

DISERTASI

**IDENTIFIKASI PATOGEN PENYAKIT AKAR PUTIH
PADA TANAMAN CENGKEH (*SYZYGIUM
AROMATICUM* L.) DAN PENGENDALIAN
SECARA HAYATI**



I WAYAN SUANDA

**PROGRAM STUDI DOKTOR (S3) ILMU PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2017**

DISERTASI

**IDENTIFIKASI PATOGEN PENYAKIT AKAR PUTIH
PADA TANAMAN CENGKEH (*SYZYGIUM
AROMATICUM* L.) DAN PENGENDALIAN
SECARA HAYATI**



I WAYAN SUANDA

1290471004

**PROGRAM STUDI DOKTOR (S3) ILMU PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2017**

DISERTASI

**IDENTIFIKASI PATOGEN PENYAKIT AKAR PUTIH
PADA TANAMAN CENGKEH (*SYZYGIUM
AROMATICUM* L.) DAN PENGENDALIAN
SECARA HAYATI**

Disertasi untuk Memperoleh Gelar Doktor
Pada Program Doktor, Program Studi Ilmu Pertanian,
Program Pascasarjana Universitas Udayana

I WAYAN SUANDA
NIM 1290471004

**PROGRAM STUDI DOKTOR (S3) ILMU PERTANIAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS UDAYANA
DENPASAR
2017**

Lembar Pengesahan

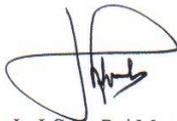
DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL..20..JULI.2017

Promotor,



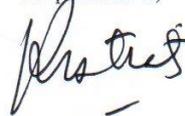
Prof. Dr. Ir. I Made Sudana, MS.
NIP. 19540618 198103 1 007

Ko-promotor I,



Prof. Dr. Ir. I Gede Rai Maya Temaja, MP.
NIP. 19621009 198803 1 002

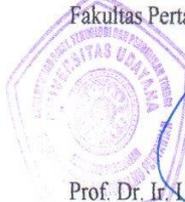
Ko-promotor II,



Prof. Dr. Dra. Ni Putu Ristiati, M.Pd.
NIP. 19500104 198003 2 001

Mengetahui

Ketua
Program Doktor (S3) Ilmu Pertanian
Fakultas Pertanian Universitas Udayana,



Prof. Dr. Ir. I Made Adnyana, MS.
NIP. 19560525 198303 1 002

Dekan
Fakultas Pertanian
Universitas Udayana,



Prof. Dr. Ir. I Nyoman Rai, MS.
NIP. 19630515 198803 1 001

PENETAPAN PANITIA PENGUJI DISERTASI

Disertasi ini Telah Diuji pada Ujian Tertutup

Tanggal 17 Maret 2017

Panitia Penguji Disertasi Berdasarkan Surat Keputusan Rektor Universitas

Udayana Nomor: 119/UN14.1.23/DL2017 tanggal 06 Maret 2017

Susunan Panitia

Ketua : Prof. Dr. Ir. I Made Adnyana, M.S.

Anggota : 1. Prof. Dr. Ir. I Made Sudana, M.S.

2. Prof. Dr. Ir. I Gede Rai Maya Temaja, M.P.

3. Prof. Dr. Dra. Ni Putu Ristiati, M.Pd.

4. Prof. Dr. Ir. I Gede Mahardika, M.S.

5. Dr. Ir. I Dewa Nyoman Nyana, M.Si.

6. Dr. I Gusti. Ngurah Alit Susanta Wirya, S.P., M.Agr.

7. I Putu Sudiarta, S.P., M.Si., Ph.D.

SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIAT

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : I Wayan Suanda
NIM : 129471004
Program Studi : Ilmu Pertanian
Judul Disertasi : Identifikasi Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dan Pengendalian secara Hayati

Dengan ini menyatakan bahwa karya ilmiah Disertasi ini bebas plagiat.

Apabila dikemudian hari terbukti plagiat dalam karya ilmiah ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai peraturan Mendiknas RI No. 17 Tahun 2010 dan Peraturan Perundang-undangan yang berlaku.

Denpasar, April 2017

Yang membuat pernyataan,



(I Wayan Suanda)

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadapan Ida Sanghyang Widhi Wasa/Tuhan Yang Maha Esa, karena hanya atas asung wara kerta nugraha-Nya disertasi dengan judul “Identifikasi Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dan Pengendalian secara Hayati” dapat diselesaikan.

Pada kesempatan yang berbahagia dan terhormat ini perkenankanlah penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. I Made Sudana, MS. selaku promotor yang dengan penuh perhatian telah memberikan dorongan, bimbingan, motivasi dan saran-saran selama penulis mengikuti Program Doktor, khususnya dalam menyelesaikan disertasi ini. Terima kasih yang sebesar-besarnya juga penulis sampaikan kepada Prof. Dr. Ir. I Gede Rai Maya Temaja, MP. dan Prof. Dr. Dra. Ni Putu Ristiati, M.Pd. selaku kopromotor atas bimbingan, motivasi dan arahnya kepada penulis.

Ucapan terima kasih juga penulis tujukan kepada Rektor Universitas Udayana Prof. Dr. dr. I Ketut Suastika, Sp.PD-KEMD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti Program Doktor di Universitas Udayana. Terima kasih juga penulis tujukan kepada Direktur Program Pascasarjana Universitas Udayana Prof. Dr. dr. A. A. Raka Sudewi, Sp.S(K) atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menjadi mahasiswa Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Udayana. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dekan Fakultas Pertanian Universitas Udayana Prof. Dr. Ir. I Nyoman Rai, MS. atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menjadi mahasiswa di Program Studi Doktor (S3) Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Ucapan terimakasih juga penulis haturkan kepada Ketua Program Studi Doktor (S3) Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana Prof. Dr. Ir. I Made Adnyana, MS. atas ijin yang diberikan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Program Studi Doktor (S3) Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Ucapan terima kasih pula penulis haturkan kepada Ketua Yayasan Pembina Lembaga Pendidikan (YPLP) Perguruan Tinggi IKIP PGRI Bali, Drs. I Gusti Bagus Arthanegara, S.H., M.H., M.Pd. dan Rektor IKIP PGRI Bali Dr. I Made Suarta, S.H., M.Hum. yang telah memberikan ijin dan

dorongan kepada penulis untuk mengikuti Program Doktor di Program Studi Doktor (S3) Ilmu Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Udayana.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Kepala Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Udayana, Kepala Laboratorium Tanah Fakultas Pertanian Universitas Udayana dan Yayasan Taman Pendidikan Ganesha Denpasar atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama penulis melakukan penelitian. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Kepala Pusat Penelitian Biologi bidang Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong atas bantuan dan kerjasamanya dalam analisis dan identifikasi sampel, Kepala Pusat Penelitian Biologi bidang Botani LIPI Cibinong atas bantuan dan kerjasamanya dalam analisis sampel secara Mikroteknik, Kepala Pusat Penelitian Biologi bidang Anatomi Tumbuhan LIPI Cibinong atas bantuan dan kerjasamanya dalam analisis sampel dengan teknik SEM menggunakan mikroskop elektron.

Ucapan terima kasih yang tulus penulis sampaikan kepada penguji, yaitu: Prof. Dr. Ir. Gede Mahardika, M.S., Prof. Dr. Ir. I Made Adnyana, MS., Dr. Ir. I Dewa Nyoman Nyana, M.Si., Dr. I Gusti Ngurah Alit Susanta Wirya, S.P., M.Agr. dan I Putu Sudiarta, S.P., M.Si., Ph.D. yang telah banyak memberikan masukan, arahan, sanggahan dan koreksi, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan. Penulis mengucapkan terima kasih atas motivasi dan kerjasamanya kepada teman-teman yaitu: Dr. Drs. Ida Bagus Gede Darmayasa, M.Si., Ir. Ni Putu Pandawani, M.P., Ir. Ni Nyoman Darsini, M.Si., I Komang Juliarta, S.P., Putu Agus Apriastika, S.P. dan teman-teman di Program Studi Doktor Ilmu Pertanian angkatan 2012 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Pada kesempatan ini pula penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh guru dan dosen yang telah mendidik dan membimbing penulis dari Sekolah Dasar hingga Perguruan Tinggi. Penulis juga menghaturkan ucapan terima kasih yang tulus dan tak terhingga kepada Ayahanda I Wayan Rudita (almarhum), Ayahanda I Wayan Partana dan Ibunda Ni Wayan Kempu, yang telah mengasuh, membesarkan, memberikan tuntunan hidup dan dukungan moral serta membiayai pendidikan penulis. Ucapan terima kasih juga disampaikan penulis kepada istri Ni Wayan Ratnadi, S.Pd., M.Pd. serta Ananda Gede Arya Suandirat, S.Kom. dan Ni Made

Mitha Suandari, S.S., atas dukungan moral dan motivasi yang diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Semoga Ida Sang Hyang Widhi Wasa/Tuhan Yang Maha Esa selalu memberikan sinar suci dan melimpahkan rahmat-Nya kepada penulis serta semua pihak yang telah membantu penulis dalam pelaksanaan dan penyelesaian disertasi ini, dan semoga disertasi ini bermanfaat bagi kita semua.

