

Karakterisasi Isolat *Rhizoctonia* sp. Patogenik dan *Rhizoctonia* Mikoriza Pada Tanaman Anggrek Tanah *Spathoglottis plicata*

Characterization of pathogenic *Rhizoctonia* sp. and mycorrhizal *Rhizoctonia* Isolates on Terrestrial orchid plant *Spathoglottis plicata*

Soelistijono^{1*}, Achmadi Priyatmojo², Endang Semiarti³, dan Christanti Sumardiyono²

¹Fakultas Pertanian Universitas Tunas Pembangunan Surakarta
Jln. Balekambang Lor no 1 Manahan, Surakarta

²Pertanian Universitas Gadjah Mada
Jln. Flora 1, Bulaksumur, Yogyakarta 55281

³Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta
E-mail: sulistyو.utp@gmail.com *Penulis untuk korespondensi

Abstract

Mycorrhizal *Rhizoctonia* is a fungus that capable to associate with terrestrial orchids. Apart from being mycorrhizal, there are isolates of *Rhizoctonia* sp. that are pathogenic and caused root rot disease on *Spathoglottis plicata*. This study aimed to know the differences between pathogenic *Rhizoctonia* sp. and mycorrhizal *Rhizoctonia* in morphology and molecular structure using RAPD technique. The results showed that colony colour, cell length and nucleus number a several isolates of pathogenic *Rhizoctonia* sp. and of mycorrhizal *Rhizoctonia* on *S. plicata* had no differences, but had differences on cell thickness and isolate grouping based on hyphal anastomosis test. RAPD molecular technique showed that each isolate of pathogenic *Rhizoctonia* sp. and mycorrhizal *Rhizoctonia* had differences on DNA structure.

Key words: Mycorrhizal *Rhizoctonia*, pathogenic *Rhizoctonia* sp. and *Spathoglottis plicata*

Abstrak

Rhizoctonia mikoriza merupakan jamur yang mampu berasosiasi dengan anggrek tanah. Selain sebagai mikoriza, terdapat isolat *Rhizoctonia* sp. patogen dan penyebab penyakit busuk akar pada *Spathoglottis plicata*. Penelitian ini bertujuan mengetahui perbedaan antara *Rhizoctonia* sp. patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza secara morfologi dan molekular menggunakan teknik RAPD. Hasil penelitian secara morfologi menunjukkan bahwa warna koloni, panjang dan jumlah inti sel isolat *Rhizoctonia* sp. patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza pada *S. plicata* tidak berbeda, tetapi berbeda pada ketebalan sel dan pengelompokan isolat berdasarkan uji anastomosis hifa. Teknik molekuler RAPD menunjukkan bahwa setiap isolat *Rhizoctonia* sp. patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza memiliki perbedaan pada struktur DNA.

Kata kunci: *Rhizoctonia* mikoriza, *Rhizoctonia* sp. patogenik dan *Spathoglottis plicata*

Diterima: 24 Maret 2011, disetujui: 31 Mei 2011

Pendahuluan

Tanaman anggrek sangat disukai sebagai tanaman hias karena bunganya yang indah serta pembungaannya yang tahan lama (tidak cepat layu), selain itu bunga anggrek mempunyai nilai ekonomis yang tinggi. Beberapa anggrek yang disukai antara lain anggrek bulan (*Phalaenopsis* sp.), anggrek vanda (*Vanda* sp.), anggrek dendrobium (*Dendrobium* sp.) dan anggrek *Spathoglottis* sp., karena keindahan

bunganya, maka dilakukan perbanyakan anggrek secara *in vitro* dan persilangan intergenerik untuk mendapatkan tanaman hibrid yang lebih indah daripada tanaman induk. Contoh persilangan intergenerik antara *Vanda tricolor* sebagai tanaman induk dengan *Phalaenopsis* sp. (*P. joane kileup june*, *P. Pinlong cinderella*, *P. Fortune buddha* dan *P. Princes kaiulani*) akan menghasilkan bunga anggrek lebih indah dan tahan lama dibanding indukannya (Soelistijono dan Hartati, 2008).

Salah satu anggrek tanah yang banyak dibudidayakan di Indonesia adalah *Spathoglottis plicata*. *S. plicata* memiliki akar yang mudah terinfeksi oleh jamur *Rhizoctonia sp.* yang bersifat patogen penyebab penyakit busuk pada akar. Selain mudah terinfeksi, akar *S. plicata* juga dapat berasosiasi dengan *Rhizoctonia* mikoriza dan membentuk struktur lilitan hifa yang menggumpal disebut peloton (Smith dan Read, 2008) di bagian kortek akar.

Rhizoctonia sp. patogen memiliki sklerotium berwarna coklat, bentuknya tidak teratur, miselium berbentuk elips, biasanya terletak pada permukaan tumbuhan inang seperti tomat, kentang, kobis, wortel dan dihubungkan oleh benang-benang miselium berwarna coklat, percabangan membentuk sudut siku-siku dan umum terdapat dalam tanah (Semangun, 1996; Agrios, 2005). *Rhizoctonia sp.* patogen mampu menginfeksi berbagai tanaman (polifag) dan umumnya terdapat di dalam tanah. Gejala penyakit yang ditimbulkan berupa pembusukan leher akar yang mencapai rhizoma dan umbi wortel, daun kobis dan umbi kentang menguning, berkeriput, tipis dan bengkok. Pada umumnya *Rhizoctonia sp.* patogen menyebabkan tanaman menjadi kerdil (Anonim, 2008). Penetrasi *Rhizoctonia sp.* patogen pada bagian akar tanaman terjadi melalui celah yang terbentuk pada saat pembentukan percabangan akar, seperti pada akar tomat, kentang dan kobis (Agrios, 2005). Secara umum *Rhizoctonia sp.* dapat dibagi menjadi tiga kelompok berdasarkan jumlah inti selnya yaitu: uninukleat, binukleat, dan multinukleat (Otero *et al.*, 2002).

