

Isolasi dan Penapisan Cendawan Endofit Akar Asal Ekosistem Mangrove Cagar Alam Pulau Dua Banten

Rida Oktorida Khastini✉, Pipit Marianingsih, Siti Gia Syauqiyah Fitri

Pendidikan Biologi, FKIP, Universitas Sultan Ageng Tirtayasa

Jl. Raya Jakarta Km 4 Pakupatan Serang Banten

✉E-mail: rida.khastini@untirta.ac.id

ABSTRACT

A little information about potential microorganism diversity especially root endophytic fungi associated with mangrove plants in Pulau Dua Sanctuary Banten. In order to have more information about it, this research aims were to isolate and screen the fungi. About 20 fungal isolates have been succeeded to be isolated. Fungal morphology characters including somatic and reproductive structure have been observed using microscope. The result showed that in general root endophytic fungi associated with mangrove plants have aseptate hyphae. Fungal colonies have color in range of greyish white to dark color and have slow growth rate. The other character of root endophytic fungi that have been observed was the production of phosphate degradation of enzyme.

Keywords: root endophytic fungi, Pulau Dua Sanctuary, morphology

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara megabiodiversitas yang memiliki keragaman hayati nomor dua paling banyak di dunia (Supriatna *et al.* 1998). Tingginya jumlah keanekaragaman hayati yang dimiliki ini merupakan aset yang tidak ternilai harganya yang dapat dimanfaatkan untuk kesejahteraan rakyat. Namun pemanfaatan potensi alam ini masih terkendala oleh kurangnya informasi dan data mengenai potensi keanekaragaman hayati tersebut. Hal ini dikarenakan masih terbatasnya kegiatan eksplorasi, identifikasi

maupun inventarisasi keanekaragaman hayati yang dilakukan.

Saat ini, banyak potensi alam di Provinsi Banten yang belum dieksplorasi secara mendalam, salah satunya adalah Cagar Alam (CA) Pulau Dua. Kawasan konservasi CA Pulau dua memiliki keanekaragaman hayati pada berbagai tipe ekosistem, dengan ekosistem dominannya berupa ekosistem payau (mangrove). Hutan mangrove merupakan ekosistem yang kompleks terdiri atas flora dan fauna daerah pantai, hidup sekaligus di habitat daratan dan air laut, diantara

batas air pasang dan surut. Peranan mangrove dirasakan yang sangat penting bagi kehidupan laut, antara lain yaitu sebagai penyambung antara daratan dan lautan; peredam abrasi, gelombang, dan badai yang ditimbulkan oleh perairan laut; dan sebagai habitat bagi satwa liar seperti monyet, ular, biawak, dan burung; tempat berkembangbiakan ikan; dan meminimalisir tercemarnya lautan oleh logam berat yang berasal dari daratan (Fachrul, 2008)

Selama ini informasi mengenai keanekaragaman hayati pada ekosistem mangrove di CA Pulau Dua yang terinventarisasi hanya berkisar pada populasi flora (Leksono & Firdaus, 2008) dan fauna (DKP-banten, 2007; Noor *et al.*, 2006), sedangkan informasi mengenai keanekaragaman mikroorganisme terutama cendawan endofit akar belum tersedia. Informasi keragaman mikroorganisme sangat penting untuk diketahui mengingat peranannya yang penting dalam ekosistem, selain itu informasi tersebut dapat dijadikan sebagai dasar untuk pengembangan potensi yang dimiliki cendawan endofit akar.

Cendawan endofit akar hidup dan mengkolonisasi jaringan akar tanaman pada ekosistem mangrove dan keberadaannya tidak mengganggu pertumbuhan maupun perkembangan tanaman inangnya. Berkaitan dengan peranannya pada tanaman, berbagai penelitian membuktikan bahwa keberadaan cendawan endofit akar dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman inang melalui mekanisme peningkatan penyerapan nutrisi atau dengan diproduksinya hormon pengatur tumbuh (Usuki & Narisawa, 2007; Rommert *et al.*, 2002). Berdasarkan penelitian terdahulu, cendawan endofit akar menunjukkan peranannya sebagai agen pengendali hayati dapat mengendalikan penyakit layu *Fusarium* pada tanaman sawi (Khastini *et al.*, 2012). Peranan lainnya dapat terlihat pada mekanisme resistensi tanaman terhadap faktor lingkungan yang tidak menguntungkan seperti kadar salinitas yang tinggi atau faktor cekaman lingkungan lainnya. Selain peranan yang menguntungkan pada tanaman inang, cendawan endofit akar juga kaya akan senyawa metabolit sekunder yang dapat diaplikasikan dalam industri pertanian maupun

