

Kemampuan *Gliocladium* sp. Akk-1 dalam Memproduksi Antifungi Pada Beberapa Jenis Media Fermentasi dan Uji Aktivitasnya Terhadap *Rhizoctonia solani* dan *Pythium* sp.

*(Capability *Gliocladium* sp. Akk-1 of Antifungal product in various fermentation medium and aktivitas test of *Rhizoctonia solani* dan *Pythium* sp)*

Oleh

Yusmanidar Arifin ¹⁾, Nuraeni Ekowati ²⁾, dan Purnomowati ²⁾

1) Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Tamansiswa Padang

2) Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto Jawa Tengah

ABSTRACT

The aim of this research is to find out the interaction between incubation period and type of fermentation medium wick showing the highest antifungal activity.

The method was experimental with a Completely Randomized Design (CRD) constructed in factorial pattern. The experiment had two factors i.e. : type of fermentation medium consisted of three level i.e. : Potato Dextrose Broth (PDB), Gliotoxin Fermentation Medium (GFM) and Raulin Thom Medium (RTM). The incubation period consisted of three level i.e. : 6, 12 and 18 days. Ampunt of treatment combination were $3 \times 3 = 9$, showing an inter-factor level combination. Every treatmant had 3 replicates. The overall treatment consisted of 27 treatment units for *R. solani* and 27 treatment units for *Pythium* sp. The observed variables were percentage on the antifungal compounds towards the pathogen's growth, biomass dry weight of *Gliocladium* sp. Akk-1 and medium pH before and after fermentation.

The result showed that *Gliocladium* sp. Akk-1 was able to produce antifungal compounds in every treatmant. The ability shown by inhibition activity toward the pathogens *R. solani* and *Pythium* sp. The highest inhibition activity shown by the interaction treatment between RTM and 6-day incubation period i.e. : 55.70% towards *Pythium* sp. It can be conclude thet RTM is more appropriate for *Gliocladium* sp. Akk-1 to produce antifungal compounds with havesting period of 6-12 days.

Key Words: antifungal, and fermentation medium

PENDAHULUAN

Pengendalian penyakit tanaman yang disebabkan oleh ptogen terbawa tanah sampai saat ini masih menjadi masalah, karena jenis patogen tersebut dapat membentuk struktur dorman dan terlindungi oleh partikel-partikel tanah. *Rhizobium solani* dan *Pythium* sp. merupakan jenis-jenis patogen terbawa

tanah yang mempunyai arti ekonomi penting karena kedua cendawan ini dapat menyebabkan penyakit “damping off” pada berbagai jenis tanaman (Howell dan Stipanovic, 1994). Selain penyebab “damping off”, *R. Solani* juga dapat menyerang tanaman sampai ketinggian generatif, misalnya pada tanaman jagung cendawan tersebut dapat menyerang

sampai ke buah sehingga buah menjadi busuk sebelum panen (Ekowati, 1992).

Penggunaan fungisida dalam mengendalikan kedua jenis cendawan ini tidak berhasil karena *R. solani* mampu membentuk struktur dorman yaitu Sklerotium, sedangkan *Pythium* sp. mampu membentuk oospora yang juga merupakan struktur istirahat. Kedua propagul ini mempunyai dinding yang tebal sehingga fungisida tidak dapat mencapai bagian dalam dari struktur tersebut.

Mengingat kedua cendawan patogen tanaman ini habitatnya di tanah, maka sklerotium dan oospora sebagian besar berada di tanah dan ini jugalah yang menyebabkan kurang berhasilnya penggunaan fungisida karena fungisida yang diaplikasikan ke tanah tidak dapat mengenai sasaran tetapi banyak terjebak oleh partikel-partikel tanah. Dengan demikian perlu dilakukan teknik pengendalian yang lebih efektif.