Denpasar, 31 April 2017

Penulis,

ABSTRAK
IDENTIFIKASI PATOGEN PENYAKIT AKAR PUTIH
PADA TANAMAN CENGKEH (*Syzygium aromaticum* L.)
DAN PENGENDALIAN SECARA HAYATI

Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) merupakan tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi cukup tinggi. Salah satu penyakit yang menyerang tanaman cengkeh di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, dan Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng adalah penyakit akar putih yang pertama kali ditemukan pada tahun 2011. Tanaman cengkeh mati mendadak dengan gejala daun layu, kering dan gugur. Pada akar tanaman terdapat rizomorfa jamur berwarna putih. Berbagai upaya dilakukan untuk mengendalikan dan mencegah penyebaran patogen penyakit akar putih diantaranya eradikasi, kultur eknis dan penggunaan fungisida kimia sintesis, tetapi tidak memberikan hasil yang memuaskan. Perlu dilakukan penelitian tentang spesies patogen penyakit akar putih dan pengendalian dengan musuh alam dengan melibatkan mikroorganisme yang bersifat antagonis.

Isolasi patogen penyakit akar putih dari tanaman cengkeh sakit dilakukan secara *in vitro* dilanjutkan uji patogenitas. Pengamatan akar cengkeh yang terinfeksi patogen (kontrol) dengan metode mikroteknik tampak miselia patogen berwarna putih menempel di permukaan jaringan epidermis akar dan masuk ke jaringan kortek menuju jaringan empulur (*pith*) akar. Patogen diisolasi kembali untuk identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis serta identifikasi molekuler dilanjutkan dengan analisis filogeni, sehingga didapat patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh yaitu *Schizophyllum commune*. Isolasi mikroba antagonis dari rizosfer tanaman cengkeh dan duwet tanpa gejala penyakit, mendapatkan 37 isolat jamur yang terdiri dari: 32 isolat *Trichoderma* spp., 3 isolat *Aspergillus* spp., 1 isolat *Penicillium* sp. dan 1 isolat *Fusarium* sp. Isolat yang memiliki daya hambat >80% dijadikan kandidat antagonis, sehingga mendapatkan 5 (lima) isolat *Trichoderma* spp. yaitu: isolat (BK2), (BD1), (MB1), (JB1) dan (LC2).

Pengujian daya hambat 5 isolat kandidat antagonis terhadap luas koloni patogen menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) menggunakan RAL secara *in vitro* dan *Trichoderma* sp. isolat JB1 paling kuat yaitu 90,11%. Pertumbuhan tinggi bibit cengkeh, jumlah daun, berat basah akar, berat kering akar dan populasi *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata terhadap kontrol menggunakan RAK secara *in vivo* di rumah kaca, dianalisis secara kuantitatif menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA). Nilai tertinggi diperoleh pada perlakuan isolat JB1 serta penurunan intensitas penyakit mencapai 98,33%. Identifikasi morfologi *Trichoderma* sp. isolat JB1 dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi molekuler menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS), dilanjutkan analisis filogeni, sehingga didapat antagonis yaitu *Trichoderma asperellum*. Berdasarkan pengamatan ultra struktur dengan teknik SEM, hifa antagonis mendegradasi hifa patogen, sehingga strukturnya tidak utuh, maka mekanisme pengendalian *T. asperellum* yaitu: antibiosis.

Kata kunci: identifikasi molekuler, penyakit akar putih, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma asperellum*, antibiosis.

ABSTRACT
THE IDENTIFICATION OF WHITE ROOT DISEASE PATHOGEN
IN CLOVE PLANTS (*Syzygium aromaticum* L.)
AND THE BIOLOGICAL CONTROL

Clove plants (*Syzygium aromaticum* L.) is plantation crops that have fairly high economic value. One of the diseases that attacks clove plants in Unggahan Village, Seririt District, and Busungbiu Village, Busungbiu District, Buleleng was white root disease which was first discovered in 2011. The clove plants suddenly died with symptoms showing withered leaves, dry and fall. There were white rhizomorph fungus on the roots of the plants. Various efforts were used to control and prevent the spreading of the white root disease including eradication, technical cultures and the use of synthetic chemical fungicides, but did not give a satisfactory result. It needed research on the species of white root disease pathogens and the control with natural enemies that involve microorganisms which were antagonistic to pathogens.

The isolation of the white root disease pathogen from the diseased clove plants was done by *in vitro* followed by pathogenicity test. The observations of the clove's roots with pathogen-infected (control) using micro technique method showed white mycelia pathogen attached on the surface of the root epidermal tissue and into the cortical tissue towards the pith tissue (pith) of the clove plant's root in the control treatment. The pathogens were being re-isolated for the macroscopic and microscopic morphological identification and molecular identification followed by the analysis of phylogeny, resulting in getting the white root disease pathogens in clove plants which was *Schizophyllum commune*. The antagonistic microbes isolation from the rhizosphere of the cloves and duwet plants without symptoms of any diseases, earned 37 fungal isolates consisting of: 32 isolates of *Trichoderma* spp., 3 isolates of *Aspergillus* spp., 1 isolate of *Penicillium* sp. and 1 isolate of *Fusarium* sp. The isolates that have >80% inhibitory were used as antagonist candidates, so getting 5 (five) isolates of *Trichoderma* spp. namely: isolates (BK2), (BD1), (MB1), (JB1) and (LC2).

The inhibitory testing of 5 isolates antagonistic candidates against the extensive colonies of the pathogens showed significantly different on the 5% extent ($P < 0.05$) using RAL in *in vitro* way, and the *Trichoderma* sp. JB1 isolate showed the strongest, that was 90,11%. The high growth of clove seeds, leaves number; wet weight of roots, dry weight of roots and the population of *Trichoderma* spp. showed significantly different with the control using RAK in *in vivo* way in greenhouses, quantitatively analyzed using the *Analysis of Varian* (ANOVA). The highest score was obtained on the treatment of JB1 isolate and the reduction in the intensity of the disease reached 98.33%. The morphological identification of *Trichoderma* sp. JB1 isolates was conducted macroscopically and microscopically. The molecular identification based on using the *internal transcribed spacer* (ITS) part, continued by analysis of phylogeny, thus obtained an antagonist which was *Trichoderma asperellum*. Based on the ultra structure observation with SEM techniques, the antagonist hyphae destructed the hyphae of pathogens, so that the shape of the hyphae of pathogens was incomplete, that, the control mechanism of *T. asperellum* was antibiosis.

Key words: molecular identification, white root disease, *Schizophyllum commune*, *Trichoderma asperellum*, antibiosis.