Secara alami anggrek tanah berkembang biak dengan biji atau anakan. Biji anggrek kebanyakan tidak memiliki cadangan makanan (endosperm) sehingga membutuhkan asosiasi dengan jamur mikoriza untuk memenuhi kebutuhan suplai unsur hara dari lingkungannya (Smith dan Read, 2008). Menurut Hayakawa *et al.*, (1999), pertumbuhan biji anggrek secara alami menjadi protokorm yang memiliki ketergantungan pada mikoriza untuk ketersediaan nutrisi pertumbuhannya sampai tanaman tumbuh dewasa. Salah satu jamur mikoriza yang mampu berasosiasi dengan anggrek tanah adalah *Rhizoctonia* mikoriza (Athipunyakom dan Manoch, 2008).

Mikoriza pada anggrek memiliki kemampuan untuk penetrasi hingga ke jaringan kortek akar, seperti kemampuan mikoriza arbuskular dan membentuk struktur peloton (Dressler, 1990). Manoch *et al.*, (2008) menemukan adanya asosiasi antara akar beberapa anggrek tanah dengan *Rhizoctonia sp.* yang diisolasi dari berbagai tempat di Thailand dan semua isolat tersebut termasuk dalam kelompok binukleat.

Interaksi antara *Rhizoctonia* mikoriza dengan biji anggrek menyebabkan beberapa kemungkinan, yaitu: (1) membentuk peloton dan simbiosis diantara keduanya bersifat mutualisme, (2) menyebabkan kematian biji anggrek karena adanya infeksi hifa *Rhizoctonia* mikoriza dan simbiosisnya bersifat parasitik, atau (3) tidak saling merugikan karena mikoriza terletak di ruang antar sel jaringan biji anggrek (Smith dan Read, 2008).

Perbedaan antara *Rhizoctonia* mikoriza dengan *Rhizoctonia sp.* patogen adalah *Rhizoctonia* mikoriza berperan dalam penyediaan unsur hara yang dibutuhkan oleh anggrek (Otero *et al.*, 2002), sedangkan *Rhizoctonia sp.* patogen menyebabkan terjadinya penyakit busuk pada akar anggrek (Cubeta dan Vilgalys, 1997). Secara molekular terdapat perbedaan struktur DNA *Rhizoctonia* mikoriza dengan *Rhizoctonia sp.* patogen, namun perbedaan tersebut tidak mempengaruhi sifat patogenisitasnya (Soelistijono, 2010).

Penelitian ini bertujuan melakukan karakterisasi morfologi dan molekular berbagai isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia sp.*, serta mengetahui perbedaan dua kelompok tersebut.

Metode Penelitian

Bahan dan Peralatan

Bahan penelitian adalah 3 isolat *Rhizoctonia sp.* patogen, 1 *R. solani* dan 4 isolat *Rhizoctonia* mikoriza yang diperoleh dari Magelang, Tawangmangu (Jateng) dan Sleman (DIY). Bahan-bahan kimia yang digunakan meliputi PDA (Potato Dextrosa Agar), cat Safranin, CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromida) 2%, gel akrilamid 6%, ethidium bromide, kit MMB (Mega Mix Blue), primer

OPA-18, AP (Amersham Pharmacia Biotech)1, AP2, AP3, AP4, AP5, dan AP6. Peralatan yang digunakan mikroskop Olympus CX31, mikroskop Optic Lab., sentrifus Kokusan H-9R, mesin PCR Infinigen TC-25/H.

Isolasi, Identifikasi dan Karakterisasi *Rhizoctonia sp.* Patogen dan *Rhizoctonia* Mikoriza

Isolasi *Rhizoctonia sp.* patogen dilakukan dari akar *S. plicata* yang bergejala busuk di berbagai tempat (Magelang, Tawangmangu dan Sleman), menurut metode Bayman *et al.*, (1997) yang dimodifikasi pada cara sterilisasi akar (Otero *et al.*, 2002). Isolat *Rhizoctonia sp.* patogen yang diperoleh ditumbuhkan pada medium PDA dan dilakukan identifikasi menurut Barnett dan Hunter (1972) meliputi: ukuran sel hifa, bentuk percabangan hifa, jumlah inti, dan warna sklerotium.

Karakterisasi dilakukan pada isolat *Rhizoctonia sp.* patogen berdasarkan morfologi, dimensi jamur dan *isolates grouping*. Karakterisasi dilakukan berdasarkan cara yang digunakan oleh Windels *et al.*, (1997); Carling *et al.*, (1999), meliputi:

Morfologi Jamur

Pengamatan morfologi koloni meliputi warna koloni dan ada tidaknya sklerotium pada medium PDA.

Dimensi Jamur

Pengamatan dimensi jamur meliputi lebar dan panjang sel hifa serta jumlah inti sel. Penghitungan jumlah inti sel menurut Sneh *et al.*, (2004) sebanyak 30 bidang pandang untuk setiap isolat.

Pengelompokan Isolat (*isolates grouping*)

Isolasi, identifikasi dan karakterisasi *Rhizoctonia* mikoriza dari berbagai tempat dilakukan dengan cara yang sama (Villajuan-Abgona *et al.*, 1996).

Pengelompokan *Rhizoctonia sp.* (*isolates grouping*) berdasar Anastomosis Hifa

Berdasarkan kemampuan anastomosis hifa pada media PDA, baik *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza dapat dibagi menjadi 4 macam, yaitu C0: kedua hifa tetap

tumbuh, tidak terjadi kontak, C1: tidak terjadi kontak dinding sel, reaksi dapat atau tidak diikuti kematian sel, C2: terjadi fusi dinding sel (anastomosis) diikuti kematian sel, respon inkompatibilitas somatik dan C3: terjadi fusi dinding sel tanpa diikuti kematian sel (McNish *et al.*, 1993).