Cendawan merupakan mikroorganisme yang mempunyai sifat antagonisme yang kuat terhadap cendawan patogen tanaman karena dapat memparasiti sesama cendawan (mycoparasitisme) dan dapat menghasilkan senyawa antifungi maupun antibakteri. Dengan melihat sifat interaksi antara mikroorganisme di tanah, maka antagonisme dapat dimanfaatkan untuk pengendalian patogen terbawa tanah (Carlile dan Watkinson, 1994, Fokkema, 1996)

Salah satu cendawan yang telah diketahui potensial sebagai cendawan antagonis (agen biokontrol) adalah *Gliocladium virens*, karena cendawan ini mampu menghasilkan berbagai senyawa antibiotik dan enzim yang dapat mendegradasi dinding sel patogen (Howell et al., 1993, Howell dan Stipanovic, 1983, 1995). Disamping sebagai mikoparasit, *Gliocladium* juga mampu menghasilkan protein ekstraselular yang dapat merusak dinding hifa patogen (Van Tilburg dan

Thomas, 1992). Ekowati dkk. (2000) menemukan isolat lokal *Gliocladium* sp isolat Akk-1 dari perkebunan kakao Ajibarang, yang mampu menghasilkan senyawa antifungi penghambat pertumbuhan *Phytophthora palmivora* penyebab busuk buah kakao. Isolat *Gliocladium* tersebut merupakan hasil seleksi dari beberapa isolat yang diperoleh

Mengingat beragamnya jenis cendawan patogentanaman di tanah, maka perlu dilakukan pengujian kemampuan *Gliocladium* sp. isolat Akk-1 terhadap beberapa cendawan patogen lainnya diantaranya *R. solani* dan *Pythium* sp. *Pythium* merupakan cendawan tingkat rendah yang mempunyai susunan dinding sel terdiri atas B-glukan dan sedikit selulosa, sedangkan *R. solani* merupakan cendawan tingkat tinggi yang mempunyai susunan dinding sel terdiri atas B-glukan dan khitin. Dengan adanya perbedaan tersebut tentu perlu dilakukan pengujian kemampuan senyawa anti fungi *Gliocladium* sp. isolat Akk-1 dalam menekan pertumbuhan kedua cendawan patogen tersebut.

Ghiselberti dan Rowland (1993) menyatakan bahwa senyawa antifungi merupakan metabolit sekunder yang akan diproduksi oleh cendawan dalam jumlah yang sangat kecil dan tidak dapat diproduksi selama fase pertumbuhan cepat (tropofase) tetapi akan diproduksi selama tahap stasioner (idiofase). Penentuan dicapainya tahap idiofase sangat penting untuk mendapatkan senyawa antifungi dari *Gliocladium* sp. senyawa antifungi juga akan diproduksi jika nutrisi dalam media sesuai (cocok). Untuk mendapatkan senyawa antifungi dengan aktivitas yang tinggi perlu adanya interaksi antara waktu inkubasi dan jenis media fermentasi dengan kandungan nutrisi yang berbeda

Berdasarkan hasil penelitian terhadap *Gliocladium virens* didapatkan bahwa senyawa antifungi sudah bisa

dihasilkan setelah diinkubasi selama 6 hari, dari penelitian yang lain menyatakan bahwa semakin lama waktu inkubasi maka semakin banyak senyawa antifungi yang dihasilkan dan akan berhenti pada batas waktu tertentu. Oleh karena itu percobaan ini mencoba masa inkubasi yang dipakai 6 hari, 12 hari dan 18 hari yang diiteraksikan dengan 3 jenis medium yang berbeda yaitu Potato Dextrosa Broth (PDB), Gliotoxin Fermentation Medium (GFM) dan Raulin-Thom Medium (RTM). Ketiga jenis medium ini mempunyai kandungan nutrisi yang berbeda sehingga memungkinkan waktu inkubasi yang dibutuhkan oleh cendawan untuk menghasilkan senyawa antifungi juga berbeda.

Percobaan ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh interaksi antara lamanya waktu inkubasi dan jenis media fermentasi yang berbeda terhadap aktivitas senyawa antifungi *Gliocladium* sp. Akk-1, serta menentukan jenis media yang terbaik untuk mengkulturkan *Gliocladium* sp. Akk-1, dan waktu inkubasi yang tepat untuk menghasilkan senyawa antifungi dengan aktivitas tertinggi.