RINGKASAN
IDENTIFIKASI PATOGEN PENYAKIT AKAR PUTIH
PADA TANAMAN CENGKEH (*Syzygium aromaticum* L.)
DAN PENGENDALIAN SECARA HAYATI

Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) merupakan salah satu jenis tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi cukup tinggi. Salah satu penyakit yang menyerang tanaman cengkeh adalah penyakit akar putih yang menyebabkan tanaman cengkeh mati mendadak dengan gejala menyerupai gejala penyakit layu pada tanaman mente dan tanaman karet yang disebabkan oleh jamur akar putih. Luas tanaman cengkeh yang terserang patogen penyakit akar putih hingga bulan Juli 2013 yaitu 1.413,03 ha di Kabupaten Buleleng dan serangan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh terus meluas di seluruh Kabupaten di Bali (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2013). Hasil survei pendahuluan yang dilakukan penulis tanggal 22 Maret sampai 5 Mei 2013 di kebun cengkeh petani di Subak Abian “Werdhi Amertha” Desa Unggahan Kecamatan Seririt dan Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu ditemukan tanaman cengkeh yang terserang patogen penyakit akar putih dengan persentase serangan di atas 50% dengan katagori serangan ringan, sedang dan berat dari 50 tanaman populasi yang diamati, mengacu pada skor intensitas serangan jamur akar putih pada tanaman karet oleh Hutagaol dan Melin (2005) serta tanaman mente oleh Tombe (2008). Penyakit akar putih pertama kali ditemukan pada tanaman cengkeh di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng pada bulan April 2011, tetapi belum diketahui spesies patogen tersebut.

Pengendalian dan pencegahan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh telah dilakukan dengan berbagai upaya, diantaranya penggunaan bibit sehat, eradikasi, kultur teknis dan pemberian fungisida kimia sintesis, tetapi tidak memberikan hasil yang memuaskan. Penggunaan pestisida kimia sintesis secara terus menerus dapat menimbulkan efek samping berupa pencemaran lingkungan dan berbahaya bagi manusia. Alternatif lain untuk mengendalikan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh adalah dengan memanfaatkan mikroba agensia pengendali hayati. Pengendalian dengan agensia hayati dilaporkan cukup efektif, namun belum ada yang melaporkan spesies mikroba antagonis sebagai agensia pengendali hayati untuk patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

Tujuan dari penelitian ini yaitu: 1) untuk menentukan spesies jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng, 2) untuk mengetahui jamur antagonis yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit yang dapat menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, 3) untuk mengetahui spesies jamur antagonis yang memiliki daya hambat terbaik (>80%) terhadap patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh dan 4) untuk mengetahui mekanisme kerja jamur antagonis dalam menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

Tanaman cengkeh yang menunjukkan gejala penyakit akar putih, bagian akar yang terinfeksi patogen diambil sebagai sampel untuk diisolasi di laboratorium. Pengujian patogenitas jamur patogen penyakit akar putih dilakukan pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca. Bibit cengkeh yang menunjukkan gejala penyakit akar putih pada uji patogenitas dibandingkan dengan gejala

penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di lapangan, bila menunjukkan gejala yang sama berarti patogen yang diisolasi pada tanaman cengkeh bergejala sakit di lapangan itu sebagai penyebabnya. Jamur patogen sebagai penyebab penyakit akar putih pada uji patogenitas, diisolasi kembali pada media PDA dan diberi nama isolat SK (isolat Seririt Koleksi). Pengamatan akar cengkeh yang terinfeksi patogen penyakit akar putih dilakukan dengan melakukan pencabutan bibit cengkeh dalam *polybag* pada percobaan di rumah kaca dan dilanjutkan dengan penentuan intensitas serangan penyakit. Mekanisme serangan jamur patogen pada akar bibit cengkeh yang terinfeksi patogen jamur akar putih dilakukan dengan metode mikroteknik dan pengamatan dengan mikroskop. Hasil pengamatan dengan metode mikroteknik menunjukkan bahwa miselia patogen berwarna putih menempel di permukaan jaringan epidermis akar dan masuk ke jaringan kortek menuju jaringan empulur (*pith*) akar bibit cengkeh yang diberi perlakuan patogen jamur akar putih.

Identifikasi morfologi jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh isolat SK dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis menggunakan mikroskop. Identifikasi molekuler dilakukan melalui analisis rDNA pada daerah *Internal Transkript Spacer* (ITS) dengan menggunakan 2 primer yaitu primer ITS 5 (F: 5`- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3`) dan primer ITS 4 (R: 5`- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3`), yang kemudian dilanjutkan dengan analisis filogeni. Berdasarkan identifikasi makroskopis dan mikroskopis serta identifikasi molekuler dari patogen penyakit akar putih isolat SK menunjukkan jamur *Schizophyllum commune* dengan kesamaan identitas (*similaritas*) 99%.

Penelitian untuk mengisolasi jamur antagonis dilakukan di laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Sampel jamur antagonis didapat dari tanah rizosfer tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dan tanaman duwet (*Syzygium cumini* L.) tanpa gejala penyakit akar putih yang ada di delapan Kabupaten di Bali dan di areal perkebunan pusat penelitian LIPI di Desa Sampora, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Cibinong, Provinsi Jawa Barat. Pengujian daya hambat isolat antagonis terhadap luas koloni patogen isolat SK dilakukan dengan metode dua kultur (*dual culture method*), diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C, sehingga didapat 37 isolat jamur yang memiliki daya hambat >60% yang terdiri dari 32 isolat *Trichoderma* spp. meliputi: (26 isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan 6 isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman duwet); 3 isolat *Aspergillus* spp. yang meliputi: (1 isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan 2 isolat yang diisolasi dari rizosfer tanaman duwet); 1 isolat *Penicillium* sp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh serta 1 isolat *Fusarium* sp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh. Isolat antagonis yang memiliki daya hambat besar (>80%) terhadap luas koloni jamur patogen didapat 5 (lima) isolat yang dijadikan kandidat jamur antagonis yaitu: isolat BK2 yang diisolasi dari rizosfer tanaman duwet di Desa Ungasan, Kecamatan Kuta Selatan, Kabupaten Badung; isolat BD1 yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh di Desa Pelaga, Kecamatan Petang, Kabupaten Badung; isolat MB1 yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh di Desa Munduk, Kecamatan Banjar, Kabupaten Buleleng; isolat JB1 yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh di Desa Umejero, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng dan isolat LC2 yang diisolasi dari rizosfer tanaman duwet di perkebunan pusat penelitian LIPI di Desa Sampora, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Cibinong. Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dari 5 (lima) isolat yang berpotensi sebagai kandidat

antagonis terhadap jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh dengan daya hambat >80% adalah jamur *Trichoderma* spp. Isolat antagonis ini belum diidentifikasi secara molekuler sampai tingkat spesies, maka untuk penamaan awal diberi nama *Trichoderma* sp. isolat (BK2, BD1, MB1, JB1 dan LC2).

Pengujian daya hambat kelima kandidat antagonis isolat *Trichoderma* spp. terhadap luas koloni jamur patogen isolat SK secara *in vitro* dilaksanakan di laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Udayana. Percobaan ini dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 4 kali ulangan. Berdasarkan hasil analisis statistika yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5% menunjukkan daya hambat terhadap luas koloni patogen isolat SK oleh masing-masing isolat kandidat jamur antagonis yaitu: JB1 = 90,11%; BD1 = 89,59%; BK2 = 88,28%; LC2 = 88,02% dan MB1 = 86,98%.

Pengujian secara *in vivo* dilakukan di rumah kaca dari bulan April 2015 sampai Januari 2016 dengan mengaplikasikan kelima *Trichoderma* spp. kandidat antagonis yang telah dibiakan pada media jagung dan dedak, kemudian dicampurkan dengan media kompos, sehingga menjadi kompos *Trichoderma* sp. Jamur kandidat antagonis yang sudah dicampur dengan media kompos (kompos *Trichoderma* sp.) masing-masing diaplikasikan ke media tanah pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca dan 7 hari kemudian diinfeksi jamur patogen isolat SK pada pangkal akar bibit cengkeh yang telah dilukai dengan pisau di masing-masing perlakuan. Percobaan ini dilaksanakan di rumah kaca yang dirancang dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) yang terdiri atas perlakuan 5 (lima) isolat *Trichoderma* spp kandidat antagonis dan perlakuan jamur patogen *S. commune* isolat SK tanpa perlakuan antagonis (kontrol). Setiap perlakuan diulang sebanyak 4 kali dan masing-masing unit perlakuan terdiri dari 30 bibit cengkeh, sehingga membutuhkan 6x4x30 bibit cengkeh = 720 bibit cengkeh. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui pengaruh kelima isolat *Trichoderma* spp. terhadap bibit cengkeh yang dibandingkan dengan perlakuan kontrol di rumah kaca yang meliputi: pertumbuhan bibit cengkeh (berupa tinggi, jumlah daun, berat basah akar, berat kering akar), penurunan intensitas serangan penyakit dan populasi antagonis *Trichoderma* spp.