Analisis Perbedaan *Rhizoctonia sp.* Patogen dan *Rhizoctonia* Mikoriza Secara Molekular

Ekstraksi DNA jamur dilakukan dengan metode CTAB 2% (Kumar, 2009). PCR DNA menggunakan metode RAPD dengan primer OPA-18, AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, dan AP6 pada suhu annealing 36°C selama 30 siklus. Elektroforesis hasil PCR DNA dilakukan di PAGE 6% dengan voltase 50 volt selama 2 jam. Hasil amplifikasi selanjutnya diamati menggunakan sinar UV (Biorad UV Transilluminator 2000).

Hasil dan pembahasan

Isolasi dan Identifikasi *Rhizoctonia sp.* Patogen dan *Rhizoctonia* Mikoriza

Rhizoctonia sp. patogen saat menginfeksi akar *S. plicata* akan menyebabkan gejala penyakit busuk pada akar (Gambar 1).

Gambar 1A dan 1B terlihat perbedaan antara *S. plicata* yang sehat dan sakit, sedangkan pada Gambar 1C terlihat bagian permukaan epidermis akar *S. plicata* yang diselubungi hifa *Rhizoctonia sp.* patogen, sehingga akan menghambat pertumbuhan akar anggrek. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Agrios (2005) yang menyatakan bahwa hifa *Rhizoctonia sp.* patogen dapat menginfeksi akar tanaman dengan menembus jaringan epidermis dan masuk ke bagian kortek, sehingga mengganggu pertumbuhan tanaman.

Isolasi *Rhizoctonia sp.* patogen dari beberapa lokasi di Tawangmangu, Magelang dan Sleman diperoleh isolat Twmg, Brbd, Slmn 1 dan Slmn 2 (*Rhizoctonia solani*). Warna koloni, jumlah inti, dan sklerotium *Rhizoctonia sp.* patogen berbeda antara satu isolat dengan isolat lainnya (Gambar 2A, 2B, 2C dan 2D).

Isolat Twmg, Brbd dan Slmn 2 berwarna putih sedangkan isolat Slmn 1 berwarna kecoklatan, yang menunjukkan bahwa berbagai

Karakterisasi Isolat *Rhizoctonia sp.* Patogenik dan *Rhizoctonia Mikoriza*

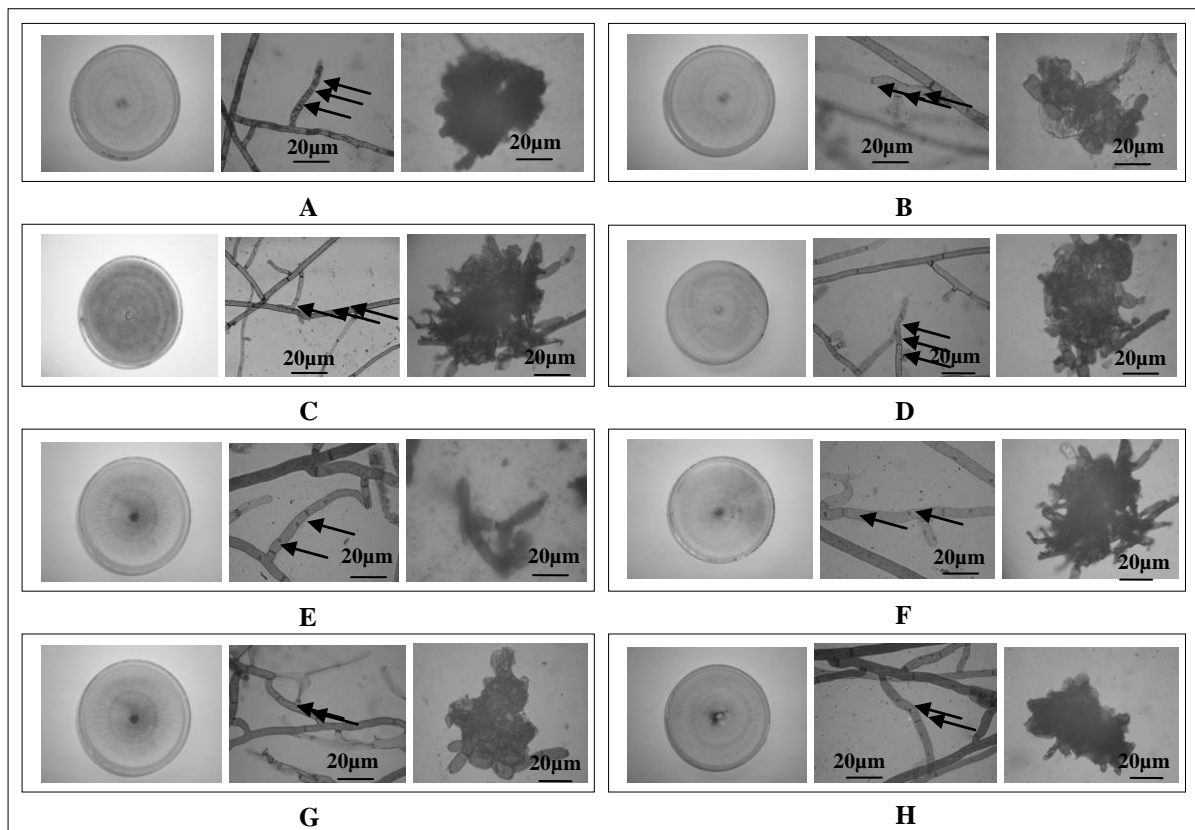
isolat *Rhizoctonia* patogen yang diisolasi dari tanaman yang sama akan memiliki warna yang berbeda. Hal tersebut sesuai dengan Carling *et al.*, (1999), bahwa dari 26 isolat *R. solani* (AG-12) yang dikoleksi dari tanaman anggrek *Pterostylis acuminata*, 20 isolat berwarna coklat tua sedangkan 6 isolat lainnya berwarna coklat muda. Hyakumachi *et al.*, (2005) juga menemukan hal yang sama bahwa dari 670 isolat *Rhizoctonia sp.*, 168 berwarna coklat muda hingga coklat dan 502 berwarna putih.

