hawar beludru (*Septobasidium* sp.). *Jurn. Sains Mahasiswa Pertanian* 2(2): 1 – 11.
- Royse DJ, Ries SM. 1977. The influence of fungi isolated from peach twigs on the pathogenicity of *Cytosporacina*. *Phytopathol.* 63: 603-607.
- Shazia S, Bajwa R, Shafique S. 2011. Strain improvement in *Trichoderma viride* through mutation for overexpression of cellulase and characterization of mutants using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*. 10(84): 19590-19597.
- Soesanto L, Mugiastuti E, Rahayuniati RF, Dewi RS. 2013. Uji kesesuaian empat isolat *Trichoderma* spp. dan daya hambat in vitro terhadap beberapa patogen tanaman. *J. Hama Penyakit Tumbuhan Tropika* 13(2): 117–123.
- Suswanto I. 2009. Kajian *Septobasidium* spp sebagai penyebab penyakit busuk cabang lada (*Piper nigrum* L.). *Buletin Agro Industri* 26: 14-25.
- Yuniarti, Suswanto I, Syahputra E. 2010. Kajian efektifitas bubuk bordo dan bubuk kalifornia untuk pengendalian hawar beludru *septobasidium*. Skripsi S1, Untan Pontianak. Unpublished.
- Yuwono T. 2008. *Bioteknologi Pertanian*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 284 p.