METODE PENELITIAN

Penelitian telah dilakukan selama 6 bulan mulai Desember 2000 sampai dengan Mei 2001, bertempat di laboratorium Mikologi, Fakultas Biologi Unsoed Purwokerto. Media yang dipakai dalam penelitian ini adalah PDA, PDB, GFM, RTM, CMA serta biakan murni *Gliocladium* sp. Akk-1, *R. solani*, *Pythium* sp dan bahan-bahan lainnya seperti alkohol, spiritus, formalin, kertas cakram, aluminium foil. Alat yang digunakan mencakup tabung reaksi, cawan petri, gelas piala, erlemeyer, jarum inokulasi, pelubang gabus, laminar air flow, autoclave, lampu spiritus, corong pemisah, labu buchner, pompa vakum, hot plate, rotari evaporator, mikropipet dan lain-lain.

Percobaan dengan metode eksperimental dengan rancangan acak lengkap yang disusun dalam pola faktorial, faktor pertama yaitu jenis media fermentasi dengan 3 taraf yaitu m1 = PDB, m2 = RTM, m3 = GFM. Faktor kedua adalah waktu inkubasi yang terdiri dari w1 = waktu inkubasi 6 hari, w2 = waktu inkubasi 12 hari, w3 = waktu inkubasi 18 hari. Kombinasi perlakuan yang dicobakan ada $3 \times 3 = 9$ macam perlakuan, untuk masing-masing perlakuan diulang 3 kali, jadi seluruhnya terdiri dari 27 unit percobaan untuk jenis *R. solani* dan 27 unit percobaan untuk patogen *Pythium* sp.

Isolat *Gliocladium* sp Akk-1 terlebih dahulu diremajakan dalam medium PDA. Koloni cendawan yang tumbuh dipotong dengan bor gabus diameter 5 mm di inokulasikan kedalam media tanam PDB, GFM dan RTM yang telah disiapkan dalam erlemeyer, sebanyak 4 potong untuk masing-masing erlemeyer, lalu di inkubasi selama 6, 12 dan 18 hari pada shaker dengan kecepatan pengocokan 100 rpm pada suhu kamar sesuai perlakuan.

Setelah kultur berumur 6 hari lalu dipanen dengan cara menyaring dengan kertas saring Whatman no. 41, menggunakan corong dan labu Buchman, supaya penyaringan berjalan cepat digunakan alat bantu pompa vakum. Biomasa yang di peroleh dikeringkan dalam inkubator pada suhu 50 °C selama 24 jam, kemudian di timbang. Filtrat dari ekstraksi dengan mengadopsi metode Sudirman et. al. (1992) sebagai berikut: filtrat yang diperoleh diekstraksi tiga kali berturut-turut dengan kloroform (1/10 bg).

Untuk memperoleh ekstrak kasar antifungi dilakukan penguapan chloroform menggunakan “rotari evaporator” pada suhu 50°C selanjutnya ekstrak dilarutkan lagi dalam Cloroform (2 ml) dan disimpan pada suhu 5°C sampai digunakan,

perlakuan yang sama juga dilakukan pada inkubasi 12 dan 18 hari.

Uji aktifitas antifungi terhadap *R. solani* dan *Pythium* sp. dilakukan dalam cawan petri dengan meneteskan konsentrat senyawa antifungi di atas kertas cakram diameter 13 mm dari kertas Whatman steril sebanyak 50 nl dengan menggunakan mikropipet. Kertas cakram yang menyerap senyawa antifungi terlebih dahulu diuapkan, kemudian diletakkan dalam cawan petri berisi 10 ml media PDA steril berpasangan dengan potongan inokulan cendawan patogen berdiameter 5 mm dengan jarak antar keduanya 4 cm. Pengamatan dilakukan setelah di inkubasi selama 3 hari dengan mengukur daya hambat senyawa antifungi terhadap *R. solani* dan *Pythium* sp. data di nyatakan dalam persen yang diperoleh dengan menghitung persentase penghambatan memakai rumus Fokkena (1973 dalam Shidmore, 1976) data yang diperoleh dianalisis dengan uji F, jika berbeda nyata dilanjutkan dengan uji BNJ.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat diketahui bahwa cendawan *Gliocladium* sp. Akk-1 dapat tumbuh baik pada ketiga media yang digunakan dan mampu