farmasi. Senyawa anti mikroba, anti kanker, taxol merupakan senyawa bioaktif yang berhasil ditemukan pada berbagai genus cendawan endofit (Strobel *et al.*, 1996).

Pada ekosistem mangrove, cendawan endofit dapat terlibat dalam proses dekomposisi bahan-bahan organik. Keterlibatan cendawan endofit akar ini dapat dilihat dari produksi enzim penting yang digunakan untuk mendegradasi bahan-bahan yang kaya akan lignin. Menurut hasil penelitian Maria *et al.*, (2005), cendawan endofit yang berasosiasi dengan tanaman mangrove *Acanthus ilcifolius* dan *Acrostichum aureum* berpotensi untuk memproduksi senyawa anti mikroba dan enzim ekstraseluler.

Penelitian bertujuan untuk mengisolasi cendawan endofit akar yang hidup dan mengkolonisasi tanaman mangrove pada CA Pulau Dua Banten. Selanjutnya akan dilakukan seleksi terhadap isolat cendawan yang diperoleh. Setelah proses seleksi, dilakukan karakterisasi isolat cendawan endofit akar untuk mengetahui potensinya dalam memproduksi enzim ekstraseluler

METODE

Alat dan Bahan

Alat alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pisau, gunting, meteran, thermometer, alat-alat gelas, neraca analitik, autoklaf (Daihan, WACS 1060), *laminar air flow*, inkubator (Froilabo BS 125), dan mikroskop (Leica DM 500).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu NaOCl, alcohol 70%, spirtus, oatmeal, Bacto agar, MgSO₄·7H₂O, KH₂PO₄, NaNO₃, cornmeal agar [Becton-Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA], 8.5 g L⁻¹; malt extract (BD), 10 g L⁻¹; yeast extract (BD), 2 g L⁻¹; agar (BD), PDA, medium Pikovskaya dan antibiotik kloramfenikol.

Metode

- Penentuan Lokasi dan Pengambilan Sampel

Sampel akar dan rhizosfer tanah diambil dengan tiga kali ulangan pada empat stasiun yang mewakili zona vegetasi mangrove di Cagar Alam Pulau Dua, yaitu komunitas mangrove bagian Barat (transek I), komunitas mangrove bagian Utara (transek II), dan komunitas mangrove bagian Timur (transek III) dengan membuat garis

transek sepanjang 300 m. Kemudian pada masing-masing transek dibuat plot berbentuk bujur sangkar dengan ukuran 10 x 10 m² (Leksono & Firdaus, 2008). Sampel yang dikoleksi berupa potongan akar vegetasi mangrove dan rhizosfer tanah sedalam 20 cm dari permukaan tanah, dimasukkan kedalam kantung plastik dan diberi keterangan.

- Isolasi cendawan endofit akar

Cendawan endofit akar yang berasosiasi dengan tanaman mangrove diisolasi dengan metode isolasi secara langsung. Akar tanaman mangrove yang telah diambil, dicuci menggunakan air mengalir dan dipotong dengan ukuran panjang 1 cm. Akar kemudian disterilisasi permukaannya menggunakan alkohol 70% (v/v) selama 1 menit dan NaOCl 0.1% (v/v) selama 15 menit. Akar kemudian dikeringkan dengan menggunakan tissue steril. Setelah potongan akar tersebut benar-benar kering maka potongan akar ditempatkan dalam media agar dekstrosa kentang (PDA) yang mengandung antibiotik kloramfenikol 500 mg/l dan *rose bengal* 1% (b/v) untuk menghindari pertumbuhan atau kontaminasi bakteri. Media tersebut

diinkubasikan pada suhu ruang selama 7 hari. Miselium cendawan yang tumbuh selanjutnya dimurnikan sampai didapatkan isolat murni.

