

Produksi Fitoaleksin pada Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) sebagai Respon Infeksi Fungi Mikorisa

The Production of Phytoalexins from Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) as Response to Mycorrhizal Fungi Infection

S. Widyaningsih¹, S.M. Widyastuti^{2*} dan Sumardi²

¹. Loka Penelitian Tanaman-tanaman Jeruk dan Hortikultura Subtropis, Pusat Penelitian dan Pengembangan Hortikultura, Departemen Pertanian

². Laboratorium Perlindungan dan Kesehatan Hutan, Jurusan Budidaya Hutan, Fakultas Kehutanan UGM

e-mail: smwidystuti@yahoo.com, * penulis untuk korespondensi

Abstract

The experiment aimed to detect (1) mycorrhizal infection induced phytoalexins production of the root of tusam and (2) its activity in suppressing a dumping off fungi, *Fusarium* sp and *Rhizoctonia solani*. Production of phytoalexins was detected from the extracts of mycorrhizal root of old trees and 4, 6 and 8 week-old seedlings in alcohol using a UV-spectrophotometer. The antifungal activity of phytoalexins was studied by inoculating the pathogenic fungi into mycorrhizal seedlings of tusam. The results showed that the spectra of phytoalexins of extracted mycorrhizal and non-mycorrhizal roots ranged from 203.2 to 204.6 nm. Higher antifungal concentrations of antifungal compound was obtained from the root extracts of old trees and 4 week-old seedlings, indicated by the higher spectrophotometric absorbance (0.315 and 0.324 g⁻¹ root ml⁻¹ ethanol), compared to that extracted from non-mycorrhizal root of the same plant origin. Mycorrhizal roots significantly suppressed the development of *Fusarium* sp. and *Rhizoctonia solani*.

Key words: phytoalexins, tusam, mycorrhiza

Diterima: 02 Juni 2005, disetujui: 27 Januari 2006

Pendahuluan

Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) merupakan salah satu jenis tanaman yang diusahakan secara intensif. Areal pertanaman tusam di Jawa Barat dan Jawa Timur masing-masing 474.987,4 dan 157.640,4 ha (Badan Planologi Kehutanan, 2002a; b). Tusam pada tingkat semai mengalami periode sukulen yang sangat panjang, menurut Baker (1950) dapat berlangsung sampai 25 hari. Pada saat itu, jaringan tanaman masih muda dan akar belum aktif sehingga rentan terhadap fungi patogen terutama fungi penyebab rebah semai (*dumping off*) seperti *Fusarium* sp. (Nair dan Sumardi, 2000).

Tusam mengadakan simbiosis dengan fungi tanah pembentuk mikorisa untuk meningkatkan penyerapan hara, khususnya

fosfat, menghasilkan hormon untuk pertumbuhan tanaman (fitohormon), serta pengendalian fungi patogenik yang menyerang akar (Suvercha dan Mukerji, 1991; Jalali dan Jalali, 1991). Zak (1964) menyatakan bahwa peran fungi mikorisa, khususnya ektomikorisa dalam menekan timbulnya penyakit oleh patogen terbawa tanah antara lain dengan menstimulasi sel-sel akar selama simbiosis untuk membentuk penghambat kimia.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui produksi fitoaleksin sebagai respon interaksi ektomikorisa pada tusam dan pengaruh inokulasi fungi mikorisa terhadap persentase infeksi mikorisa dan perkembangan *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani*.

Metode Penelitian

Isolat

Inokulum fungi mikorisa diperoleh dari tanah bermikorisa di bawah tegakan tusam di Kaliurang yang didominasi oleh *Russula* sp. Isolat *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani* diisolasi dari semai tusam yang bergejala lanas dan diuji dengan Postulat Koch pada semai tusam.