Berdasarkan hasil analisis statistika yang dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%, variabel daya hambat, tinggi bibit cengkeh, jumlah daun, berat basah akar, berat kering akar, intensitas serangan penyakit dan populasi koloni *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap perlakuan kontrol. Pengujian *Trichoderma* sp. isolat JB1 mampu menghambat pertumbuhan luas koloni jamur patogen *S. commune* sebesar 90,11% dan melebihi kemampuan antagonis isolat *Trichoderma* sp. pada perlakuan lainnya secara *in vitro*. Perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda sangat nyata ($P < 0,05$) pada peningkatan tinggi dan jumlah daun bibit cengkeh berturut-turut mencapai rata-rata 113,75 cm dan daun sebanyak 105,75 helai terhadap perlakuan kontrol yang tingginya hanya mencapai 74,19 cm serta banyak daun hanya mencapai 57,58 helai pada pengamatan III saat 180 hari setelah infeksi patogen (HSIP).

Pengamatan intensitas serangan penyakit dilakukan dengan cara mencabut 10 bibit cengkeh pada masing-masing unit perlakuan setiap 60 HSIP. Perlakuan

Trichoderma sp. isolat JB1 tidak menunjukkan kerusakan akar, sedangkan perlakuan kontrol menunjukkan tingkat kerusakan akar yang terus meningkat dari pengamatan I (60 HSIP), II (120 HSIP) sampai III (180 HSIP) hingga tingkat intensitas serangan mencapai 98,33 % (katagori kerusakan akar berat dengan skor 3). Hasil penelitian berat basah akar bibit cengkeh pada perlakuan yang diinfeksi patogen isolat SK dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. dari masing-masing isolat menunjukkan peningkatan secara drastis dan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 peningkatannya paling tajam yaitu 11,90 g. Bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen isolat SK tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. (kontrol) hanya menghasilkan berat basah akar 7,95 g saat pengamatan III (180 HSIP). Hal serupa juga terjadi pada berat kering akar bibit cengkeh perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat JB1 adalah 8,84 g dan bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen isolat SK tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. didapat berat kering akar yaitu 5,97 g saat pengamatan III (180 HSIP). Populasi *Trichoderma* spp. dalam tanah rizosfer bibit cengkeh di *polybag* masing-masing perlakuan menunjukkan tren peningkatan pada setiap pengamatan dan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 (117,75 koloni) dan tidak berbeda nyata pada taraf 5% ($P > 0,05$) dengan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BD1 (119,75 koloni) pada saat pengamatan III (180 HSIP).

Trichoderma spp. kandidat antagonis yang memiliki daya antagonis terbaik sebagai agensia hayati dalam pengendalian penyakit akar putih pada bibit cengkeh di rumah kaca yaitu isolat JB1. Mekanisme pengendalian antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 yaitu antibiosis yang diduga menghasilkan enzim selulase, kitinase dan proteinase untuk melisis miselium jamur patogen. Mekanisme penghambatan *Trichoderma* sp. isolat JB1 terhadap *S. commune* diamati melalui ultra struktur yang diambil dari mikroskop elektron dengan teknik SEM, hifa jamur antagonis mendegradasi hifa jamur patogen, sehingga struktur hifa patogen rusak (tidak utuh). Identifikasi secara molekuler dari jamur antagonis yang terbaik yaitu *Trichoderma* sp. isolat JB1 dilakukan melalui analisis rDNA dengan menggunakan primer *Internal Transkript Spacer* yaitu primer ITS 5 (F: 5`-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3`) dan primer ITS 4 (R: 5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3`), yang kemudian dilanjutkan dengan analisis filogeni. Berdasarkan identifikasi makroskopis dan mikroskopis serta identifikasi molekuler antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan *Trichoderma asperellum* dengan kesamaan identitas (*similaritas*) 99%.

DAFTAR ISI

	halaman
SAMPUL DALAM	i
LEMBAR PERSETUJUAN.....	ii
PENETAPAN PANITIA PENGUJI.....	iii
HALAMAN SURAT PERNYATAAN BEBAS PLAGIAT	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
RINGKASAN	x
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvii
DATAR GAMBAR	xviii
DAFTAR SINGKATAN	xx
DAFTAR LAMPIRAN	xxii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.3.1 Tujuan umum	7
1.3.2 Tujuan khusus	7
1.4 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1 Deskripsi Tanaman Cengkeh	9
2.2 Penyakit Akar Putih	12
2.3 Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh	14
2.3.1 Gejala penyakit akar putih pada tanaman cengkeh	14
2.3.2 Penularan jamur akar putih	15
2.3.3 Pengendalian patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.....	17
2.4 Mikroorganisme sebagai Agensia Pengendali Hayati Patogen Tular Tanah	18
2.4.1 Keunggulan dan kelemahan pengendalian hayati	19
2.4.2 Prospek pengembangan agensia hayati	20
2.4.3 Potensi <i>Trichoderma</i> spp. sebagai agensia hayati	22
2.4.4 Mekanisme kerja <i>Trichoderma</i> spp. dalam menghambat patogen tanaman	25
2.5 Identifikasi Jamur secara Molekuler	29
BAB III KERANGKA BERPIKIR, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	32
3.1 Kerangka Berpikir	32
3.2 Konsep Penelitian	36

3.3	Hipotesis	38
BAB IV	METODE PENELITIAN	39
4.1	Tempat dan Waktu Penelitian	39
4.2	Alat dan Bahan Penelitian	39
4.2.1	Alat	39
4.2.2	Bahan	40
4.3	Isolasi dan Uji Patogenitas Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh	40
4.4	Identifikasi Jamur Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh	42
4.4.1	Isolasi DNA genom Patogen	43
4.4.2	Amplifikasi DNA dengan PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	44
4.4.3	Sekuensing ITS dan analisis <i>sekuen</i> DNA.....	45
4.5	Isolasi Kandidat Jamur Antagonis	45
4.6	Uji Daya Hambat Kandidat Jamur Antagonis terhadap Luas Koloni Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh secara <i>In Vitro</i>	47
4.7	Penyiapan Bahan untuk SEM	48
4.8	Uji Potensi Kandidat Jamur Antagonis sebagai Agenia Pengendali Hayati pada Tanaman Cengkeh secara <i>In Vivo</i>	49
4.8.1	Pengamatan pertumbuhan bibit cengkeh.....	51
4.8.2	Penentuan intensitas serangan penyakit akar putih	52
4.8.3	Penentuan populasi <i>Trichoderma</i> spp.	53
4.9	Identifikasi Jamur Antagonis	54
4.9.1	Isolasi DNA genom Antagonis.....	54
4.9.2	Amplifikasi DNA dengan PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	55
4.9.3	Sekuensing ITS dan analisis <i>sekuen</i> DNA	56
4.10	Analisis Statistik	57
BAB V	HASIL DAN PEMBAHASAN	58
5.1	Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh....	58
5.1.1	Gejala penyakit akar putih	58
5.1.2	Hasil pengujian patogenitas	58
5.2	Identifikasi Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh	60
5.2.1	Identifikasi berdasarkan morfologi	60
5.2.2	Identifikasi molekuler jamur patogen	63
5.3	Karakterisasi Jamur <i>Schizophyllum commune</i>	67
5.4	Daya Hambat Kandidat Jamur Antagonis terhadap Luas Koloni Jamur Patogen <i>S. commune</i> Isolat SK secara <i>In Vitro</i>	71
5.5	Efektivitas <i>Trichoderma</i> spp. untuk Pengendalian Penyakit Akar Putih pada Bibit Cengkeh di Rumah	

Kaca.....	79
5.5.1 Pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh	79
5.5.1.1 pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap tinggi bibit cengkeh	79
5.5.1.2 pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap jumlah daun bibit cengkeh	83
5.5.1.3 pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap berat basah akar bibit cengkeh	86
5.5.1.4 pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap berat kering akar bibit cengkeh.....	88
5.5.2 Pengaruh <i>Trichoderma</i> spp. terhadap intensitas serangan penyakit	91
5.5.3 Populasi koloni <i>Trichoderma</i> spp.	94
5.5.4 Identifikasi jamur antagonis isolat JB1	97
5.5.4.1 Identifikasi berdasarkan morfologi	97
5.5.4.2 Identifikasi molekuler <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1 ...	100
5.6 Karakterisasi Jamur <i>Trichoderma asperellum</i>	104
5.7 Mekanisme Antagonis <i>T. asperellum</i> Isolat JB1 terhadap Jamur Patogen <i>S. commune</i> Isolat SK	105
5.8 Pembahasan Umum	113
5.9 Kebaharuan Penelitian	117
 BAB VI SIMPULAN DAN SARAN.....	 118
6.1 Simpulan	118
6.2 Saran	119
 DAFTAR PUSTAKA	 120
LAMPIRAN	140