- Karakterisasi cendawan endofit akar

Isolat cendawan yang telah diisolasi dengan cara tersebut diatas diamati karakter morfologi baik secara makroskopis maupun secara mikroskopis. Cendawan ditumbuhkan dalam medium OMA (OMA; oatmeal, 10 g L⁻¹; and Bacto agar, 18 g L⁻¹, MgSO₄·7H₂O, 1 g L⁻¹; KH₂PO₄, 1.5 g L⁻¹; and NaNO₃, 1 g L⁻¹), CMMY (cornmeal agar [Becton-Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA], 8.5 g L⁻¹; malt extract (BD), 10 g L⁻¹; yeast extract (BD), 2 g L⁻¹; agar (BD), 7.5 g L⁻¹) dan PDA. Secara makroskopis karakter yang diamati meliputi; warna dan permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin), tekstur, zonasi, daerah tumbuh, garis-garis radial dan konsentris, warna balik koloni (*reverse color*), dan tetes eksudat (*exudates drops*). Pengamatan secara mikroskopis meliputi; ada tidaknya septa pada hifa, pigmentasi hifa, *clamp connection*, bentuk dan ornamentasi spora (vegetatif dan

generatif), bentuk dan ornamentasi tangkai spora, dan lainnya. Produksi enzim ekstraselular oleh isolat cendawan endofit akar asal ekosistem mangrove dilakukan dengan melarutkan substrat pada medium tumbuh cendawan yang digunakan. Isolat cendawan endofit akar diinokulasikan pada medium dan diinkubasi pada suhu ruang. Pengujian aktivitas pendegradasi fosfat dilakukan dengan menumbuhkan isolat cendawan endofit akar dalam medium Pikovskaya dan dilihat zona bening yang terbentuk jika cendawan tersebut memiliki aktivitas pendegradasi fosfat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penentuan Lokasi dan Pengambilan Sampel

Lokasi pengambilan sampel di kawasan Cagar Alam Pulau Dua dilakukan pada 3 stasiun utama (Gambar 1).

Pada vegetasi mangrove di Cagar Alam Pulau Dua terdapat 18 spesies mangrove, yaitu *Rhizophora apiculata*, *Rhizophora mucronata*, *Bruguiera cylindrical*, *Avicennia marina*, *Lumnitzera racemosa*, *Pemphis acidula*, *Excoecaria*

agallocha, *Thespesia populnea*, *Diospyros maritime*, *Sterculia foetida*, *Ixora timorensis*, *Aglaia elaeagnoidea*, *Buchanania arborescens*, *Allophylus cobbe*, *Caesalpinia bonduc*, *Sesbania sesban*, *Rivina humilis*, *Barleria prionitis*. Sampel akar maupun sampel tanah diambil dari rhizosfer tanaman mangrove yang dominan *Rhizophora apiculata*, *Avicennia marina*, dan *Diospyrosus maritime*. Walaupun banyak spesies vegetasi mangrove pada lokasi cagar alam Pulau Dua Banten namun pengambilan sampel akar tanaman mangrove dilakukan pada rhizosfer tanaman *Avicennia marina*. Hal ini dilakukan karena tanaman tersebut merupakan tanaman yang paling dominan di lokasi.

Pada stasiun 1, kondisi lokasi pengambilan sampel banyak tergenang air dengan keadaan tanah berpasir yang bercampur banyak karang-karang kecil. Pada stasiun 2 memiliki karakter lokasi yang mirip dengan stasiun 1, yang membedakannya hanyalah kondisi tanah tanpa adanya karang seperti halnya lokasi 1. Lain halnya pada stasiun 3, walaupun sebagian besar tergenang air tapi jumlah air tidak

sebanyak pada kedua stasiun yang lain. Kondisi parameter parameter lingkungan pada ketiga stasiun dapat terlihat pada Tabel 1.

