# Uji Potensi dan Identifikasi Berdasarkan Sekuen ITS Kapang Antagonis Pengendali Kapang Patogen Tanaman Apel di Perkebunan Apel Gabes

**Lely Shohihati[1)*], Suharjono[1)]**

**[1)]Mikrobiologi, Biologi, Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Brawijaya, Jl. Veteran**

**Alamat Korespondensi : Lely Shohihati lelybio10@gmail.co.id**

## ABSTRAK

**Apel (*Malus sylvestris* Mill) sebagai ciri khas Kota Batu produksinya mengalami penurunan yang disebabkan oleh serangan kapang patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari potensi dan identifikasi isolat kapang antagonis dalam menghambat pertumbuhan kapang patogen tanaman apel dari perkebunan apel di Gabes Kota Batu Jawa Timur. Tahapan penelitian meliputi isolasi kapang antagonis dan kapang patogen tanaman apel, skrining kapang antagonis, uji antagonis dengan metode *dual culture* berdasarkan Rancangan Acak Kelompok, dan identifikasi kapang antagonis secara molekular. Hasil skrining didapatkan kapang antagonis isolat OK14, OK23, FO1, dan FO14 memiliki potensi penghambatan secara berurutan 38,0; 52,4; 50,0; dan 49,7 % terhadap kapang patogen AN5.2. Isolat OK14, OK23, dan FO13 memiliki potensi penghambatan secara berurutan 39,3; 41,8; dan 83,2 % terhadap kapang patogen AN3.2. Isolat OK23 merupakan antagonis potensial terhadap kapang patogen AN5.2 diidentifikasi sebagai *Aspergillus fumigatus*.**

Kata kunci: antagonis, *dual culture*, kapang, molekular, patogen.

## ABSTRACT

**Apple (*Malus sylvestris* Mill) as character of Batu City its production decreased due to pathogenic mold infection. The objective of this research is to study potency and identify the mold antagonist isolates to inhibit growth of apple plant pathogenic mold from apple orchard in Gabes Batu City East Java. Steps of the research include isolation of antagonist and apple plant pathogenic mold, screening antagonist mold, antagonist assay with dual culture method based on Randomized Block Design, and identifying antagonistic mold moleculary. The result showed that antagonist mold isolates OK14, OK23, FO1, and FO14 have inhibiting potency against pathogenic mold AN5.2 respectively 38.0; 52.4; 50.0; and 49.7 %. Isolates OK14, OK23, and FO13 have inhibiting potency against pathogenic mold AN3.2 respectively 39.3; 41.8; and 83.2 %. Isolate OK23 is potential antagonist against pathogenic mold AN5.2 identified as *Aspergillus fumigatus*.**

Key words: antagonist, dual culture, molecular, mold, pathogen.

## PENDAHULUAN

Tanaman apel (*Malus sylvestris* Mill) menjadi salah satu ciri khas Daerah Malang Raya khususnya Kota Batu dan berkembang pesat pada tahun 1960 [1]. Seiring dengan bertambahnya usia dan munculnya organisme pengganggu tanaman menyebabkan produktivitasnya menurun dari tahun ke tahun. Jumlah tanaman apel produktif sebanyak 2.603.086 pohon (tahun 2004) mengalami penurunan menjadi 1.595.772 pohon (tahun 2008) [2]. Patogen sebagai organisme pengganggu tanaman dapat menyebabkan penyakit tanaman apel seperti kanker batang (*Botryosphaeria ribis*), bercak Marssonina (*Marssonina coronaria*), mati ujung (bakteri) dan busuk buah (*Gloeosporium fructigenum*) dikaji dari Kusuma Agrowisata Batu Malang. [3], *Pythium splendens* yang menyerang tanaman apel di Kota Batu [4].

Penggunaan pestisida untuk melawan penyakit yang menyerang tanaman apel menyebabkan masalah seperti hilangnya musuh alami sebagai organisme non target dan menurunkan kualitas tanah. Oleh sebab itu, penggunannya perlu dikurangi [5].

Adanya musuh alami perlu dikaji potensinya sebagai pengendali alami hama dan penyakit tanaman apel. Kapang antagonis dapat digunakan sebagai agen pengendali hayati kapang pascapanen penyebab busuk buah apel, *grey* dan *blue mold* [6]. Penggunaan mikroorganisme antagonis menjadi alternatif fungisida untuk mengontol

kudis apel (*apple scab*) [7]. Enam spesies kapang (*Trichoderma* sp.1, *Trichoderma* sp.4, *Trichoderma* sp.6, *Aspergillus* sp.2, *Aspergillus* sp.3 dan *Penicillium* sp.1) ditemukan antagonis terhadap *Phythophtora* pada tanaman apel [8].