Penelitian Carling dan Hyakumachi tersebut, dikatakan bahwa warna koloni *Rhizoctonia sp.* patogen tidak dapat dijadikan dasar pembeda masing-masing isolat.

Isolasi *Rhizoctonia* mikoriza dari beberapa lokasi di Tawangmangu, Magelang dan Sleman diperoleh isolat *Rhizoctonia* mikoriza 1 (M1), 2 (M2), 3 (M3) dan 4 (M4). Warna koloni, jumlah inti, dan sklerotium *Rhizoctonia* mikoriza berbeda antara satu isolat dengan isolat lainnya (Gambar 2E, 2F, 2G, 2H).



Gambar 1. Gejala penyakit busuk akar oleh *Rhizoctonia sp.* pada akar *S. plicata*. Tanaman *S. plicata* sehat (A), tanaman *S. plicata* sakit (B), dan gejala busuk akar pada *S. plicata* (C). Keterangan: Anak panah pada C menunjukkan hifa *Rhizoctonia sp.* patogen. Skala - : 1 cm pada A, B dan C.



Gambar 2. Morfologi koloni, jumlah inti di dalam sel dan sklerotium dari isolat Twmg (A), Brbd(B), Slmn1(C), Slmn2(D), M1(E), M2(F), M3(G) dan M4(H). Tanda panah adalah inti sel. Skala - : 20 µm.

Warna koloni *Rhizoctonia* mikoriza berbeda-beda tergantung dari kelompok masing-masing (*isolates grouping*). Isolat *Rhizoctonia* mikoriza (M1, M2, M3 dan M4) yang diperoleh, sebagian besar memiliki warna koloni putih kecoklatan/coklat muda. Athipunyakom dan Manoch (2008), menemukan hal yang sama, bahwa 7 isolat *Rhizoctonia* mikoriza yang diisolasi dari *S. plicata* dari berbagai tempat di Thailand menunjukkan koloni berwarna putih, sedangkan Agustini et al., (2009) menemukan hal yang berbeda di kebun raya Cycloops Jayapura, bahwa 10 isolat mikoriza anggrek yang diperoleh warna koloni bervariasi dari putih hingga hitam. Oleh karena itu, berdasarkan pengamatan secara morfologi warna koloni isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza dapat dikatakan bahwa warna koloni tidak dapat digunakan sebagai pembeda antar masing-masing isolat.

Masing-masing isolat *Rhizoctonia sp.* patogen memiliki perbedaan lebar dan panjang sel (Tabel 1). Tabel 1 terlihat sel *Rhizoctonia sp.* patogen memiliki ukuran lebar sel yang kecil, berkisar 3,5–11 µm. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Carling et al., (1999) tentang *Rhizoctonia sp.* yang bersifat patogen pada

anggrek yaitu kelompok AG-12 dengan lebar sel berkisar 6,7–7,7 µm.

Isolat *Rhizoctonia* mikoriza memiliki dimensi yang berbeda antara masing-masing isolat dan berbeda dengan isolat *Rhizoctonia sp.* patogen (Tabel 2). Tabel 2 terlihat bahwa masing-masing isolat *Rhizoctonia* mikoriza yang diperoleh dari berbagai tempat di Tawangmangu, Magelang dan Sleman memiliki ukuran lebar sel yang seragam dan lebih besar dibanding isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dari tempat yang sama. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Garcia et al., (2006) tentang *Rhizoctonia* mikoriza pada anggrek, menyimpulkan lebar sel lebih dari 10 µm. Berdasarkan dua penelitian tersebut (Carling et al., 1999 dan Garcia et al., 2006), dapat dikatakan isolat Twmg, Brbd, Slmn 1 dan 2 memiliki lebar sel lebih kecil dibandingkan lebar sel isolat M1, M2, M3 dan M4.

Rhizoctonia sp. patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza memiliki ukuran panjang sel yang bervariasi, 42–202 µm. Hal ini dapat dikaitkan dengan umur dari masing-masing sel, semakin tua isolat maka akan semakin panjang ukuran selnya. Isolat *Rhizoctonia sp.* patogen maupun *Rhizoctonia* mikoriza tidak berbeda pada panjang sel tetapi berbeda pada lebar sel.

Tabel 1. Dimensi *Rhizoctonia sp.* patogen.

<i>Rhizoctonia sp.</i> patogen (4 isolat)	Ukuran Sel (µm)		Warna Koloni	Pembentukan Sklerotia
	Lebar Sel	Panjang Sel		
Twmg (<i>Rhizoctonia sp.</i> 1)	3,5–10,0	42,0–202,1	Putih kecoklatan	+
Brbd (<i>Rhizoctonia sp.</i> 2)	4,1–11,3	89,0–200,0	Putih kecoklatan	+
Slmn 1 (<i>Rhizoctonia sp.</i> 3)	6,0–11,0	75,0–169,0	Coklat tua	+
Slmn 2 (<i>R. solani</i>)	4,5–11,0	56,0–131,1	Putih kecoklatan	+

Keterangan: Twmg: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Tawangmangu; Brbd: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Magelang; Slmn 1 dan 2: *Rhizoctonia sp.* patogen dan *R. solani* dari Sleman.

+ = Terbentuk sklerotia

Tabel 2. Dimensi *Rhizoctonia* mikoriza.