Isolasi cendawan endofit akar

Sampel yang dikoleksi berupa potongan akar vegetasi mangrove dan rhizosfer tanah sedalam 20 cm dari permukaan tanah diisolasi dan ditumbuhkan dengan menggunakan media OMA, CMMY dan PDA yang ditambahkan antibiotic kloramfenikol. Sebanyak 20 isolat cendawan endofit dari ke-3 stasiun berhasil diisolasi (Tabel 2). Jumlah isolat cendawan endofit akar yang paling banyak diisolasi adalah berasal dari stasiun 3 sebanyak 8 isolat diikuti stasiun 2 sebanyak 7 isolat. Pada stasiun 1 jumlah isolat cendawan memiliki jumlah yang paling sedikit yaitu sebanyak 5 isolat. Perbedaan jumlah isolat ini kemungkinan disebabkan oleh kondisi lingkungan yang mendukung pertumbuhan cendawan. Cendawan endofit akar merupakan organism heterotrof yang aerob. Kondisi lokasi yang tergenang menyebabkan aerasi yang diperlukan oleh cendawan menjadi tidak terpenuhi. Hanya jenis cendawan tertentu saja yang dapat bertahan pada

kondisi oksigen yang rendah. Hal inilah yang menjadi penyebab sedikitnya jumlah cendawan yang diisolasi. Hasil ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Folstad (1966) yang menunjukkan laju pertumbuhan miselia dan sporulasi cendawan akan terhambat pada kondisi minim oksigen yaitu dibawah 1% Cendawan yang dapat berasosiasi dengan berbagai macam tumbuhan termasuk tanaman mangrove.

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap pertumbuhan koloni cendawan endofit akar yang berhasil diisolasi pada ketiga medium, menunjukkan bahwa cendawan tersebut tumbuh dengan baik pada media PDA diikuti CMMY dan OMA. Media PDA merupakan media rutin yang digunakan untuk pertumbuhan cendawan, mengandung sumber karbon dan nutrisi yang dibutuhkan cendawan. Media OMA merupakan media yang umumnya dipakai untuk penyimpanan kultur isolat cendawan dalam jangka panjang. Media ini mengandung nutrisi yang lambat didegradasi oleh cendawan, karena itu pertumbuhan cendawan pada media

ini tidak secepat pertumbuhan pada media PDA.

Karakterisasi cendawan endofit akar

a. Karakter morfologi

Pengamatan terhadap karakter morfologi isolat cendawan menggunakan metode tradisional sederhana dengan pewarnaan melalui pengamatan struktur somatik berupa hifa dan struktur reproduksinya. Berdasarkan hasil pengamatan terhadap 20 isolat cendawan endofit akar yang berhasil diisolasi, warna koloni pada media PDA berkisar dari putih abu-abu sampai gelap kehitaman. Karakter morfologi isolat umumnya adalah memiliki pertumbuhan yang sangat lambat ditandai dengan pertumbuhan diameter miselium yang berkisar 3 mm/hari. Beberapa isolat cendawan endofit lainnya membentuk zona konsentrik dan memiliki karakter miselium seperti beludru, masa miselium bagian tengah lebih jelas menunjukkan warna gelap masing-masing isolat sedangkan semakin ke luar diameter miselium warna semakin abu-abu. Ragam koloni cendawan endofit akar dapat dilihat pada Gambar 2. Pengamatan

mikroskopi pada struktur somatik cendawan tersebut menunjukkan hifa yang pada umumnya tanpa sekat (aseptat) dan beberapa isolat lainnya mempunyai hifa bersekat. Tidak ditemui hifa cendawan yang memiliki sambungan apit. Sambungan apit ini merupakan karakter identifikasi untuk cendawan yang dalam kelompok Basidiomiset. Menurut Rodrigues *et al.* (2009), cendawan endofit terbagi menjadi 4 kelas. Cendawan endofit yang termasuk dalam kelas ke 2 merupakan jenis cendawan askomiset dan hanya sedikit yang termasuk ke dalam Basidiomiset. Jenis cendawan yang termasuk dalam kelas kedua ini umumnya mengkolonisasi akar, batang dan daun tanaman dan dapat hidup pada lingkungan dengan cekaman yang tinggi.