Kapang antagonis efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen penyebab penyakit beberapa tanaman tidak terkecuali tanaman apel. Diharapkan melalui penelitian uji potensi dan identifikasi berdasarkan sekuen ITS kapang antagonis yang potensial dari perkebunan apel organik Gabes dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan kapang patogen yang meyebabkan penyakit tanaman apel.

## METODE PENELITIAN

**Waktu dan Tempat Penelitian.** Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2013-Agustus 2014 di Laboratorium Mikrobiologi dan Biologi Sel dan Molekular, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya. Sampel diperoleh dari perkebunan apel organik Daerah Gabes, Dusun Junggo yang berada di kaki Gunung Arjuno, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu.

**Isolasi, Skrining, dan Uji Antagonis.** Tanah diisolasi dengan teknik pengenceran berseri atau *serial dilution agar plating* sampai $10^{-5}$ [9]. Koloni kandidat kapang antagonis dan kapang patogen ditumbuhkan pada cawan petri berisi media PDA dengan jarak 30 mm. Inkubasi pada suhu 30 °C (dengan AN5.2) dan suhu ruang (dengan AN3.2). Skrining dilakukan inkubasi selama 3 hari sedangkan uji antagonis dilakukan selama 9 hari inkubasi untuk melihat interaksinya. Koloni kapang antagonis hasil skrining terlebih dahulu dilakukan monospora untuk uji antagonis. Kapang patogen yang digunakan hasil uji patogenesitas pada tanaman apel [10].

**Identifikasi Kapang Antagonis Berdasarkan Sekuen ITS.** Kapang antagonis diisolasi DNA nya menggunakan modifikasi metode Doyle dan Doyle [11]. Sampel DNA yang didapat diuji kualitatif menggunakan elektroforesis dan kuantitatif menggunakan spektrofotometri supaya diketahui konsentrasi DNA sampelnya. Kemudian dilakukan amplifikasi sekuen DNA menggunakan primer ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAA CAAGG3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATT GATATGC3') [12] dan reaksi amplifikasi PCR sebanyak 35 siklus (Tabel 1) [13]. Hasil PCR di*running* menggunakan gel agarosa 1,5 % [14] menggunakan DNA marker (*GeneRuler*™ DNA *LadderMix* 100). Purifikasi dan sekuensing DNA dilakukan di First Base, Malaysia. Hasil sekuensing dianalisis pada *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) dengan program MEGA ver. 5.03.

**Tabel 1**. Kondisi reaksi amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan primer ITS4/ITS5

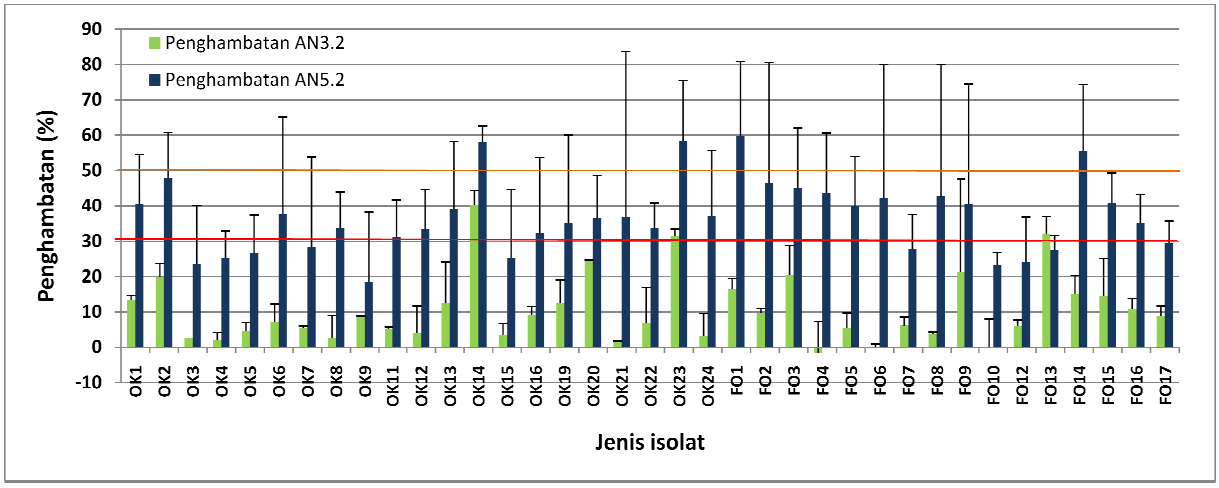
| Reaksi | Suhu (°C) | Waktu (menit) | |
|---|---|---|---|
| Denaturasi awal | 95 | 10 | |
| Denaturasi | 94 | 0,25 | 35 siklus |
| *Annealing* | 55 | 0,5 | |
| Ektensi | 72 | 0,25 | |
| Ektensi akhir | 72 | 7 | |