DAFTAR TABEL

Tabel		halaman
5.1	Perbandingan persentase kemiripan gen jamur isolat SK dengan beberapa sekuen DNA di <i>Genbank</i> menggunakan program BLAST	66
5.2	Aktivitas penghambatan beberapa isolat kandidat jamur antagonis terhadap luas koloni jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh secara <i>in vitro</i> (diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C)	72
5.3	Rata-rata persentase daya hambat <i>Trichoderma</i> spp. terhadap luas koloni jamur patogen isolat SK pada PDA secara <i>in vitro</i> (inkubasi selama 5 hari)	75
5.4	Rata-rata tinggi bibit cengkeh setiap 30 HSIP (cm)	80
5.5	Rata-rata jumlah daun bibit cengkeh setiap 30 HSIP (helai).....	84
5.6	Rata-rata berat basah akar bibit cengkeh setiap 30 HSIP (gram).....	87
5.7	Rata-rata berat kering akar bibit cengkeh setiap 30 HSIP (gram)	89
5.8	Rata-rata intensitas serangan penyakit pada bibit cengkeh setiap 60 HSIP (%)	91
5.9	Rata-rata koloni <i>Trichoderma</i> spp. pada perlakuan antagonis setiap 60 HSIP (CFU x 10 ⁴ /gram tanah)	95
5.10	Perbandingan persentase kemiripan gen <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1 dengan beberapa sekuen DNA di <i>Genbank</i> menggunakan program BLAST.....	103

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	halamn
2.1	Tanaman cengkeh (<i>Syzygium aromaticum</i> L.)	11
3.1	Kerangka konsep penelitian	37
5.1	Tanaman cengkeh di lapangan bergejala penyakit akar putih...	58
5.2	Bibit cengkeh pada pengujian patogenitas (60 HSIP).....	59
5.3	Akar bibit cengkeh yang dicabut pada uji patogenitas (60 HSIP).....	60
5.4	Koloni biakan murni patogen penyakit akar putih pada media PDA	60
5.5	Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur patogen dan jamur akar putih	62
5.6	Karakterisasi morfologi mikroskopis hifa jamur patogen isolat SK	63
5.7	Amplifikasi PCR isolat SK menggunakan primer ITS 5 dan ITS 4.....	64
5.8	Pohon filogeni yang dibangun dari sekuen ITS dari <i>library Genbank</i> jamur patogen isolat SK	65
5.9	Miselia dan <i>basidiokarp</i> jamur patogen isolat SK tumbuh pada pangkal batang bibit cengkeh di <i>polybag</i>	68
5.10	Badan buah jamur patogen <i>S. commune</i> isolat SK menggulung.....	68
5.11	Isolat kandidat jamur antagonis yang diuji daya hambat dengan jamur patogen	74
5.12	Daya hambat <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1 terhadap jamur <i>S. commune</i> isolat SK	76
5.13	Grafik tinggi bibit cengkeh setiap 30 HSIP	81
5.14	Grafik jumlah daun bibit cengkeh setiap 30 HSIP	85
5.15	Grafik berat basah akar bibit cengkeh setiap 60 HSIP.....	88

5.16	Grafik berat kering akar bibit cengkeh setiap 60 HSIP.....	90
5.17	Grafik intensitas serangan penyakit akar putih pada bibit cengkeh setiap 60 HSIP	92
5.18	Grafik populasi koloni <i>Trichoderma</i> spp. di rizosfer bibit cengkeh di rumah kaca setiap 60 HSIP	97
5.19	Koloni <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1	98
5.20	Struktur mikroskopis hifa <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1.	99
5.21	Amplifikasi PCR <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1 menggunakan primer ITS 5 dan ITS 4	101
5.22	Pohon filogeni yang dibangun dari sekuen ITS dari <i>library Genbank</i> jamur <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB1.....	102
5.23	Hifa <i>T. asperellum</i> isolat JB1 dan <i>S commune</i> isolat SK diamati melalui SEM	107
5.24	Antagonis <i>T. asperellum</i> isolat JB1 merusak hifa patogen <i>S. commune</i> isolat SK diamati melalui SEM	108
5.25	Penampang melintang akar bibit cengkeh dan mekanisme Serangan pathogen.....	112

DAFTAR SINGKATAN

SINGKATAN	KETERANGAN
ha	: hektar
dpl	: di atas permukaan laut
μm	: mikrometer
μL	: mikroliter
mL	: mililiter
mm	: milimeter
cm	: centimeter
m	: Meter
g	: Gram
Kg	: Kilogram
KK	: Kepala Keluarga
b/v	: berat per volume
b/b	: berat per berat
Fe^{3+}	: <i>Ferri</i>
rpm	: <i>rotation per menit</i>
sp.	: species
spp.	: species plural
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
TPC	: <i>Total Plate Count</i>
IAA	: <i>Indole Asetic Acid</i>
NAG	: <i>N-asetilglukosaminidase</i>
ETS	: <i>External Transcribed Spacer</i>

IGS	: <i>Intergenic Spacer</i>
NTS	: <i>Non Transcribed Spacer</i>
ITS	: <i>Internal Transcribed Spacer</i>
OPT	: Organisme Pengganggu Tanaman
RAK	: Rancangan Acak Kelompok
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RRIN	: <i>Rubber Research Institute of Nigeria</i>
HSIP	: Hari Setelah Infeksi Patogen
UV	: <i>Ultra Violet</i>
CMI	: <i>Commonwealth Mycology Institute</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
BNT	: Beda Nyata Terkecil
SPSS	: <i>Statistical Product and Service Solutions</i>
PDA	: <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	: <i>Potato Dextrose Broth</i>
MEA	: <i>Malt Extract Agar</i>
rDNA	: <i>ribosomal Deoxyribo Nucleic Acid</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
rRNA	: <i>ribosomal Ribo Nucleic Acid</i>
RNA	: <i>Ribo Nucleic Acid</i>
ddH ₂ O	: <i>double destilation H₂O</i>
TAE	: <i>Tris Acetate EDTA</i>
EDTA	: <i>Ethylenedianutatetrumacetic acid</i>
ITS	: <i>Internal Transcribed Spacer</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

BLAST	:	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
NCBI	:	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
bp	:	<i>base pair</i>
M	:	<i>Marker</i>
SEM	:	<i>Scanning Electron Microscope</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Tabel	Judul	halaman
1.	Intensitas penyakit akar putih pada penelitian bibit cengkeh di rumah kaca.....	140
2.	Miselium amur patogen di akar bibit cengkeh pada penelitian di rumah kaca	141
3.	Hasil BLAST-N <i>complete sequence</i> jamur patogen isolat SK...	142
4.	Hasil BLAST-N <i>complete sequence</i> antagonis <i>Trichoderma</i> sp. isolat JB	142
5.	Pengujian antagonis penyakit layu pada bibit cengkeh di rumah kaca	143

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dari famili Myrtaceae merupakan salah satu tanaman perkebunan penghasil rempah-rempah yang telah digunakan sebagai obat tradisional, bahan anestetik dalam dunia kedokteran dan banyak dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam farmasi. Pandey dan Singh, (2011), melaporkan bahwa bunga cengkeh dapat digunakan sebagai obat sakit perut dan obat sakit gigi. Cengkeh juga sebagai penghasil minyak atsiri yang digunakan untuk bahan baku industri farmasi maupun industri makanan, kosmetik, parfum, serta penghasil *eugenol* untuk mengendalikan hama dan penyakit pada tanaman (Phutut, *et al.*, 2013). Pemanfaatan bunga cengkeh menjadi semakin banyak, yaitu sebagai antibakteri, antijamur dan bahan anestetik (Akirotimi *et al.*, 2013).