Pengamatan terhadap struktur reproduksi seksual maupun aseksual dilakukan juga pada isolat-isolat cendawan endofit. Berdasarkan hasil pengamatan struktur reproduksi seksual tidak terbentuk pada isolat cendawan tersebut, yang nampak teramati hanyalah struktur reproduksi aseksual seperti konidium dan klamidospora yang memiliki variasi struktur yang berbeda seperti yang

terlihat pada Gambar 3. Pada umumnya struktur seksual cendawan endofit tidak pernah bisa untuk diamati, namun cendawan ini memiliki struktur aseksual yang mirip dengan spesies lainnya yang struktur seksualnya bisa diamati sehingga dapat dikelompokkan dalam grup yang sama (Clay, 1990) Terdapat beberapa isolat cendawan endofit yang tidak menghasilkan struktur reproduksinya sehingga sulit untuk mendeskripsikan karakter morfologi isolat tersebut dengan hanya pengamatan hifa atau miseliumnya saja.

Produksi enzim ekstraseluler

Sebanyak 4 isolat cendawan endofit akar asal Cagar Alam menunjukkan aktivitas dalam memproduksi enzim ekstraseluler yaitu enzim fosfatase. Hal ini dapat terlihat dari zona bening (Gambar 6) yang terbentuk pada saat ke-4 isolat cendawan endofit akar tersebut ditumbuhkan dalam medium Pikovskaya. Kemampuan cendawan endofit yang diisolasi dalam menghasilkan enzim fosfatase berkaitan erat dengan aktivitasnya di alam sebagai pelarut fosfat. Beberapa genus cendawan seperti *Penicillium*

dan *Aspergillus* memiliki peranan penting sebagai organisme rhizosfer untuk dapat melarutkan fosfat dan menyediakannya bagi tumbuhan inangnya (Khan et al. 2007). Begitu pula dengan peran cendawan endofit bagi tanaman mangrove. Fosfat yang diperlukan oleh tanaman mangrove yang terikat di tanah menjadi tersedia akibat aktivitas cendawan dan dapat digunakan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman tersebut