Ekstraksi fitoaleksin

Ekstraksi fitoaleksin dilakukan dengan metode Nonaka dan Matsuzaki (1976) yang telah dimodifikasi. Akar pohon dan semai tusam bermikorisa dan tidak bermikorisa umur 4, 6 dan 8 minggu masing-masing sebanyak 10 gram digerus, kemudian diekstrak dengan 50 ml alkohol 70 % dan dibiarkan semalam dalam keadaan tertutup. Ekstrak disaring dengan kertas saring dan diuapkan pada suhu 40⁰ C sampai volumenya menjadi sepertiga dari volume semula kemudian ditambah air steril sampai tiga perempat volume semula. Fitoaleksin diekstrak dengan petroleum eter sebanyak 2 kali dengan 50 ml dan 30 ml petroleum eter, kemudian larutan bagian atas diambil dan bagian bawah dibuang. Hasil ekstraksi diuapkan dengan evaporator pada suhu 40⁰ C sampai kering. Materi kering yang menempel pada dinding tabung evaporator disuspensikan dengan 5 ml etanol absolut (100%) dan disimpan pada suhu 4⁰ C. Crude fitoaleksin yang didapat diamati dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 200-400 nm untuk mengetahui panjang gelombang, yang menunjukkan serapan maksimum ekstrak.

Smai tusam berumur 2 minggu dari bak perkecambahan, dipindahkan ke medium tanah bermikorisa dan tidak bermikorisa yang telah disiapkan, setiap bak berisi 25 semai. Empat hari setelah penanaman semai, bak diinokulasi dengan *Fusarium* sp. kerapatan 10⁶ spora/ml sebanyak 100 ml/bak dan *Rhizoctonia solani* sebanyak 1 cawan Petri biakan/bak. Kematian semai setiap minggu diamati dan setelah 8 minggu dihitung persentasi infeksi mikorisa dengan menggunakan rumus.

Analisis hasil

Sesuai dengan rancangan yang dibuat, data yang diperoleh dianalisis dengan analisis varians (ANOVA) dan uji lanjut (uji jarak Ganda Duncan) apabila terdapat perbedaan yang nyata.