<i>Rhizoctonia</i> mikoriza (4 isolat)	Ukuran Sel (µm)		Warna Koloni	Pembentukan Sklerotia
	Lebar Sel	Panjang Sel		
M1 (<i>Rhizoctonia</i> mikoriza 1)	4,8–11,0	55,0–145,0	Putih kecoklatan	+
M2 (<i>Rhizoctonia</i> mikoriza 2)	6,0–11,3	56,0–131,2	Coklat muda	+
M3 (<i>Rhizoctonia</i> mikoriza 3)	6,0–11,7	42,1,0–135,0	Coklat muda	+
M4 (<i>Rhizoctonia</i> mikoriza 4)	5,0–10,0	42,0–194,0	Coklat muda	+

Keterangan: M1: *Rhizoctonia* mikoriza dari Tawangmangu; M2: *Rhizoctonia* mikoriza dari Magelang; M3 dan M4: *Rhizoctonia* mikoriza dari Sleman.

+ = Terbentuk sklerotia

Isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia mikoriza* memiliki perbedaan dalam jumlah inti masing-masing sel (Tabel 3). Isolat Twmg, Brbd, Slmn 1 dan Slmn 2 yang bersifat patogen, sebagian besar merupakan sel hifa dengan jumlah inti rata-rata berkisar (*range*) 3–4. Menurut Sneh *et al.*, (1991), isolat yang memiliki jumlah inti sel 1–3 merupakan kelompok binukleat, sedangkan isolat yang memiliki jumlah inti sel lebih dari 3 merupakan kelompok multinukleat. Pendapat Sneh tersebut dapat dikatakan isolat Twmg, Brbd, Slmn 1 bersifat binukleat, sedangkan isolat Slmn 2 bersifat multinukleat. Menurut Carling *et al.*, (1999), adanya *R. solani* AG-12 multinukleat yang berasosiasi dengan anggrek *Pterostylis acuminata* sebagai mikoriza.

Isolat M1, M2, M3 dan M4 memiliki jumlah inti berkisar 2 sehingga dari pendapat

Sneh *et al.*, (1991), dapat dikelompokkan kedalam binukleat. Hal tersebut sesuai dengan penelitian Taylor *et al.*, (2002), Athipunyakom dan Manoch (2008) dan Garcia *et al.*, (2006) pada tanaman anggrek, sebagian besar isolat *Rhizoctonia sp.* yang diisolasi bersifat mikoriza dan termasuk dalam kelompok binukleat. Sehingga secara keseluruhan dapat dikatakan isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia mikoriza* yang diperoleh tidak dapat dibedakan berdasarkan jumlah intinya.

Pengelompokan *Rhizoctonia sp.* (isolate grouping) Berdasar Anastomosis Hifa

Isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia mikoriza* dari Tawangmangu, Magelang dan Sleman dapat dikelompokkan (*isolates grouping*) berdasarkan kemampuan anastomosisnya (Tabel 4).

Tabel 3. Jumlah inti tiap sel hifa *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia mikoriza* (240 sel hifa).

<i>Rhizoctonia sp.</i> (8 isolat)	Jumlah 30 sel hifa yang diamati tiap isolat					Kisaran (Range)	Keterangan
	1 inti	2 inti	3 inti	4 inti	5 inti		
Twmg	2	12	16	0	0	3	binukleat
Brbd	2	4	24	0	0	3	binukleat
Slmn 1	0	3	27	0	0	3	binukleat
Slmn 2	0	0	3	20	7	4	multinukleat
M1	5	15	6	4	0	2	binukleat
M2	3	20	6	1	0	2	binukleat
M3	4	17	9	0	0	2	binukleat
M4	6	17	3	4	0	2	binukleat

Keterangan: Twmg: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Tawangmangu; Brbd: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Magelang; Slmn 1 dan 2: *Rhizoctonia sp.* patogen dan *R. solani* dari Sleman; M1: *Rhizoctonia mikoriza* dari Tawangmangu; M2: *Rhizoctonia mikoriza* dari Magelang; M3 dan M4: *Rhizoctonia mikoriza* dari Sleman. Masing-masing isolat diamati sebanyak 30 sel hifa.

Tabel 4. Pengelompokan isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia mikoriza* dari Tawangmangu, Magelang dan Sleman berdasarkan reaksi anastomosis hifa.

<i>Rhizoctonia sp.</i> (8 isolat)	<i>Rhizoctonia sp.</i>							
	Twmg	Brbd	Slmn 1	Slmn 2	M1	M2	M3	M4
Twmg	C3	C1	C0	C0	C0	C0	C0	C0
Brbd		C3	C0	C0	C0	C0	C0	C0
Slmn 1			C3	C1	C0	C0	C0	C0
Slmn 2				C3	C0	C0	C0	C0
M1					C3	C2	C0	C0
M2						C3	C0	C0
M3							C3	C2
M4								C3

Keterangan: Twmg: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Tawangmangu; Brbd: *Rhizoctonia sp.* patogen dari Magelang; Slmn 1 dan 2: *Rhizoctonia sp.* patogen dan *R. solani* dari Sleman; M1: *Rhizoctonia mikoriza* dari Tawangmangu; M2: *Rhizoctonia mikoriza* dari Magelang; M3 dan M4: *Rhizoctonia mikoriza* dari Sleman. C0: kedua hifa tetap tumbuh, tidak terjadi kontak, C1: tidak terjadi kontak dinding sel, reaksi dapat atau tidak diikuti kematian sel, C2: terjadi fusi dinding sel (anastomosis) diikuti kematian sel, respon inkompatibilitas somatik C3: terjadi fusi dinding sel tanpa diikuti kematian sel.

Pada Tabel 4 terlihat isolat Twmg dengan Brbd, tidak terdapat hubungan kekerabatan, hal ini dapat dilihat dari tidak adanya hubungan anastomosis diantara keduanya (C1). Hal tersebut disebabkan keduanya berasal dari lokasi yang berbeda. Meski demikian juga tidak terdapat hubungan kekerabatan antara isolat Slmn 1 dan Slmn 2, yang terlihat tidak ada kontak membran diantara keduanya (C1), walaupun keduanya dari lokasi yang sama.