memproduksi senyawa antifungi, walaupun dengan aktivitas berbeda. Senyawa antifungi yang dihasilkan mampu menghambat pertumbuhan cendawan pantogen yaitu *Rhizoctonia solani* sebesar 42,307 – 57,977 % dan *Pythium* sp sebesar 16,267 – 55,700 %. Data yang diperoleh tersebut setelah dianalisis dengan analisis sidik ragam menunjukkan bahwa untuk pantogen *R. solani*, perlakuan interaksi dan jenis media berpengaruh nyata, sedangkan faktor tunggal untuk waktu lama waktu inkubasi berpengaruh sangat nyata dan jenis media berpengaruh sangat nyata.

Adanya pengaruh yang nyata pada perlakuan interaksi menunjukkan bahwa produksi senyawa antifungi tersebut dipengaruhi oleh kedua faktor dan saling mendukung antara faktor media yang digunakan dan lama waktu inkubasinya. Cendawan yang ditumbuhkan pada media dengan kandungan nutrisi yang berbeda ternyata menunjukkan kecepatan pertumbuhan yang berbeda, demikian pula dengan kemampuannya dalam memproduksi metabolit sekundernya seperti senyawa antifungi akan berbeda pula. Untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang dicobakan, dilakukan uji beda nyata jujur yang disajikan pada

Tabel 1. Uji aktivitas senyawa antifungi *Gliocladium* spp. Akk-1 terhadap *R. solani* (%)

No.	Perlakuan	Persentase Penghambatan
1	M1W1	45,45 cde
2	M1W2	45,06 de
3	M1W3	42,31 e
4	M2W1	57,98 a
5	M2W2	55,66 ab
6	M2W3	44,34 de
7	M3W1	50,90 bc
8	M3W2	56,75 a
9	M3W3	48,63 cd

Keterangan : angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf kesalahan 5%. M1=PDB, M2=RTM, M3=GFM, W1=6 hari, W2=12 hari, W3=18 hari.

Dari uji beda nyata jujur dapat diketahui bahwa ada perbedaan persentase penghambatan pada perlakuan yang berbeda dan ada beberapa perlakuan yang tidak berbeda nyata. Persentase penghambatan tertinggi dicapai pada perlakuan M2W1 (media RTM dengan waktu inkubasi 6 hari) sebesar 57,98%, M2W2 (media RTM dengan waktu inkubasi 12 hari) sebesar 55,66%, dan M3W2 (media GFM dengan waktu inkubasi 12 hari) sebesar 56,75%. Berdasarkan uji BNJ ketiga perlakuan tersebut tidak menunjukkan perbedaan nyata.

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa media TRTM (Raulin Thom Medium) merupakan media yang paling baik digunakan untuk memproduksi senyawa antifungi karena pada media tersebut *Gliocladium* sp Akk-1 sudah dapat memproduksi senyawa antifungi pada waktu inkubasi 6 hari yang ditunjukkan dengan aktivitas hambatan tertinggi. Pada media GFM (Gliotoxin Fermentation Medium) aktivitas hambatan tertinggi diperoleh pada inkubasi 12 hari.

Dari data keseluruhan yang diperoleh dapat diketahui bahwa *Gliocladium* sp Akk-1 sudah mampu memproduksi senyawa antifungi pada ketiga media yang dicobakan setelah diinkubasi selama 6 hari. Pada media

PDB, aktivitas antifungi tidak berbeda nyata untuk lama waktu inkubasi 6, 12, dan 18 hari, hal ini didukung oleh bobot biomassa yang sudah mencapai maksimum pada umur 6 hari (biomassa berturut-turut adalah 0,67 gram, 0,61 gram, 0,61 gram). Dengan demikian dapat dikatakan bahwa pada umur 6 hari pada media PDB cendawan sudah dapat mencapai fase stationer dan senyawa antifungi tetap diproduksi selama sampai masa inkubasi 18 hari.