Hasil dan Pembahasan

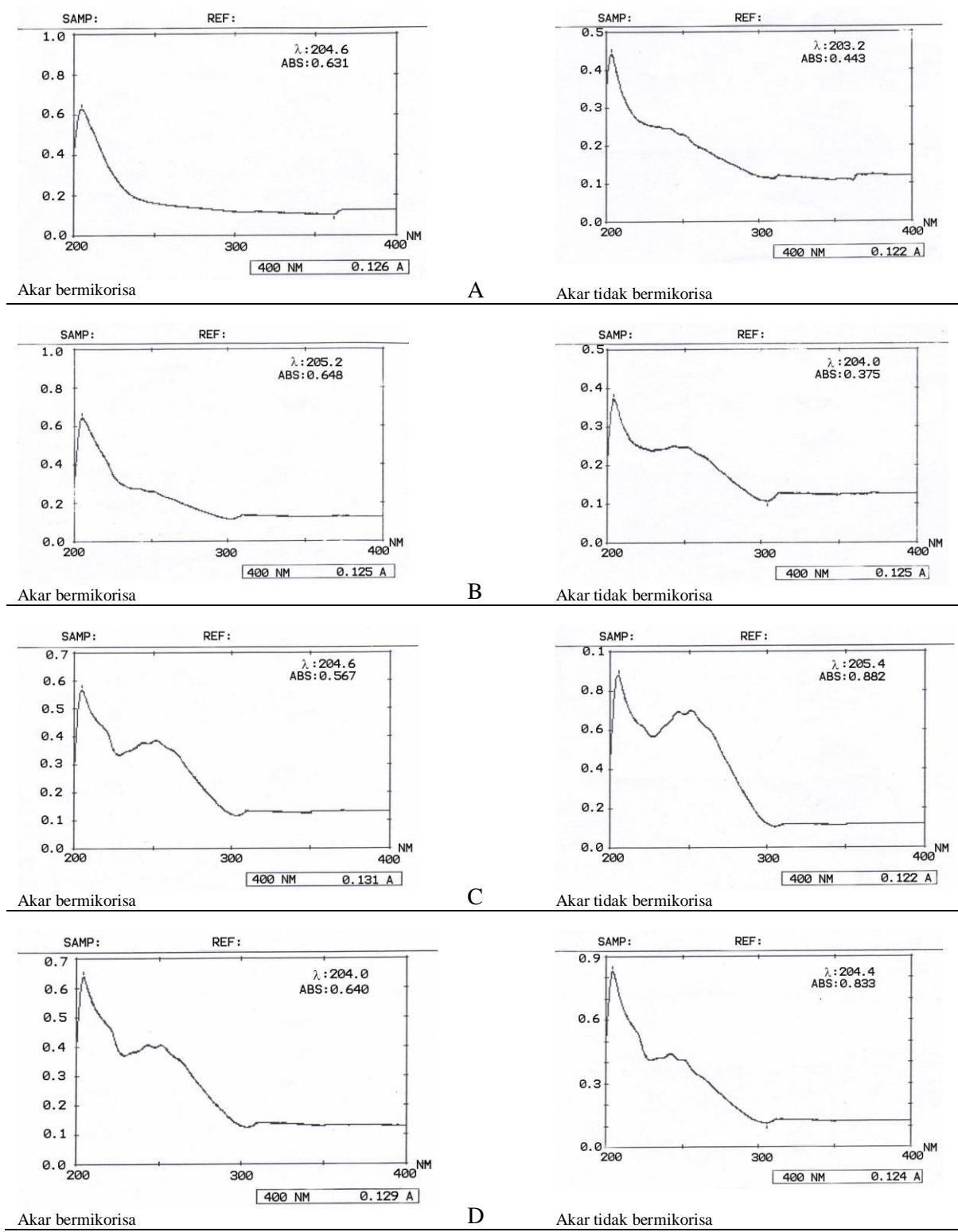
Uji Patogenisitas

Hasil uji patogenisitas menunjukkan bahwa isolat *Fusarium* sp. yang diisolasi dari semai tusam mempunyai virulensi yang tinggi sebagai penyebab penyakit rebah semai pada tusam. Pembusukan terjadi di minggu pertama, dimulai dari pangkal batang yang menyebabkan semai menjadi rebah. Biakan *Fusarium* sp. dalam PDA yang diperoleh berwarna putih, agak keungu-unguan mempunyai mikrokonidium yang berbentuk lonjong, hialin, bersekat atau tidak bersekat, berukuran 0,420 μm x 0,063 μm dan makrokonidium yang berbentuk memanjang, hialin, berdinding tipis, terdiri 2-5 sekat yang agak tebal, berukuran 1,523 μm x 0,125 μm .

Gejala rebah semai yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* terjadi mulai 6 minggu setelah semai dipindah ke bedeng sapih, mulai dari daun jarum yang berwarna hijau tua berubah menjadi coklat dan membusuk sampai pada bagian akar juga terjadi pembusukan. Semai ketika diisolasi menghasilkan biakan *Rhizoctonia solani* yang berwarna putih, kemudian berubah menjadi kecoklatan, hifa fungi bersekat-sekat, percabangan membentuk sudut siku-siku (90°), berlekuk pada bagian pangkalnya, hifa dapat menjadi gemuk, pendek dan berdinding tebal, sklerotium bentuknya tidak beraturan dan pipih.

Analisis fitoaleksin

Identifikasi suatu kandungan tumbuhan golongan senyawa dapat ditentukan dengan ciri spektrum UV. Nilai spektrum UV pada identifikasi kandungan yang tidak dikenal akan berkaitan dengan kerumitan nisbi spektrum dan letak umum panjang gelombang maksimal. Perbandingan identifikasi fenol dapat dilakukan dengan membandingkan spektrum UV-nya (Harborne, 1996).



Gambar 1. Spektrum-UV ekstrak fitoaleksin akar tusam (*P. merkusii*)

Keterangan : A. Akar pohon tusam tua; B. Akar semai tusam umur 4 minggu; C. Akar semai tusam umur 6 minggu; D. Akar semai tusam umur 8 minggu

Akar tusam bermikorisa maupun tidak bermikorisa yang diekstrak baik yang bersumber dari pohon maupun semai tusam umur 4, 6 dan 8 minggu mempunyai spektrum yang hampir sama yaitu pada panjang gelombang (serapan maksimum) 203,2 nm – 204,6 nm sehingga diduga merupakan jenis senyawa yang sama (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa tanaman telah memiliki pertahanan secara kimia atau memiliki kandungan senyawa fenolik sebelum diinfeksi oleh fungi mikorisa.