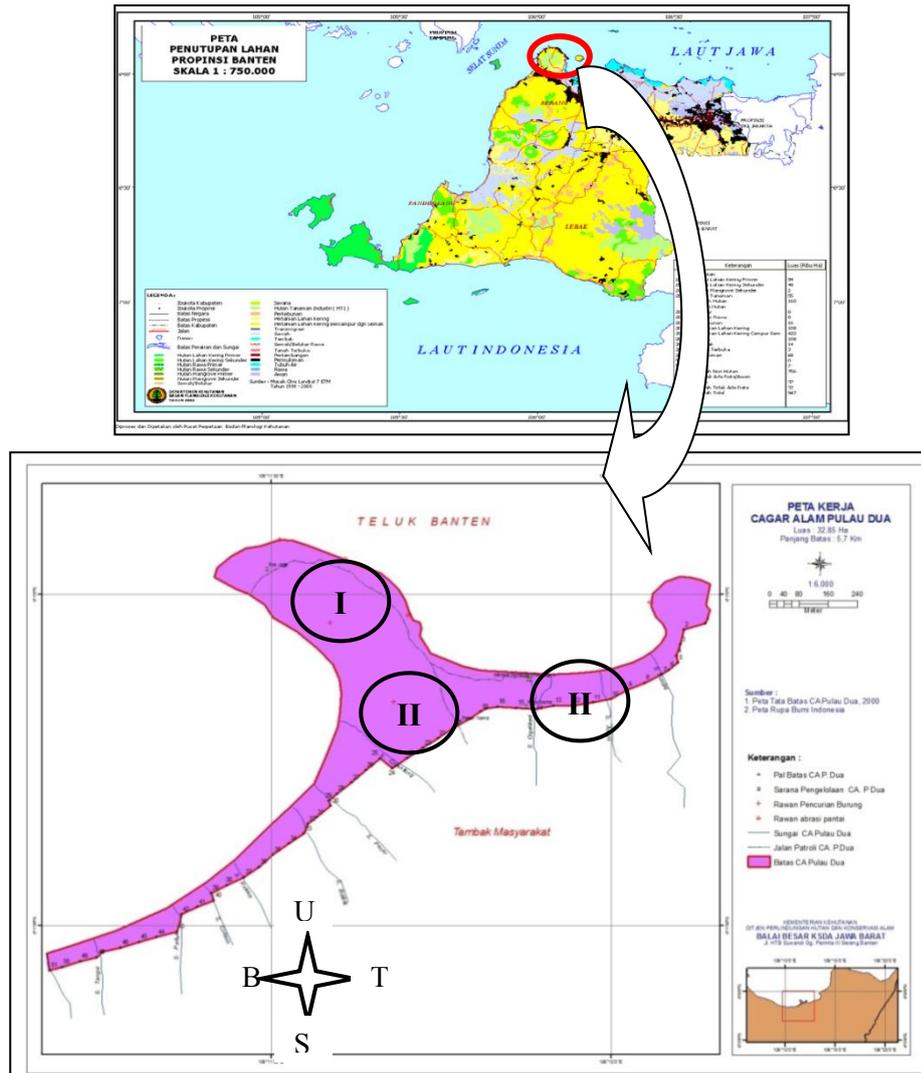
KESIMPULAN

Informasi mengenai keragaman hayati mikroorganisme yang potensial terutama cendawan endofit yang berasosiasi dengan tanaman mangrove Cagar Alam(CA) Pulau Duadi Provinsi Bantendiperlukan untuk mengembangkan potensi yang dimiliki cendawan endofit akar. Hasil isolasi cendawan endofit akar menunjukkan variasi dalam morfologi dan potensinya seperti dalam hal memproduksi enzim ekstraseluler fosfatase.

DAFTAR PUSTAKA

- Clay K. 1990. Fungal Endophytes of Grasses. Annual Review of Ecology. 21:275-97
- [DKP Banten] Dinas Kelautan dan Perikanan Provinsi Banten. 2007. Rencana Pengelolaan perikanan (RPP) Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Provinsi Banten. Serang: Dinas Kelautan dan Perikanan Banten

- Fachrul M.E. 2008. *Metode Sampling Bioekologi*. Bumi Aksara, Jakarta: viii + 198 hlm.
- Folstad M. N. 1966. Mycelial growth rate and sporulation of *Alternaria tenuis*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum* and *Rhizopus stolonifer* in low oxygen atmosphere. *Phytopathology* 56: 10098-1099
- Khan M.S., A Zaidi, and P.A. Wani. 2007. Role of Phosphate Solubilizing Microorganism in Sustainable Agriculture. *Agron. Sustain. Dev.* 27:29-43
- Khastini R.O., H Ohta, K Narisawa. 2012. The role of a dark septate endophytic fungus, *Veronaeopsis simplex* Y34, in *Fusarium* disease suppression in Chinese cabbage. *Journal of Microbiology.* 50 (4): 618-24.
- Maria G.L., KR Sridhar, and NS Raviraja. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology.* 1
- Noor, Y.R., M. Khazali and I N.N. Suryadiputra. 2006. *Panduan Pengenalan Mangrovedi Indonesia*. PHKA/Wetlands International-Indonesia Programme, Bogor: viii + 220 hlm
- Rodriguez R.J., J.F. White Jr JF, A.E. Arnold, and R.S. Redman. 2009 Fungal endophytes: diversity and functional role. *New Phytologist* 182-2:314-330
- Rommert A.K., M. Oros-Sichler, T. Lange, H.J. Aust, and B. Schulz. 2002. Growth promoting effect of endophytic colonization of larch seedlings (*Larix decidua*) with *Cryptosporiopsis* sp. and *Phialophora* sp. In: *Book of Abstracts, the Seventh International Mycological Congress*. P. 309 University of Oslo, Oslo.
- Strobel G.A., and D.M. Long. 1998. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. *ASM News* 64:263-268.
- Usuki F., and K. Narisawa, 2007. A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, *Heteroconium chaetospira*, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage. *Mycologia* 99 (2): 175–184