Bunga cengkeh dimanfaatkan sebagian besar sebagai bahan baku pada industri rokok kretek (Yuliani dan Satuhu, 2012). Cengkeh sebagai bahan baku dalam pembuatan rokok kretek mempunyai peranan cukup penting dalam menunjang upaya peningkatan pendapatan Negara, karena memberikan kontribusi berupa cukai rokok yang rata-rata 98% dari penerimaan total cukai (Siregar dan Suhendi, 2006). Cengkeh yang memiliki banyak manfaat, menyebabkan cengkeh itu menjadi salah satu komoditas perdagangan dunia yang sangat dibutuhkan, sehingga cengkeh memiliki nilai ekonomi cukup tinggi (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012).

Cengkeh juga mempunyai nilai ekonomi cukup tinggi dalam komoditas perkebunan di Bali. Berdasarkan laporan dari Dinas Perkebunan Provinsi Bali (2014), bahwa bunga cengkeh kering yang memiliki kadar air 10-14% di pasaran harganya Rp 56.000/kg pada tahun 2010 dan harganya terus merangkak naik hingga mencapai Rp 100.000/kg sejak bulan Mei 2011. Pada bulan April 2016 bunga cengkeh kering harganya berkisar Rp 100.000 sampai Rp 120.000/kg (Nerda, 2016). Harga bunga cengkeh yang cukup tinggi di pasaran, menyebabkan petani cengkeh di Bali semakin bergairah memelihara kebun cengkeh dengan harapan produksinya dapat meningkat setiap musim panen. Kondisi yang menguntungkan petani seperti ini tidak berlangsung lama, karena secara tiba-tiba tanaman cengkehnya terserang patogen menyerupai jamur dengan gejala berupa daun tanaman layu, mengering dan akhirnya gugur. Pada bagian akar kelihatan benang-benang jamur (*rizomorfe*) berwarna putih yang menyerupai jamur akar putih penyebab penyakit akar putih pada tanaman mente.

Petani cengkeh di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt dan Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali merasa resah karena ribuan tanaman cengkeh yang masih produktif mengalami kematian secara tiba-tiba akibat serangan patogen penyakit akar putih pada tahun 2012. Sejumlah petani di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng melaporkan ke Dinas Perkebunan Kabupaten Buleleng dan Fakultas Pertanian Universitas Udayana, bahwa sekitar 986 ha (1 ha = 200 tanaman cengkeh), bila dikonversi menjadi 197.200 tanaman cengkeh di daerahnya mati karena penyakit akar putih (Partayasa, 2011).

Dinas Perkebunan Provinsi Bali (2013), melaporkan bahwa patogen penyakit akar putih yang menyerupai jamur akar putih, yang menyerang tanaman cengkeh di Bali mulai ditemukan pada bulan April 2011, namun belum diketahui spesies dari patogen penyakit akar putih tersebut. Lebih lanjut Dinas Perkebunan Provinsi Bali (2013) melaporkan luas tanaman cengkeh yang terserang penyakit akar putih di Kabupaten Buleleng hingga bulan Juli 2013 yaitu 1.413,03 ha (1 ha dikonversi 200 tanaman = 282.606 tanaman) dengan katagori, serangan ringan, sedang dan berat. Luas areal tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng pada tahun 2014 adalah 7.752 ha, dari luas areal tanaman cengkeh di Bali yaitu 15.419 ha (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2014).

Survei pendahuluan dilakukan penulis tanggal 22 Maret sampai 5 Mei 2013 di kebun cengkeh petani yang terletak di Subak Abian “Werdhi Amertha” Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng. Tanaman cengkeh yang terserang penyakit akar putih ditemukan dengan persentase serangan di atas 50% dengan katagori serangan ringan, sedang dan berat dari 50 tanaman cengkeh populasi yang diamati. Katagori serangan patogen pada tanaman cengkeh ini mengacu pada skor intensitas serangan jamur akar putih pada tanaman karet oleh Hutagaol dan Melin (2005) serta skor intensitas serangan jamur akar putih pada tanaman mente oleh Tombe (2008).

Laporan dari Penyuluh Pertanian Lapangan (PPL) dan informasi dari beberapa petani di Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng, bahwa tanaman cengkeh yang mati kebanyakan tanaman yang akan berbunga pada musim panen. Tanaman cengkeh yang masih kecil juga banyak ditemukan sudah terserang penyakit akar putih, bahkan ada yang sudah mati. Gejala yang

ditunjukkan yaitu daun cengkeh layu mendadak, kemudian mengering dan daun gugur. Pada akar tanaman cengkeh sakit tampak benang-benang jamur berwarna putih agak tebal (*rizomorf*) menjalar, sehingga akar tanaman cengkeh menjadi busuk dan berwarna hitam. Batang tanaman mengering dan akhirnya tanaman cengkeh mati.

Berbagai upaya telah dilakukan oleh petani untuk mengendalikan dan mencegah penyebaran patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, diantaranya penggunaan bibit sehat, eradikasi, sanitasi lingkungan dan pemberian fungisida kimia sintetis, tetapi tidak memberikan hasil yang memuaskan. Membersihkan sumber infeksi secara biologis dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroba dalam tanah yang bersifat saprofit untuk mempercepat penghancuran tunggul atau sisa tanaman yang telah mati.

Pengendalian patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh petani di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt dan Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng dilakukan dengan pemberian fungisida kimia sintetis seperti: Dithane M-45 80 WP., karena dianggap lebih praktis. Pemberian fungisida kimia sintetis yang terus menerus dapat meninggalkan residu yang meracuni manusia maupun ternak dan memunculkan populasi patogen yang lebih resisten, terganggunya organisme yang berguna serta mencemari lingkungan (Brimer dan Boland, 2003). Penggunaan agensia hayati yang bersifat antagonis terhadap mikroba yang bersifat patogen dan pemanfaatan biofungisida sebagai alternatif untuk mengurangi penggunaan fungisida kimia sintetis (Said, 2007).

Observasi yang dilakukan penulis menemukan ada upaya yang dikembangkan oleh petani untuk menghindari serangan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh. Upaya yang telah diterapkan petani, salah satunya yaitu melakukan penyambungan bibit cengkeh dengan bibit duwet atau jamblang (*Syzygium cumini* L.) sebagai batang bawah, namun bibit cengkeh yang dihasilkan masih terbatas hanya untuk kebutuhan sendiri. Penggunaan bibit duwet sebagai batang bawah, menimbulkan keinginan penulis untuk mendapatkan mikroba yang bersifat antagonis dalam pengendalian hayati terhadap patogen penyakit akar putih dari daerah perakaran (rizosfer) tanaman duwet.

Mikroba antagonis sebagai agensia pengendali hayati yang mampu menekan pertumbuhan jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, kemungkinan terdapat di daerah perakaran (rizosfer) dari tanaman duwet. Oleh karena itu pencarian mikroba sebagai agensia antagonis terhadap patogen penyakit akar putih juga dilakukan di rizosfer tanaman duwet. Brimer dan Boland, (2003) menyatakan bahwa mikroba yang didapat pada daerah perakaran (rizosfer) tanaman sehat di sekitar tanaman bergejala sakit dapat digunakan sebagai agensia hayati pengendali patogen tanaman, yang aman bagi lingkungan dan organisme non target.

Beberapa keberhasilan pengendalian hayati sebagai salah satu cara pengendalian penyakit yang disebabkan oleh jamur patogen pada tanaman dan telah berkembang sebagai biofungisida, seperti pemanfaatan jamur yaitu *Trichoderma* sp. Samingan (2014) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. mempunyai peranan penting sebagai agensia biokontrol pada beberapa penyakit

tanaman pertanian dan perkebunan. Pendapat ini juga diperkuat oleh Gaigole *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa beberapa *Trichoderma* sp. telah ditemukan efektif terhadap patogen tular tanah pada tanaman. *Trichoderma* sp. sangat efektif untuk mengendalikan jamur patogen dan juga sebagai pengendalian biologis terhadap patogen pada tanaman yang ramah lingkungan (Eziashi *et al.*, 2007).