Gambar 1a dan 1b menunjukkan bahwa ekstrak dari akar pohon bermikorisa dan semai bermikorisa umur 4 minggu nilai serapan absorbansi yang lebih tinggi (0,315 dan 0,324 per gr akar/ml etanol) dari pada ekstrak akar tidak bermikorisa (0,221 dan 0,187 per gr akar/ml etanol). Peningkatan nilai serapan absorbansi fitoaleksin pada ekstrak akar bermikorisa diduga merupakan tanggapan tanaman terhadap infeksi fungi simbion dengan memproduksi atau meningkatkan konsentrasi senyawa penghambat (antifungal). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Marx (1972) bahwa infeksi akar *Scot pine* (*Pinus sylvestris*) oleh fungi simbion menghasilkan produksi dan akumulasi terpen dan sesquiterpen volatil dalam konsentrasi lebih dari 8 kali lebih besar dibanding di akar tidak bermikorisa.

Tabel 1. Nilai rerata persentase infeksi fungi mikorisa semai tusam (*P. merkusii*) umur 8 minggu setelah diinokulasi fungi mikorisa dan patogen

Sumber variasi	Rerata (%) ^{*)}	SD
Tanah tidak bermikorisa	P ₀ 4,60	3,81 4,55
	P ₁ 5,41	
	P ₂ 27,62	4,79 20,10
Tanah bermikorisa	P ₀ 24,70	
	P ₁ 19,86	13,19 3,19
	P ₂	

Keterangan : P₀ : tanpa patogen ; P₁ : *Fusarium* sp.; P₂ : *R. solani*

^{*)} tiga kali ulangan

Semai yang tidak ditanam pada tanah bermikorisa, menunjukkan adanya infeksi mikorisa meskipun persentasenya kecil. Hal ini karena spora fungi mikorisa yang berukuran mikroskopik mudah tersebar dengan perantaraan angin, hujan, serangga dan binatang kecil (Marx dan Kenney, 1982). Menurut Brundrett *et al.* (1996) spora fungi Biota Vol. XI (2), Juni 2006

Peningkatan konsentrasi fitoaleksin pada akar semai bermikorisa umur 4 minggu dapat juga terjadi karena adanya akumulasi fitoaleksin yang terbentuk akibat infeksi fungi mikorisa serta fitoaleksin yang terbentuk karena infeksi fungi *Fusarium* sp. penyebab penyakit rebah semai. Hal ini dapat dilihat dari fakta bahwa beberapa semai yang ditanam untuk diekstraksi, pada minggu pertama sampai minggu kedua mengalami kematian karena serangan *Fusarium* sp., sehingga diduga semai yang diekstraksi pada umur 4 minggu juga mendapat infeksi dari *Fusarium* sp. tetapi karena telah mendapat infeksi lebih dulu oleh fungi mikorisa dan terbentuk fitoaleksin sehingga tidak mengalami kematian. Hasil ini menunjukkan bahwa fitoaleksin merupakan salah satu penyebab terhindarnya semai dari penyakit rebah semai yang disebabkan oleh *Fusarium* sp. Gambar 1c dan 1d menunjukkan bahwa nilai absorbansi semai umur 6 dan 8 minggu juga terlihat lebih tinggi pada ekstrak akar semai yang tidak bermikorisa.

Pengaruh inokulasi fungi mikorisa terhadap persentase infeksi mikorisa dan perkembangan fungi patogen

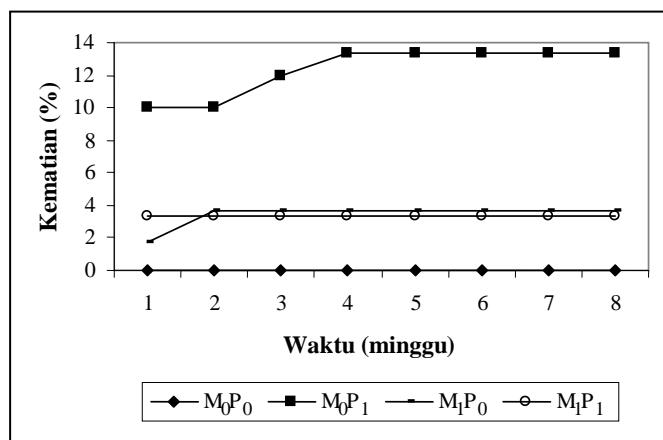
Semai tusam umur 8 minggu yang diinokulasi dengan tanah bermikorisa menunjukkan persentase infeksi mikorisa yang cukup tinggi (Tabel 1).