Pada media RTM *Gliocladium* sp Akk-1 menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan dengan media PDB dan GFM. Hal ini dapat dilihat dari bobot biomassa yang diperoleh selama masa inkubasi 6, 12, dan 18 hari berturut-turut untuk RTM: 0,74 gram, 1,30 gram, 1,39 gram dan GFM: 0,35 gram, 0,555 gram, 0,69 gram. Tingginya bobot biomassa cendawan pada media RTM ternyata sangat mendukung untuk produksi senyawa antifungi, sehingga aktivitasnya menjadi tinggi. Menurut Howell, *et, al.*, (1993), Howell, *et, al.*, (2000) untuk mendapatkan metabolit skunder dari suatu cendawan maka cendawan tersebut harus ditumbuhkan pada media yang kaya nutrisi dan yang sangat penting media harus mempunyai kandungan nutrisi yang seimbang.

Tabel 2. Uji aktivitas senyawa antifungi *Gliocladium* spp. Akk-1 terhadap *Pythium* sp. (%).

No.	Perlakuan	Persentase Penghambatan
1	M1W1	16,27 c
2	M1W2	23,77 bc
3	M1W3	35,07 abc
4	M2W1	31,37 abc
5	M2W2	55,70 a
6	M2W3	37,97 abc
7	M3W1	22,37 bc
8	M3W2	44,77 ab
9	M3W3	42,37 ab

Keterangan: angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbedanya berdasarkan uji BNJ pada taraf kesalahan 5%. M1=PDB, M2=RTM, M3=GFM, W1=6 hari, W2=12 hari, W3=18 hari.

Kesesuaian jenis media yang digunakan akan berbeda untuk masing-masing spesies cendawan, dan hal ini juga sangat tergantung pada habitat alaminya.

Media RTM mempunyai kelebihan dibandingkan media PB dan GFM karena pada media RTM kandungan mineralnya lebih lengkap. Media GFM juga mengandung beberapa mineral walaupun tidak selengkap RTM. Penambahan mineral yang tepat pada media akan meningkatkan metabolisme sel sehingga produksi metabolit sekundernya juga meningkat. Dari penelitian ini juga dapat diketahui bahwa sumber karbon dan nitrogen yang tinggi dan seimbang akan memacu diproduksinya senyawa antifungi.

Uji aktivitas senyawa antifungi terhadap pantogen *Pythium* sp. setelah dianalisis dengan analisa sidik ragam menunjukkan perbedaan yang nyata sehingga dilanjutkan dengan uji BNJ disajikan pada tabel 2.

Berdasarkan uji BNJ dapat diketahui bahwa aktivitas senyawa antifungi tertinggi diperoleh pada perlakuan M2W2 (media RTM dengan waktu inkubasi 12 hari) dan tidak berbeda nyata dengan perlakuan M2W3, M2W1, M3W2, M3W3 dan M1W3.

Fermentasi yang dilakukan pada media RTM menunjukkan hasil pembentukan senyawa antifungi yang lebih cepat dibandingkan dengan media yang lain karena pada waktu lama waktu inkubasi 6 hari, senyawa antifungi yang diproduksi sudah menunjukkan aktivitas yang tinggi dan tidak berbeda nyata dengan lama waktu inkubasi 12 dan 18 hari. Sedangkan pada media PDB, senyawa antifungi yang diproduksi, baru menunjukkan aktivitas yang tinggi setelah *Gliocladium* sp Akk-1 diinkubasi selama 18 hari, dan pada media GFM aktivitas tertinggi adalah pada waktu inkubasi 12 dan 18 hari.

Aktivitas yang tinggi pada media RTM juga didukung oleh pertumbuhan miselium yang baik dan menunjukkan bobot biomassa yang tinggi. Pada media RTM dan GFM *Gliocladium* sp Akk-1 telah mencapai fase stationer pada waktu inkubasi 12 hari, sedangkan pada media PDB sudah mencapai fase stationer pada waktu inkubasi 6 hari. Hal ini dapat diketahui dari bobot biomassa yang diperoleh.

Hasil pengujian aktivitas senyawa antifungi *Gliocladium* sp Akk-1 terhadap kedua cendawan pantogen *R. solani* dan *Pythium* sp. menunjukkan bahwa senyawa antifungi yang dihasilkan mampu untuk menghambat pertumbuhan kedua cendawan tersebut.