Trichoderma sp. sebagai agensia hayati memiliki kemampuan dalam kompetisi nutrisi, kompetisi ruang hidup dan menginduksi ketahanan tanaman inang secara sistemik (Chet, 1993). Lebih lanjut Calvet *et al.* (1990) juga melaporkan beberapa jenis *Trichoderma* sp. dapat mengurangi insiden patogen tular tanah pada kondisi alamiah. Lebih lanjut Soesanto (2009) menyebutkan penggunaan mikroba antagonis sebagai agensia pengendali hayati merupakan cara yang lebih murah dan aman terhadap lingkungan. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian tentang spesies dari patogen penyebab penyakit akar putih dan pengendalian dengan musuh alam yang melibatkan mikroba di dalam tanah yang bersifat antagonis terhadap patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka penulis mengisolasi dan mengidentifikasi patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh dan agensia hayati di lingkungan perakaran (rizosfer) tanaman cengkeh (*S. aromaticum* L.) dan tanaman duwet (*S. cumini* L.). Jamur antagonis yang ditemukan di rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit tersebut diharapkan dapat dimanfaatkan dalam pengendalian hayati patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di lapangan.

1.2 Rumusan Masalah

Beberapa permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini, diantaranya:

1. Jamur patogen apakah yang menyebabkan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng?
2. Jamur antagonis apa yang dapat diisolasi dari lingkungan rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit dapat menghambat patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh?
3. Spesies jamur antagonis apakah yang memiliki daya hambat terbaik terhadap pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh?
4. Bagaimanakah mekanisme kerja jamur antagonis dalam menghambat patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Untuk mengetahui patogen penyakit akar putih dan jamur antagonis yang dapat menghambat pertumbuhan dan perkembangan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

1.3.2 Tujuan khusus

1. Untuk menentukan spesies jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng.
2. Untuk mendapatkan jamur antagonis yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit.

3. Untuk mengetahui spesies jamur antagonis yang memiliki daya hambat terbaik terhadap patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.
4. Untuk mengetahui mekanisme kerja jamur antagonis dalam menghambat patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat, baik secara akademik maupun secara praktis, diantaranya:

1. Hasil penelitian ini secara akademik bisa menambah referensi tentang patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng. Identifikasi morfologi dan molekuler akan memberikan data tentang spesies jamur patogen dan spesies jamur antagonis penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.
2. Memberikan fakta ilmiah sebagai referensi tentang potensi jamur antagonis sebagai agensia hayati untuk mengendalikan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng.
3. Bagi masyarakat khususnya para petani cengkeh dapat menggunakan hasil penelitian ini sebagai salah satu alternatif dalam usaha mengendalikan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Deskripsi Tanaman Cengkeh

Cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) merupakan tanaman penghasil rempah-rempah dan bahan baku untuk farmasi serta kosmetik, banyak ditanam di perkebunan dan juga di pekarangan rumah (Puthut *et al.*, 2013). Tanaman cengkeh banyak ditanam di Kepulauan Maluku, sehingga dijuluki Kepulauan rempah-rempah (Turner, 2004). Tanaman cengkeh banyak juga ditanam di beberapa daerah di Indonesia termasuk juga di Bali. Tanaman cengkeh memiliki batang pohon besar dan berkayu keras, tinggi tanaman dapat mencapai 20-30 m dan tanaman cengkeh dapat hidup lebih dari seratus tahun (Lagousi, 2002).

Usaha budidaya tanaman cengkeh di Indonesia mayoritas dikelola oleh perkebunan rakyat. Luas areal tanaman cengkeh di Indonesia tahun 2010 adalah 470.045 ha, yang sebagian besar dikelola oleh perkebunan rakyat, yaitu 461.406 ha (98,2%) dan 8.639 ha (1,8%) dikelola oleh perkebunan negara dan perkebunan swasta (Direktorat Jenderal Perkebunan, 2012). Petani yang terlibat dalam usaha budidaya cengkeh sekitar 1.073.203 KK (Arisena, 2009). Selanjutnya Direktorat Jenderal Perkebunan, (2012) melaporkan bahwa produksi cengkeh secara nasional tahun 2010 yaitu 110.807 ton, terdiri dari 108.866 ton (98,2%) dari perkebunan rakyat serta 1.941 ton (1,8%) dari perkebunan yang dikelola negara dan swasta.

Produksi bunga cengkeh di Bali adalah 6.158,97 ton (2012); 3.849,73 ton (2013) dan 2.804,48 ton (2014) dengan luas areal berturut-turut 15.554 ha; 15.456 ha dan 15.419 ha yang tersebar di delapan Kabupaten di Bali (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2014). Perkebunan cengkeh paling luas terdapat di Kabupaten

Buleleng yaitu sekitar 7.752 ha (44,98%) yang tersebar di beberapa sentra perkebunan milik petani yang terdapat disemua kecamatan, seperti: di Kecamatan Busungbiu, Kecamatan Seririt, Kecamatan Banjar, Kecamatan Kubutambahan, Kecamatan Tejakula, Kecamatan Sukasada, Kecamatan Sawan dan Kecamatan Buleleng (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2014).

Menurut Tjitrosupomo (2000), cengkeh memiliki sinonim yang binomial yaitu *Eugenia aromatica*. Selanjutnya Chaeieb *et al.* (2007), melaporkan bahwa tanaman cengkeh dapat diklasifikasikan yaitu:

Kingdom	:	Plantae
Sub kingdom	:	Tracheobionta
Super divisio	:	Spermatophyta
Divisio	:	Magnoliophyta
Klas	:	Magnoliopsida
Sub klas	:	Rosidae
Ordo	:	Myrtales
Famili	:	Myrtaceae
Genus	:	<i>Syzygium</i>
Spesies	:	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr.

Tanaman cengkeh dapat tumbuh di dataran rendah sampai di ketinggian 1.500 m di atas permukaan laut (dpl) (Yuliani dan Satuhu, 2012). Semakin tinggi tempat, pertumbuhan tanaman cengkeh semakin subur tetapi produksi bunga semakin sedikit (Ruhnayat dan Wahyudi, 2012). Pembungaan pada tanaman cengkeh optimal pada ketinggian tempat berkisar 600-900 m dpl dan mulai

berbunga pada umur 4-7 tahun (Muljana, 2007). Tanaman cengkeh (*S. aromaticum* L.) disajikan pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1
Tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.)

Faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap tanaman cengkeh antara lain adalah iklim, tinggi tempat dan jenis tanah (Muljana, 2007). Kemasaman (pH) tanah yang optimum berkisar antara 5,5-6,5 dan temperatur optimum 22-29°C tetapi masih bisa tumbuh pada temperatur 21-35°C (Suhaeni, 2007). Curah hujan yang optimal untuk pertumbuhan tanaman cengkeh adalah 1.500-4.500 mm/tahun (Yuliani dan Satuhu, 2012). Intensitas penyinaran 60-61% serta tidak ada angin kencang sepanjang tahun (Ruhnayat dan Wahyudi, 2012). Meningkatkan kemampuan tanaman cengkeh untuk beradaptasi dengan lingkungan diperlukan rekayasa lingkungan tumbuh yang sesuai (Muljana, 2007). Kemampuan beradaptasi tanaman cengkeh terhadap lingkungan akan berdampak positif terhadap produksi. Lebih lanjut Muljana (2007) menyatakan rekayasa

lingkungan dapat dilakukan diantaranya melalui pemupukan dan pemanfaatan mikroba dalam tanah.

2.2 Penyakit Akar Putih

Penyakit akar putih ditemukan pertama kali oleh Ridley pada tanaman karet di Singapura pada tahun 1904 dan di Srilangka pada tahun 1905. Penyakit akar putih juga ditemukan di kebun tanaman karet di India Selatan, Pantai Gading dan Zaire, bahkan dilaporkan sudah menyebar ke seluruh perkebunan tanaman karet di Asia Tenggara (Johnston, 1989). Penyakit akar putih pada tanaman karet dan tanaman mente disebabkan oleh jamur akar putih (JAP) dengan nama ilmiah *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki atau *Rigidoporus microporus* (Swartz: Fr.) (Arya dan Temaja, 1996). Patogen jamur akar putih (JAP) ini lebih dikenal dengan *Fomes lignosus* (Klotzsch) (Semangun, 2000).