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Hasil Skrining Kapang Antagonis.** Dari 37 isolat hasil isolasi dari perkebunan apel organik Gabes setelah diskrining didapatkan lima kapang antagonis yaitu OK23, OK14, FO1, FO13, dan FO14.

Isolat OK23, OK14, FO1, dan FO14 mampu menghambat kapang patogen AN5.2 yang ditunjukkan dengan garis warna oranye (Gambar 1). Isolat OK23, OK14, dan FO13 mampu menghambat kapang patogen AN3.2 yang ditunjukkan dengan garis warna merah (Gambar 1).

Hasil skrining terhadap kapang patogen AN5.2 dan AN3.2 didapatkan kapang antagonis yang spesifik. Kapang antagonis FO1 dan FO14 spesifik hanya dapat menghambat kapang patogen AN5.2. Kapang antagonis FO13 spesifik menghambat kapang patogen AN3.2, sedangkan OK23 dan OK14 menghambat kedua kapang patogen baik AN5.2 ataupun AN3.2.




**Gambar 1**. Skrining kapang antagonis dalam menghambat pertumbuhan kapang patogen AN5.2 dan AN3.2

**Spesies Kapang yang Efektif Menghambat Pertumbuhan Kapang Patogen.** Lima kapang antagonis memiliki kemampuan yang berbeda selama waktu inkubasi (tingkat efektivitas berbeda baik terhadap kapang patogen AN5.2 atau AN3.2), terjadi peningkatan setiap harinya. Keberhasilan suatu pengendalian hayati dengan menggunakan kapang antagonis yang dicampur dalam tanah dipengaruhi oleh lamanya waktu kontak antara antagonis dan patogen [15].

Kapang antagonis OK14, OK23, FO14, dan FO1 memiliki potensi dalam menghambat kapang patogen AN5.2 dengan persentase masing-masing 38 %, 52,4 %, 50 %, dan 49,7 %. Sementara itu, kapang antagonis OK14, OK23, dan FO13 memiliki potensi dalam menghambat kapang patogen AN3.2 dengan persentase masing-masing 39,3 %, 41,8 %, dan 83,2 %.

Kapang antagonis isolat OK23 yang memiliki potensi tinggi dalam menghambat kapang patogen AN5.2. Isolat OK23 setelah diidentifikasi berdasarkan sekuen ITS diketahui sebagai *Aspergillus fumigatus*. *Aspergillus fumigatus* menurut Adebola dan Amadi yang melakukan uji *in vitro* memiliki kemampuan antagonis terhadap *P. palmivora* pada tanaman kakao sebesar 54 % [16]. Spesies ini di alam berfungsi sebagai jamur saprofit yang banyak ditemukan dalam tanah dan kompos serta memiliki peran penting dalam siklus karbon dan nitrogen [17], dan diketahui juga menjadi penyebab penyakit pada manusia dan hewan seperti aspergillosis [18].

## KESIMPULAN

Isolat kapang antagonis OK14, OK23, FO1, dan FO14 memiliki potensi menghambat pertumbuhan kapang patogen AN5.2 dengan persentase penghambatan 38 %, 52,4 %, 50 %, dan 49,7 %; sedangkan kapang patogen AN3.2 dapat dihambat oleh isolat kapang OK14, OK23, dan FO13 dengan persentase 39,3 %, 41,8 %, dan 83,2 %. Kapang antagonis OK23 yang paling tinggi dalam menghambat kapang patogen AN5.2 merupakan *Aspergillus fumigates*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis kepada Allah SWT atas selesainya jurnal, dosen pembimbing dan penguji atas bimbingan dan saran-saran yang diberikan. Bapak Arif Budiono selaku pemilik perkebunan, Laboran, peneliti dan teman-teman peneliti di Laboratorium mikrobiologi atas bantuan dan kerjasamanya.