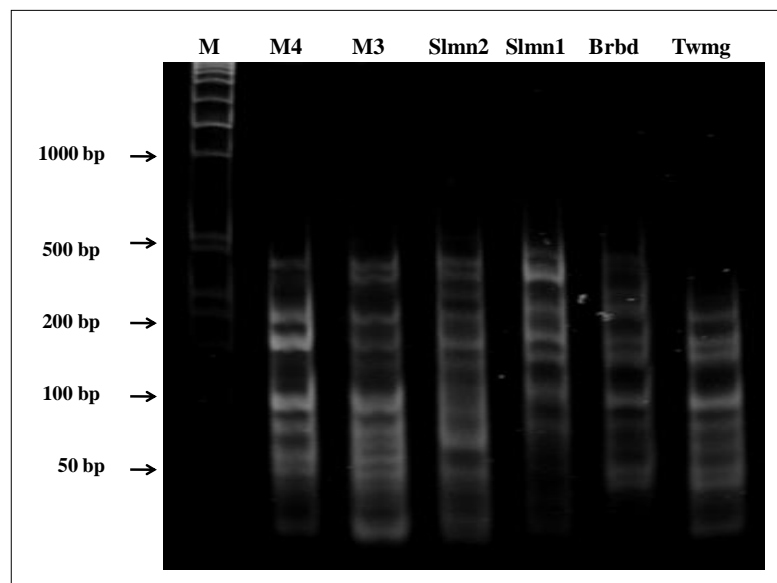
Reaksi anastomosis antara isolat M1 dan M2 menunjukkan adanya hubungan kekerabatan (C2), hal ini dapat dilihat dari adanya fusi dinding sel diantara keduanya. Kedua isolat M1 dan M2 berasal dari kelompok yang sama, walaupun keduanya berasal dari tempat yang berbeda. Demikian juga antara isolat M3 dan M4 yang berasal dari lokasi yang sama, memiliki hubungan kekerabatan diantara keduanya (C2).

Secara keseluruhan pengelompokan (*isolates grouping*) berdasarkan reaksi anastomosis dapat digunakan sebagai pembeda antara isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan

Rhizoctonia mikoriza, karena hanya isolat-isolat yang mampu melakukan anastomosis (C3) yang menunjukkan bahwa kedua isolat berasal dari strain yang sama atau tidak berbeda jauh. Oleh karena itu, perlu dilakukan analisis secara molekular untuk mengetahui perbedaan antara *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza.

Analisis Perbedaan *Rhizoctonia sp.* Patogen dan *Rhizoctonia* Mikoriza secara Molekular

Karakterisasi secara molekular untuk membedakan isolat *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza menggunakan teknik RAPD dengan primer OPA-18, AP1, AP2, AP3, AP4, AP5, dan AP6. Dari 7 primer tersebut yang digunakan, hanya primer AP4 dan AP5 yang dapat mengamplifikasi *Rhizoctonia* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza. Dari kedua primer tersebut yang memberikan hasil amplifikasi terbaik adalah primer AP5 yaitu dapat mengamplifikasi DNA isolat Twmg, Brbd, Slmn 1, Slmn 2, M3 dan M4 (Gambar 3).



Gambar 3. Analisis molekular RAPD, dengan primer AP5 pada isolat *Rhizoctonia sp.*

Keterangan : (M) Marker 1 Kb DNA Ladder, (M4) dan (M3) *Rhizoctonia* mikoriza dari Sleman, (Slmn2) *R. solani* dari Sleman, (Slmn 1) *Rhizoctonia* patogen dari Sleman, (Brbd) *Rhizoctonia* patogen dari Magelang, dan (Twmg) *Rhizoctonia* patogen dari Tawangmangu.

Karakterisasi Isolat *Rhizoctonia sp.* Patogenik dan *Rhizoctonia* Mikoriza,

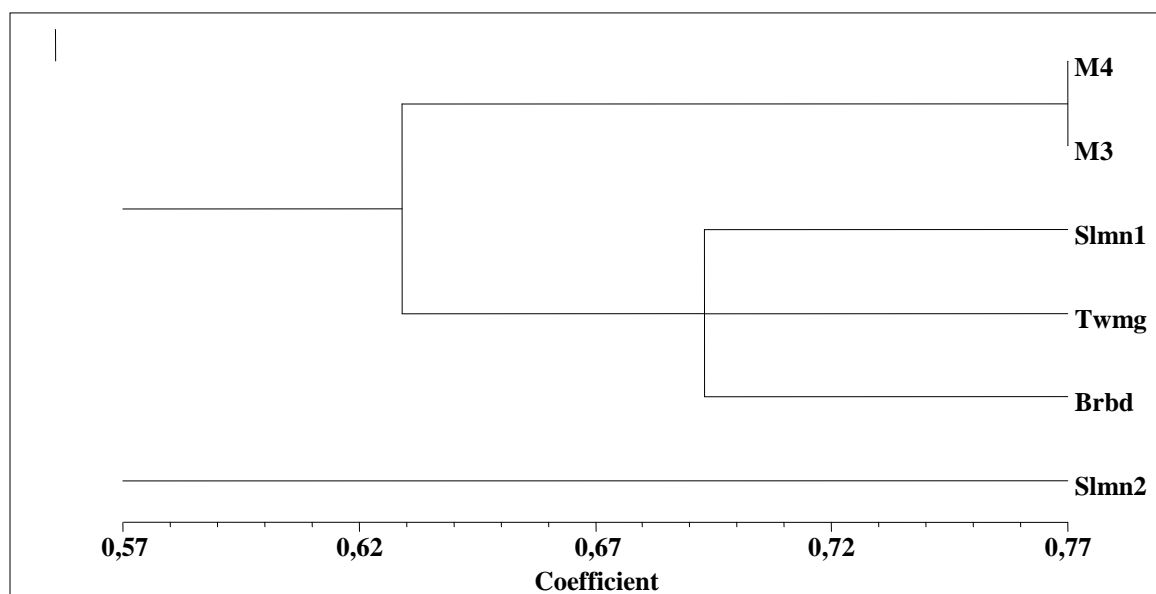
Urutan DNA diberbagai kromosom dengan primer AP5 menunjukkan *Rhizoctonia* mikoriza (M4 dan M5) memiliki struktur DNA yang berbeda dengan *Rhizoctonia sp.* patogen yaitu teramplifikasinya fragmen/pita DNA sepanjang 50bp. *Rhizoctonia sp.* patogen (Slmn2, Slmn1, Brbd dan Twmg) memiliki struktur DNA berbeda dengan *Rhizoctonia* mikoriza yaitu pada fragmen DNA 300bp. Isolat M3 dan M4 (*Rhizoctonia* mikoriza) dari tempat yang sama (Sleman), merupakan isolat yang berbeda. Hal tersebut diketahui dari hasil amplifikasi DNA isolat M4 yang menghasilkan 3 pita DNA sepanjang 75kb, 150kb dan 480kb yang tidak dimiliki oleh isolat M3.