Dalam penelitian ini digunakan kedua jenis cendawan tersebut karena cendawan mempunyai kandungan dinding sel yang berbeda. *R. solani* merupakan cendawan pantogen dari kelas Deuteromycetes, yang merupakan cendawan tingkat tinggi, dengan kandungan dinding sel terbuat dari khitin 39%, β -glukan 29%, lemak 6%, protein 7%, abu 2% dan sisanya merupakan polisakarida yang lain. Sedangkan *Pythium* sp. merupakan cendawan pantogen dari kelas Oomycetes, yang merupakan cendawan tingkat rendah dengan kandungan dinding sel terdiri dari selulosa 25%, β -glukan 65%, lemak 2%, protein 4%, abu sedikit sekali dan sisanya merupakan polisakarida yang lain (Griffin, 1994). Adanya perbedaan kandungan dinding sel akan menyebabkan perbedaan sensitivitas masing-masing cendawan tersebut terhadap senyawa antifungi.

Mekanisme penghambatan pertumbuhan pantogen terutama disebabkan oleh senyawa antifungi yang kontak dengan dinding sel pantogen sehingga menyebabkan lisis pada dinding sel. Kerusakan dinding sel dapat terjadi karena

terjadi denaturasi protein dinding sel yang diikuti dengan kerusakan membran sel.

Dengan rusaknya dinding sel mengakibatkan senyawa antifungi sudah masuk ke dalam sel sehingga mengganggu metabolisme sel. Gangguan ini dapat berupa pemblokiran transport elektron dalam rantai sitokrom atau terganggunya fosforilasi ATP dari proses metabolisme energi. Pemblokiran transport elektron dapat menghambat pengambilan oksigen dan siklus asam trikarboksilat.

Beberapa enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Gliocladium* sp. Akk-1 diantaranya enzim endokitinase, α -1,4- β -chitobiosidase juga dapat menyebabkan lisis pada dinding sel karena terjadinya pemutusan rantai polisakarida pada dinding sel (di Pietro, *et. al.*, 1993 dan Van Tilburg dan Thomas, 1993).

KESIMPULAN

1. Interaksi antara lama waktu inkubasi dan jenis media fermentasi yang berbeda berpengaruh terhadap aktivitas senyawa antifungi *Gliocladium* sp. Akk-1 dalam menghambat kedua jenis patogen yang digunakan.
2. Interaksi yang terbaik antara lama waktu inkubasi dan jenis media fermentasi yang menunjukkan aktivitas senyawa antifungi tertinggi adalah antara media RTM dengan waktu inkubasi 6 hari untuk *R. solani* dan 12 hari untuk *Pythium* sp.
3. Media RTM merupakan media yang paling sesuai untuk memproduksi senyawa antifungi dari *Gliocladium* sp. Akk-1 dan waktu inkubasi yang dibutuhkan adalah 6-12 hari.

DAFTAR PUSTAKA

- Carlile, M.J., S.C. Watkinson, 1994. *The Fungi* Academic Press, Harcourt Brace & Company, Publishers, London.
- Ekowati, N. 1992. Penambahan *Gliocladium* spp pada Pupuk Kotoran Ayam untuk Pengendalian *Rhizoctonia solani* Kunh Pada Jagung. Tesis Program Pasca sarjana IPB, Bogor.
- Ekowati, N., N.I. Ratnaningtyas dan A.Mumphuni, 2000. Aktivitas Antifungi Beberapa Isolat Lokal *Gliocladium* spp dan *Trichoderma* spp. Terhadap *Phytophthora palmivora*, Penyebab Busuk Buah Cacao. Laporan Hasil Penelitian, Fakultas Biologi, Unsoed, Purwokerto.
- Fokkema, N..J. 1996. Biological Control of Fungal Plant Diseases. *Entomophaga* 41, 333 – 342.
- Ghisalberti, E.I,
- Howell, C.R., R.D. Stipanovic., R..D. Lumsden, 1993. Antibiotic Production By Strains of *Gliocladium virens* And Its Relation to the Biocontrol of Cotton Seedling Diseases, *Biocontrol Science and Tecnology*, 3, 435-441.
- Rouland, C. Y. 1993. Antifungal Metabolites from *Trichoderma harzianum*. *Journal Natural Produktion* 56 (10): 1799 – 1804.