ektomikorisa mempunyai ukuran yang bervariasi, kurang lebih 4 µm-30 µm (biasanya berkisar antara 8 µm-15 µm). Mudahnya spora menyebarkan menyebabkan kesulitan untuk menghalangi terbentuknya mikorisa jika terdapat tanaman di dekatnya yang sudah bermikorisa (Hadi, 1989). Selain itu tingkat infeksi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti

pH, suhu, intensitas penyinaran dan kesuburan tanah. Nilai pH optimum untuk keberhasilan infeksi adalah pH agak asam dengan suhu sekitar 20-25°C (Marschner, 1986).

Pengaruh inokulasi fungi mikorisa terhadap perkembangan patogen penyebab

rebah semai diamati berdasarkan persentase kematian semai tusam yang diinokulasi dengan *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani*. Persentase kematian semai tusam umur satu sampai delapan minggu dapat dilihat pada Gambar 2 dan 3.



Gambar 2. Persentase kematian semai tusam (*P. merkusii*) yang diinokulasi *Fusarium* sp.

Keterangan : Mo : tanpa mikorisa Po : tanpa *Fusarium* sp.
M₁ : dengan mikorisa P₁ : dengan *Fusarium* sp.

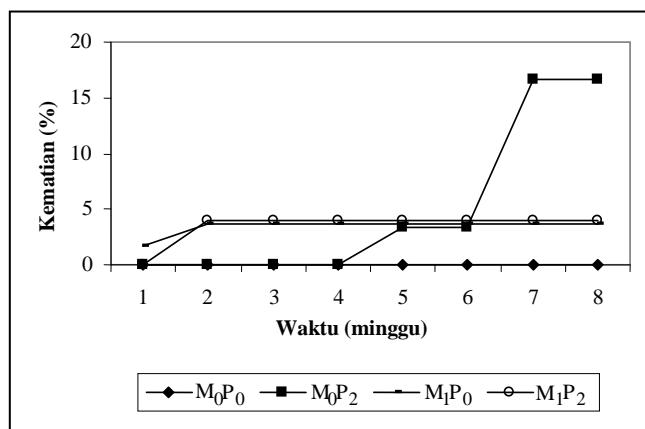
Hasil pengamatan persen kematian semai tusam yang diinokulasi fungi mikorisa dan *Fusarium* sp. dari yang tertinggi hingga terendah adalah M₀P₁ (13,33%), M₁P₀ (3,67%), M₁P₁ (3,33%), dan M₀P₀ (0%). Kematian semai terjadi sampai minggu keempat, yaitu pada M₀P₁.

Berdasarkan data spektrum-UV akar semai tusam tidak bermikorisa umur 4 minggu mempunyai kandungan fitoaleksin yang lebih rendah (0,187 per gram akar/ml etanol) dibanding ekstrak fitoaleksin dari akar semai tusam bermikorisa (0,324 per gram akar/ml etanol). Kematian semai yang terjadi sampai minggu keempat pada perlakuan M₀P₁ menunjukkan bahwa konsentrasi fitoaleksin pada akar semai tusam tidak bermikorisa umur 4 minggu belum mampu mencegah perkembangan *Fusarium* sp. Ketahanan terhadap penyakit terjadi jika kandungan fitoaleksin mencukupi untuk membatasi perkembangan patogen (Bailey, 1983), tetapi jika konsentrasiannya terlalu tinggi juga akan meracuni tanaman itu sendiri, sehingga produksi fitoaleksin hanya merupakan salah

satu mekanisme akar bermikorisa dalam meningkatkan ketahanan terhadap penyakit.

Dari gambar 3 diketahui bahwa inokulasi semai tusam dengan fungi mikorisa dan *Rhizoctonia solani*, mempunyai nilai persen kematian tertinggi pada M₀P₂ (16,67%), diikuti M₁P₂ (4%), M₁P₀ (3,67%) dan M₀P₀ (0%). Pada M₀P₂ proses kematian terjadi sampai tujuh minggu.