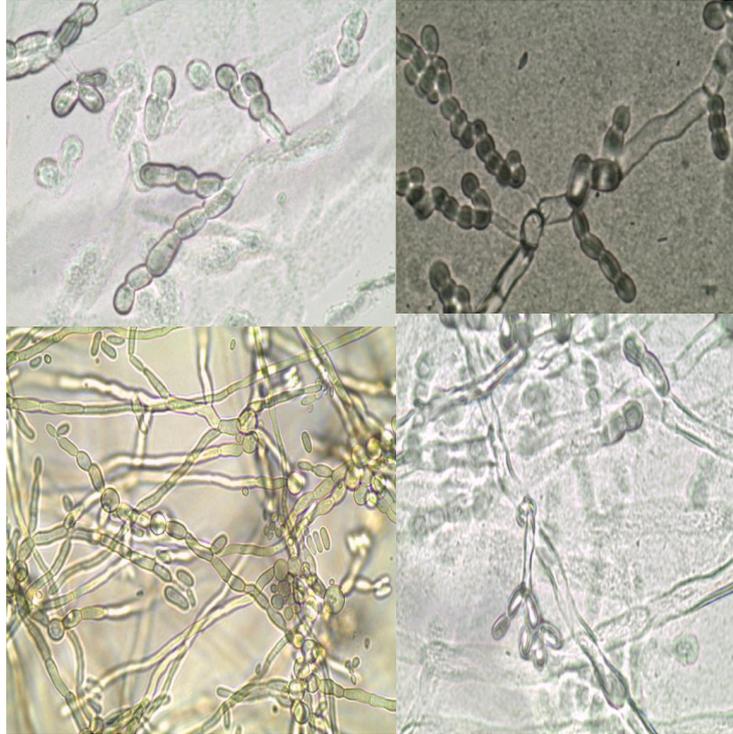


Gambar 1. Peta Lokasi Penelitian

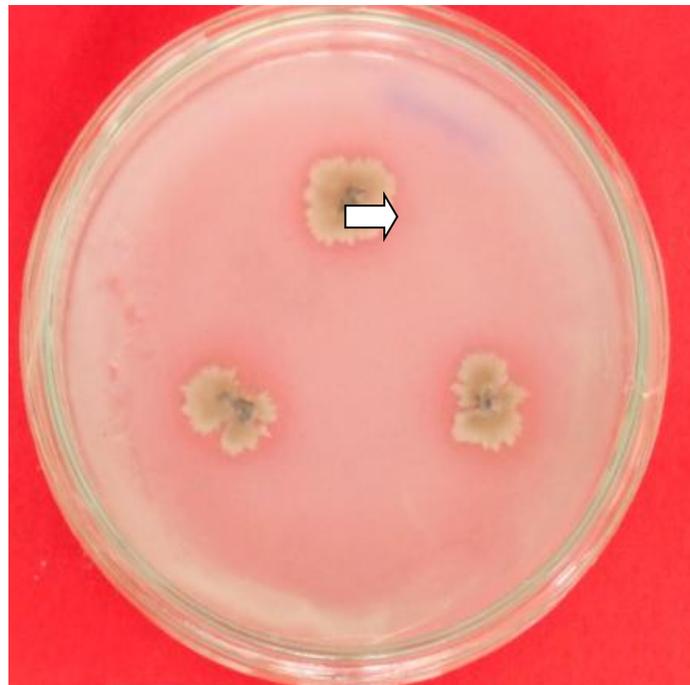
[Sumber: <http://www.dephut.go.id>]



Gambar 2. Ragam Koloni Cendawan Endofit Akar



Gambar 3. Variasi bentuk struktur reproduksi aseksual konidium



Gambar 4. Zona bening (tanda panah) yang terbentuk pada sisi terluar koloni cendawan endofit akar sebagai akibat enzim pendegradasi fosfat yang diproduksi

Tabel 1 Kondisi Parameter Lingkungan Pada 3 Stasiun Pengambilan Sampel

Stasiun Lokasi	Kondisi							Kelembaban
	Suhu			Salinitas		pH		
	Air	Tanah	Udara	Air	Tanah	Air	Tanah	
I	29,5°C	28,5°C	32°C	1‰	-	7,24	7,3	85%
II	29°C	28°C	32°C	1‰	-	7,27	5,28	79%
III	27°C	31°C	32,5°C	1‰	-	7,75	7,58	80%

Tabel 2. Jumlah isolat yang didapatkan berdasarkan Lokasi

Stasiun		
I	II	III
S1A11	S2A11	S3A11A
S1A13	S2A12A	S3A11B
S1A21	S2A12B	S3A31
S1A22	S2A22	S3A32
S1A41	S2A23	S3A33
	S2A41	S3A42
	S2A51	S3A43
		S3A51