Rhizoctonia sp. patogen yang bersifat multinukleat (Slmn2) merupakan isolat yang berbeda dengan *Rhizoctonia sp.* patogen yang bersifat binukleat (Slmn1, Brbd dan Twmg). Hal tersebut terlihat pada pola pita DNA isolat Slmn 2 yang teramplifikasi pada DNA sepanjang 25bp, tetapi tidak teramplifikasi dari DNA *Rhizoctonia sp.* patogen binukleat. *Rhizoctonia sp.* patogen binukleat berbeda dengan *Rhizoctonia sp.* patogen multinukleat yaitu dengan teramplifikasi DNA dengan panjang 80bp dan 100bp, yang juga terdapat pada DNA *Rhizoctonia* mikoriza. Sehingga dapat dikatakan struktur DNA *Rhizoctonia*

binukleat baik yang bersifat mikoriza maupun patogen memiliki persamaan yaitu memiliki fragmen DNA dengan panjang 80bp dan 100bp.

Struktur DNA *Rhizoctonia sp.* patogen binukleat (Slmn1, Brbd dan Twmg) berbeda dengan lainnya. Struktur DNA isolat Slmn 1 dan Brbd memiliki persamaan dengan adanya pita DNA 480bp dan 500bp, sedangkan isolat Brbd dan Twmg memiliki persamaan hasil amplifikasi DNA 30bp, 40bp dan 60bp.

Perbedaan struktur DNA *Rhizoctonia sp.* yang ditunjukkan pola DNA hasil amplifikasi menggunakan primer random AP5 dapat diperoleh dendogram yang disajikan pada Gambar 4. Pada Gambar 4 terlihat struktur DNA *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza berbeda satu dengan lainnya. Isolat Slmn 2 yang bersifat multinukleat hanya memiliki kemiripan struktur DNA sebesar 57% dengan semua isolat yang diuji, hal tersebut menunjukkan bahwa isolat Slmn 2 memiliki hubungan kekerabatan yang paling jauh dengan isolat lainnya. Hal tersebut dikarenakan hanya isolat Slmn 2 yang bersifat multinukleat sedangkan isolat *Rhizoctonia sp.* lainnya bersifat binukleat, baik yang patogen (Slmn 1, Brbd dan Twmg) maupun mikoriza (M3 dan M4).



Gambar 4. Dendogram *Rhizoctonia sp.* patogen dan *Rhizoctonia* mikoriza. Keterangan : (M4) dan (M3) *Rhizoctonia* mikoriza dari Sleman, (Slmn2) *R. solani* dari Sleman, (Slmn 1) *Rhizoctonia* patogenik dari Sleman, (Brbd) *Rhizoctonia* patogenik dari Magelang, dan (Twmg) *Rhizoctonia* patogenik dari Tawangmangu.

Rhizoctonia sp. patogenik (Slmn 1, Brbd, dan Twmg) dan *Rhizoctonia* mikoriza (M3 dan M4) memiliki kemiripan struktur DNA yang dekat yaitu sebesar 63%. Hal tersebut dikarenakan kedua kelompok *Rhizoctonia* tersebut sama-sama bersifat binukleat. *Rhizoctonia sp.* patogenik (Slmn 1, Brbd, dan Twmg) memiliki kemiripan struktur DNA hingga 69%. Hal tersebut menunjukkan bahwa walaupun termasuk *Rhizoctonia sp.* patogenik binukleat, isolat Slmn1, Brbd, dan Twmg merupakan isolat yang berbeda.

Rhizoctonia mikoriza (M3 dan M4) memiliki kemiripan struktur DNA lebih tinggi yaitu 77%. Kemiripan struktur DNA isolat M3 dan M4 yang tinggi karena keduanya merupakan mikoriza binukleat pada anggrek (*orchid mycorrhiza*), setiap mikoriza pada anggrek mempunyai hubungan erat dengan tanaman inang dalam siklus hidupnya. Isolat M3 dan M4 merupakan *Rhizoctonia* mikoriza spesifik yang dapat berasosiasi dengan *S. plicata*. Hal ini sesuai dengan pendapat Smith dan Read (2008), setiap biji anggrek tanah membutuhkan mikoriza yang spesifik dalam penyediaan unsur hara dari lingkungan untuk perkembangannya hingga dewasa. Hasil dendrogram tersebut secara keseluruhan dapat dikatakan *Rhizoctonia* patogenik (Slmn1, Slmn2, Brbd dan Twmg) dan *Rhizoctonia* mikoriza (M3 dan M4) kemiripan sebesar 57% walaupun berbeda secara genetis.

Simpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa karakterisasi isolat *Rhizoctonia sp.* patogenik dan *Rhizoctonia* mikoriza pada *S. plicata* yang berasal dari Tawangmangu, Magelang, dan Sleman tidak berbeda secara morfologi, tetapi berbeda secara genotipe. Persamaan karakter terdapat pada warna koloni, panjang sel dan jumlah inti, dan perbedaan karakter terdapat pada lebar sel, kelompok anastomosis dan struktur DNA.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada DP2M Direktorat Pendidikan Tinggi yang telah memberikan dana

penelitian sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2010 Nomor : 091/SP2H/PP/DP2M/III/2010 Tanggal 1 Maret 2010.

Daftar Pustaka

- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press. New York. 922 p.
- Agustini, Sufaati, V.S. dan Suharno. 2009. Mycorrhizal association of terrestrial orchids of Cycloops Nature Reserve, Jayapura. Biodiversitas.
- Anonim. 2008. *Anggrek*. Bidang Pemberdayaan dan Pemasarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Jakarta. 17 h.
- Athipunyakom, P. dan Manoch, L. 2008. Isolation and identification of mycorrhizal fungi from eleven terrestrial orchids. http://www.aseanbiodiversity.info/scripts/count_article.asp? Article_code=53004001. 13 Juni 2008.
- Barnett, H.L. dan Hunter, B.B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 3rd Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241p.
- Bayman, P., Lebron, L., Tremblay, R.L. dan Lodge, J. 1997. Variation in endophytic fungi from roots and leaves of *Lepanthes* (Orchidaceae). *New Phytologist*, 135: 143–149.
- Carling, D.E., Pope, E.J., Brainard, K.A. dan Carter, D.A. 1999. Characterization of mycorrhizal isolates of *Rhizoctonia solani* from an orchid, including AG-12, a new anastomosis group. *Phytopathol.*, 89: 942–946.
- Cubeta, M.A. dan Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathol.*, 87: 480–484.
- Dearnaley, J.D.W. 2007. Further advances in orchid mycorrhizal research. *Mycorrhiza*, 17: 475–486.
- Dressler, R.L. 1990. *The Orchids, Natural History and Classification*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 332 p.
- García, V.G., Onco, M.A.P. dan Susan, V.R. 2006. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish J. of Agricultural Research*, 4: 55–79.
- Hayakawa, S., Uetake, Y. dan Ogoshi, A. 1999. Identification of symbiotic rhizoctonias from naturally occurring protocorms and roots of *Dactylorhiza aristata* (orchidaceae). *J. of Faculty Agriculture Hokkaido University*, 6: 129–141.

Karakterisasi Isolat Rhizoctonia sp. Patogenik dan Rhizoctonia Mikoriza

- Hyakumachi, M., Priyatmojo, A., Kubota, M. dan Fukui, H. 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U, of binucleate *Rhizoctonia sp.* causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. *Phytopathol.*, 95: 784–792.
- Manoch, L., Athipunyakom, P. dan Tanticharoen, M. 2008. *Rhizoctonia*-like fungi associated terrestrial orchids in Thailand. http://www.aseanbiodiversity.info/scripts/count_article.asp?Article_code=53004001. 5 Februari 2008.
- McNish, G.C., Carling, D.E., Sweetingham, M.W. dan Brainard, K.A. 1994. Anastomosis group (AG) affinity of pectic enzyme (zymogram) groups (ZG) of *Rhizoctonia solani* from Western Australian cereal belt. *Mycology Research*, 98: 1369–1375.
- Otero, J.T., Ackerman, J.D. dan Bayman, P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. *American J. of Botany*, 89: 1852–1858.
- Semangun, H. 1996. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 754 h.
- Smith, S.E. dan Read, D.J. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edition. Academic Press. New York. 805p.
- Sneh, B., Burpee, L. dan Ogoshi, A. 1991. *Identification of Rhizoctonia Species*. APS Press. St. Paul. MN.
- Sneh, B., Yamoah, E. dan Stewart, A. 2004. Hypovirulent *Rhizoctonia sp.* isolats from New Zealand soils protect radish seedlings against damping-off caused by *Rhizoctonia sp. patogen*. *New Zealand Plant Protection*, 57: 54–58.
- Soelistijono dan Hartati, S. 2008. Perbaikan Genetik Angrek melalui Persilangan Intergenerik dan Perbanyakan secara *In Vitro* dalam mendukung perkembangan Angrek di Indonesia. Penelitian Hibah Bersaing, LP2M UTP, Surat Kontrak Ditjen Dikti No: 198/SP2H/PP/DP2M/III/2008, 6 Maret 2008.
- Soelistijono. 2010. Kajian Profil Protein dan Pola DNA Angrek Tanah Hasil Pengimbasan Ketahanan (*Induced Resistance*) yang bersifat Tahan terhadap Penyakit Busuk Akar. Penelitian Hibah Doktor LP2M UGM, Surat Kontrak Ditjen Dikti No : 481/SP2H/PP/DP2M/VI/2010, 11 Juni 2010.
- Taylor, D.L., Bruns, T.D., Leake, J.R. dan Read, D.J. 2002. *Mycorrhizal Specificity and Function in Myco-heterotrophic. Ecological Studies*, Vol. 157, M.G.A. van der Heijden, I. Sanders (Eds.) Mycorrhizal Ecology, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Villajuan-Abgona, R., Katsuno, N., Kageyama, K. dan Hyakumachi, M. 1996. Isolation and identification of hypovirulent *Rhizoctonia sp.* from soil. *Plant Pathol.*, 45: 896–904.
- Windels, C.E., Kuznia, R.A. dan Call, J. 1997. Characterization and pathogenicity of *Thanatephorus cucumeris* from sugar beet in Minnesota. *Plant Disease*, 87: 245–249.