Berdasarkan data spektrum-UV pada akar bermikorisa, semai umur 6 minggu dan 8 minggu mempunyai kandungan fitoaleksin yang lebih rendah dibandingkan dengan akar semai tidak bermikorisa. Tetapi perkembangan penyakit rebah semai yang disebabkan oleh *Rhizoctonia solani* pada akar bermikorisa relatif rendah dibanding dengan akar tidak bermikorisa. Hal ini diduga karena aktifnya mekanisme perlindungan ektomikorisa yang lain dalam menghadapi serangan *Rhizoctonia solani*. Hasil penelitian terdahulu (Anggoro *et al.* 2005; Handayani *et al.* 2005) menunjukkan bahwa infeksi fungi mikorisa akan merangsang pembentukan kitinase dan 1-3 β glukosa yang keduanya mempunyai aktivitas antifungal.



Gambar 3. Persentase kematian semai tusam (*P. merkusii*) yang diinokulasi *Rhizoctonia R. solani*

Keterangan : Mo : tanpa mikorisa Po : tanpa *R. Solani*
M₁ : dengan mikorisa P₂ : dengan *R. solan*

Persentase kematian semai yang diinokulasi *Fusarium* sp. maupun *Rhizoctonia solani* pada tanah tidak bermikorisa lebih tinggi dibandingkan pada tanah bermikorisa (Gambar 2 dan 3). Hal ini menunjukkan bahwa fungi mikorisa mampu melindungi semai tusam terhadap serangan patogen. Jalali dan Jalali (1991) berpendapat bahwa semai pohon bermikorisa mempunyai ketahanan terhadap infeksi akar oleh patogen potensial. Menurut Zak (1994) dan Duchesne (1996) perlindungan terhadap patogen tersebut disebabkan antara lain oleh penghambatan kimia yang dikeluarkan akar selama simbiosis, perlindungan mikroorganisme daerah rhizosfer yang bersifat protektif dan barier fisik (mantel), yang akan menyebabkan patogen menjadi lebih sulit menginfeksi dan berkembang pada akar bermikorisa dibandingkan dengan akar tidak bermikorisa.

Keberadaan fungi mikorisa juga akan menyebabkan kesehatan tanaman menjadi lebih baik karena mikorisa juga mampu menghasilkan zat-zat biokimia yang bersifat antagonistik terhadap penyakit tumbuhan. Darusman *et al.* (1994) melaporkan bahwa mekanisme jenis *Scleroderma columnare* dan *Rhizopogon* sp. bersifat antagonistik terhadap fungi *Fusarium* dan *Rhizoctonia* sp.. Serangan *F. solani* dan *Rhizoctonia solani* terhadap *P. massoniana* yang berasosiasi dengan fungi mikorisa *Suillus grevillei* dan *Boletus* sp. menurun.

Kemampuan antagonisme fungi ektomikorisa ini menurut penelitian Zengpu *et al.* (1994) secara *in vitro* terdiri atas kemampuan antagonisme karena mengeluarkan senyawa volatil dan non volatil serta parasitisme fungi patogen oleh fungi mikorisa. Pengaruh senyawa volatil dan non volatil itu tidak hanya menimbulkan kerusakan hifa tetapi juga mempengaruhi pembentukan struktur reproduktif (konidia dan sporangia) dan juga menghambat perkecambahan spora.

Kesimpulan

1. Akar tusam (*P. merkusii*) bermikorisa maupun tidak bermikorisa menghasilkan senyawa fitoaleksin yang mempunyai spektrum yang sama pada panjang gelombang antara 203,2 nm sampai 204,6 nm.
2. Inokulasi fungi mikorisa meningkatkan persentase infeksi mikorisa dan menekan perkembangan *Fusarium* sp. dan *Rhizoctonia solani*.

Ucapan Terima kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Proyek Hibah Bersaing Perguruan Tinggi X tahun anggaran 2003 (No. Kontrak : 18/P2IPT/DPPM/PHBL/III/2003 tanggal 27 Maret 2003) yang telah memberikan dananya sehingga penelitian dapat berlangsung.