## DAFTAR PUSTAKA

[1] Ruminta dan Handoko. 2010. **Dampak Perubahan Iklim pada Produkis Apel Batu**. Universitas Padjadjaran. Bandung.

[2] Dinas Pertanian Kota Batu. 2008. **Laporan Statistik Pertanian Kota Batu**. Tahun 2008. Batu Malang.

[3] Akbar, F. 2011. **Inventarisasi Penyakit yang Disebabkan Jamur pada Apel, Jeruk, Stroberi dan Jambu Biji di Kusuma Agrowisata Batu Malang**. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang.

[4] Lestari, F. W., Suharjono dan E. L. Arumingtyas. 2013. **Phylogenetic Identification of Pathogenic Fungi from Apple in Batu City, Malang, Indonesia**. *Advances in Microbiology*, 3:69-75.

[5] Pramono dan E. Siswanto. 2007. **Budidaya Apel Organik. Temu Pakar Pertanian Organik Buah-Buahan**. Bukittinggi, Sumatera Barat.

[6] Jones, R. W dan D. Prusky. 2002. **Expression of an Antifungal Peptide in Saccharomyces: A New Approach for Biological Control of the Postharvest Disease Caused by Colletotrichum coccodes**. *Phytopathology*, 92:33-37.

[7] Kohl, J., B. H. de Haas dan W. M. L. Molhoek. 2006. **New Approaches in Biological Control of Apple Scab. Selection of Antagonists Suppressing Conidia Production of *Venturia inaequalis***. *Proceeding from European Joint Organic Congress*, 30-31 May. Odense, Denmark.

[8] Nugrahani, M., Suharjono dan O. Endarto. 2012. **Eksplorasi Kapang Antagonis Terhadap *Phytophthora* spp. Patogen pada Tanaman Apel**. *Natural B*, 1(3).

[9] Apinis, A. E. 1963. **Occurrence of Thermophilous Micro Fungi in Certain Alluvial Soils Near Nottingham Nova Hedwigia, Zeitschr**. *Kryptogamenk*. 5:57-78.

[10] Isnain, I. R dan Suharjono. 2014. **Identifikasi Berdasarkan Sekuen ITS Kapang Patogen Batang Tanaman Apel var. Anna (*Malus sylventris* (L.) Mill.) dari Lahan Perkebunan Organik dan Anorganik Kota Batu**. Universitas Brawijaya. Malang. Skripsi.

[11] Doyle, J. J and J. L. Doyle. 1990. **Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue**. *Focus*, 12:13-15.

[12] White, T. J., T. Bruns., S. Lee., dan J. Taylor. 1990. **Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics**. Dalam: Innis, M. A., D. H. Gelfand., J. J. Sninsky., dan T. J. White, Eds. ***PCR Protocols*: *A Guide to Methods and Applications***. Academic Press. San Diego.

[13] Schoch, C. L., K. A. Selfert., S. Huhndorf., V. Robert., J. L. Spouge., dan C. A. Levesque. 2011. **Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 109(16):1-6.

[14] Suharjono., A. P. W. Marhendra., A. Triwiratno., S. Wuryantini dan L. O. Rahayu. 2010. **Sistematik Filogenetik Isolat-Isolat Kapang Indigenous Indonesia sebagai Entomopatogen Kutu Sisik (*Lepidoshapes beckii* Newman) Hama Tanaman Jeruk**. *Biota*, 15(2):231-236.

[15] Hardaningsih, S. 1995. **Efektivitas *Gliocladium roseum* untuk Mengendalikan Penyakit Terbawa Benih pada Tanaman Kacang-Kacangan**. *Prosiding Kongres Nasional XII dan Seminar Nasional PFI*, Mataram. 185-188.

[16] Adebola, M. O dan J. E. Amadi. 2010. **Screening three Aspergillus species for antagonistic activities against the cocoa black pod organism *(Phytophthora palmivora)***. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 1(3):362-365.

[17] Haeppi, Y. 2012. **Analisis Mekanisme Penghambatan Secara Fisik Pertumbuhan *Rhizoctonia Solani* oleh *Aspergillus Fumigatus* dan *Aspergillus Niger* Secara *In Vitro***. Universitas Muhammadiyah Purwokerto. Purwokerto. Skripsi.

[18] Ellis, D., S. davis., H. Alexiou., R. Handke., dan R. Bartley. 2007. **Descriptions of medical fungi**. Second edition. Mycology unit women's and children's hospital. Australia.