Daftar Pustaka

- Anggoro, M.D., Widyastuti, S.M. dan Margino, S. 2005. Isolasi dan Karakterisasi β -1,3-Glukanase Akar Semai Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) yang Berasosiasi dengan Jamur Mikorisa Ekto. *J. Perlind. Tan. Indonesia* 11(1).
- Badan Planologi Kehutanan. 2002a. *Data dan Informasi Kehutanan Propinsi Jawa Barat*. Pusat Inventarisasi dan Statistik Kehutanan, Badan Planologi Kehutanan, Departemen Kehutanan.
- Badan Planologi Kehutanan. 2002b. *Data dan Informasi Kehutanan Propinsi Jawa Timur*. Pusat Inventarisasi dan Statistik Kehutanan, Badan Planologi Kehutanan, Departemen Kehutanan.
- Baker, S.F. 1950. *Principles of Silviculture*. Mc Graw Hill Book Company. New York. 651p.
- Bailey, J.A. 1983. Biological Perspectives of Host-Pathogen Interactions. in: Bailey, J.A. dan B.J. Deverall. (Eds.). *The Dynamics of Host Defence*, pp. 233, Academic Press, New York.
- Brundrett, M., Bouger, N., Dell, B., Grove, T. and Malajczuk, N. 1996. *Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture*. ACIAR, Canberra.
- Darusman, L.K., Fakuara, Y., Achmad, Nur, A. dan Moeljohardjo, D.S. 1994. The Screening of Bioactive Component from the Exudate of Ectomycorrhizal Fungus. dalam: Proceeding of Second Symposium on Biology and Biotechnology of Mycorrhizae and Third Asian Conference in Mycorrhizae (ACOM III). Yogyakarta, 19-24 April 1994.
- Duchesne, L.C. 1996. Role of Ectomycorrhizae Fungi in Biocontrol. in: Pfleger, F.L. dan R.G. Linderman (Eds.). *Mycorrhizae and Plant Health*. APS Press. St. Paul, Minesota.
- Hadi, S. 1989. Ekofisiologi Fungi. dalam: *Patologi Hutan Perkembangannya di Indonesia*, Fakultas Kehutanan IPB, Bogor.
- Handayani, A., Widyastuti, S.M. dan Margino, S. 2005. Isolasi dan Karakterisasi Kitinase Akar Tusam (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese) yang Bersimbiosis dengan Fungi Ektomikorisa. *J. Perlind. Tan. Indonesia* 11(2).
- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Terjemahan Padmawinata, K. dan I. Sudiro. ITB. Bandung.
- Jalali, B.L. and Jalali, I. 1991. Mycorrhiza in Plant Disease Control. in: Arora D.K., B. Rai., K.G. Mukerji dan G.R. Knudsen. (Eds.). *Handbook of Applied Mycology, Vol. 1 : Soil and Plants*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Marx, D.H. 1972. Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annual Review of Phytopathology* 10 : 429-453.
- Marx, D.H. and Kenney, D.S. 1982. Production of Ectomycorrhizal Fungus Inoculum. in: Schenck, N.C.(ed.). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*, pp. 131-145, The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Marschner, H. 1986. *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. San Diego.
- Nair, K.S.S. dan Sumardi. 2000. Insect Pest and Diseases of Major Plantation Species. dalam: Nair, K.S.S.(ed.). *Insect Pests and Diseases in Indonesia Forest: An Assessment of The Major Threats, Research Efforts and Literature*, pp. 101, Center for International Forestry Research, Bogor.
- Nonaka, F. and Matsuzaki, M. 1976. Production of Hydroxyphaseollin in Soybean Leaves Infected with the Blight Bacterium, *Xanthomonas phaseoli* var. *sojae* and Its Antifungal Action. *Agricultural Bulletin of Saga University* 40: 2.
- Suvercha and Mukerji, K.G. 1991. Ectomycorrhiza. dalam: Arora D.K., B. Rai., K.G. Mukerji dan G.R. Knudsen. (Eds.). *Handbook of Applied Mycology, Vol. 1 : Soil and Plants*, pp. 187-215, Marcel Dekker Inc, New York.
- Zak, B. 1964. Role of Mycorrhizae in Root Disease. *Ann.Appl.Biol.* 44: 561.
- Zengpu, L., Junran, J. and Changwen, W. 1994. Antagonism between Ectomycorrhizal Fungi and Plant Pathogens. dalam: Brundett, M., B. Dell., N. Malajczuk dan G. Mingqin .(Eds.). *Mycorrhizas for Plantation Forestry in Asia*. Proceedings of an International Symposium and Workshop. P.R. China. 7-11 November 1994.