Penyakit akar putih yang disebabkan oleh jamur *Rigidoporus lignosus* merupakan penyakit yang memiliki kisaran inang luas dan menyerang beberapa jenis tanaman, seperti: tanaman karet, mente, teh, kopi, kakao, kelapa, kelapa sawit, mangga, nangka, ubi kayu dan jati (Semangun, 2001). Penyakit akar putih menimbulkan kerugian cukup besar pada tanaman karet di Thailand, Srilangka, India Selatan, Afrika Barat, Afrika Tengah dan Afrika Timur (Kaewchai dan Soyong, 2010). Lebih lanjut Kaewchai dan Soyong (2010) menyatakan kerugian yang ditimbulkan akibat serangan penyakit akar putih pada tanaman karet lebih besar dari serangan hama dan penyakit yang lain. Menurut Semangun (2001), bahwa patogen penyakit akar putih menyebabkan kerusakan yang parah pada tanaman karet yang masih muda dengan menyerang akar tunggang maupun akar

lateral melalui kontak langsung, sehingga akar menjadi busuk dan menyebabkan tanaman mudah rebah. Akar tanaman yang telah terinfeksi patogen ini akan menjadi sumber infeksi baru dari patogen penyakit akar putih

Johnston (1989) melaporkan bahwa gejala penyakit yang disebabkan oleh patogen dalam tanah dari jamur akar putih yaitu terbentuknya *rizomorf* berwarna putih yang menjalar sepanjang akar. Miselia dari *rizomorf* tersebut menempel kuat pada akar tanaman sehingga sulit dilepas (Munarni dan Widjajanti, 2011). Pendapat ini juga dipertegas oleh Manurung *et al.* (2015), bahwa akar tanaman yang terinfeksi patogen jamur akar putih terlihat adanya miselia jamur yang berbentuk benang berwarna putih menempel kuat dan sulit dilepaskan dari akar tanaman. Penyakit jamur akar putih (JAP) ini dapat menyerang tanaman masih muda, umur 3-4 tahun sampai tanaman menghasilkan atau produktif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Chatarina (2012) bahwa patogen penyakit jamur akar putih (JAP) dapat menyerang tanaman mulai dari pembibitan sampai tanaman dewasa.

Tanaman karet dan tanaman mente yang terserang jamur akar putih menunjukkan gejala daun tanaman kelihatan memucat, berwarna kuning, kemudian layu dengan tepi terlipat ke dalam, selanjutnya daun gugur dan ujung rantingnya mati, tanaman akan mati dalam waktu 6 sampai 12 bulan (Neliyati *et al.*, 2015). Semangun (2008) juga melaporkan pada tanaman karet yang terinfeksi patogen jamur akar putih menunjukkan gejala daun gugur yang disertai dengan matinya ranting-ranting tanaman. Tanaman karet yang terserang jamur akar putih akan tumbuh daun muda atau bunga dan buah lebih awal (Manurung *et al.*, 2015). Hal ini juga didukung oleh pendapat Hutagaol dan Melin (2005), bahwa tanaman

dewasa yang sakit, kadang-kadang membentuk bunga sebelum waktunya, namun tidak maksimal dan beberapa hari kemudian tanaman layu. Patogen jamur akar putih penyebab penyakit akar putih pada tanaman perkebunan seperti: tanaman mente, tanaman karet dan tanaman kelapa sawit telah banyak diteliti, tetapi patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh tidak ada dilaporkan.

2.3 Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh

Salah satu jenis penyakit yang menyebabkan kematian pada tanaman cengkeh adalah penyakit akar putih. Adanya serangan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh jamur patogen mempunyai arti ekonomi yang sangat penting, karena dapat menurunkan produksi cengkeh, bahkan menyebabkan tanaman cengkeh mati, sehingga sangat merugikan petani. Kerugian akibat serangan patogen jamur akar putih juga dialami oleh petani cengkeh di Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali. Penyakit akar putih pada tanaman cengkeh mengakibatkan kerugian ekonomi, tidak hanya disebabkan kehilangan produksi akibat kerusakan tanaman tetapi juga mahal biaya yang diperlukan dalam pengendaliannya, karena jamur patogen ini berada dalam tanah.

2.3.1 Gejala penyakit akar putih pada tanaman cengkeh

Infeksi awal oleh jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh sulit diketahui, karena patogen berada di dalam tanah (*soil borne*). Untuk mengetahui keberadaan jamur patogen penyakit akar putih ini perlu dilakukan pembukaan tanah di perakaran tanaman cengkeh. Berdasarkan hasil pengamatan di lapangan dan percobaan pendahuluan yang dilakukan di rumah kaca, bahwa

tanaman cengkeh yang terserang penyakit akar putih menunjukkan gejala menyerupai gejala penyakit yang disebabkan oleh jamur akar putih (JAP) pada tanaman karet dan tanaman mente.

Tanaman cengkeh yang terserang patogen penyakit akar putih di lapangan menunjukkan gejala berupa daun tanaman terlihat berwarna pucat dan kurang mengkilap (kusam), daun layu, kering dan bagian tepi atau ujung daun melipat ke dalam, akhirnya daun gugur. Tanaman cengkeh tampak hanya ranting yang mengering dan akhirnya ranting mati. Pada akar tanaman cengkeh terlihat *rizomorf* jamur berwarna putih menempel dari leher akar dan menjalar longitudinal sepanjang akar.

Percobaan pendahuluan yang dilakukan pada bibit cengkeh umur 12 bulan yang ditanam dalam *polybag* di rumah kaca menunjukkan gejala penyakit akar putih berupa daun kurang mengkilap (kusam), daun berwarna kuning, kemudian daun layu, kering dan bagian tepi atau ujung daun melipat ke dalam, akhirnya daun gugur, sehingga tinggal ranting yang lambat laun menjadi kering. Bibit cengkeh yang ditanam dalam *polybag* apabila dicabut, terlihat *rizomorf* jamur berwarna putih menempel dengan kuat dan menjalar longitudinal pada akar serabut. Akar serabut bibit cengkeh yang terinfeksi jamur patogen akan berubah warnanya menjadi hitam, akar menjadi lunak dan akhirnya membusuk. Bibit cengkeh juga terlihat membentuk akar serabut baru sebagai pengganti akar yang telah mati dan lapuk.

2.3.2 Penularan jamur akar putih

Penularan jamur akar putih (JAP) terjadi karena adanya kontak akar tanaman sakit dengan akar tanaman sehat dan sisa tunggul yang terinfeksi patogen

jamur akar putih (Semangun, 2008). Jamur akar putih merupakan patogen tular tanah (*soil borne pathogens*) yang sebagian besar siklus hidupnya berada di dalam tanah dan memiliki kemampuan untuk menginfeksi akar atau pangkal akar, sehingga dapat menyebabkan tanaman mati (Berlian *et al*, 2013). Kontak akar tanaman yang terinfeksi jamur patogen akan menular ke tunggul dan akar tanaman inang lain di dekatnya, sehingga akar dan tunggul yang terinfeksi jamur patogen menjadi sumber infeksi baru (Catharina, 2012).

Harni dan Amaria (2011) melaporkan agar dapat melakukan infeksi pada akar tanaman yang sehat, jamur patogen harus mempunyai alas makanan (*food base*) yang cukup. Jika *food base* berupa akar-akar yang halus dan tidak banyak mengandung kayu, seperti akar tanaman kacang penutup tanah, maka jamur tidak mampu menginfeksi akar tanaman yang sehat. Berbeda dengan jamur akar lainnya, jamur akar putih dapat menular dengan perantaraan *rizomorf* yang tumbuh pada permukaan akar, sebelum melakukan penetrasi (Semangun, 2008).

Laju infeksi patogen jamur akar putih pada akar tanaman ditentukan oleh kemampuan *rizomorf* jamur menjalar secara cepat (mm/hari) di permukaan akar tanaman (Semangun, 2000). Setelah mencapai akar tanaman yang sehat, *rizomorf* jamur patogen lebih dahulu tumbuh pada permukaan akar tanaman sebelum mempenetrasi (Harni dan Amaria, 2011). *Rizomorf* jamur patogen yang telah mencapai leher akar tanaman, maka patogen segera mengadakan penetrasi dengan miseliumnya dan menginfeksi akar tunggang tanaman. Johnston (1989) melaporkan bahwa infeksi lebih mudah terjadi melalui lentisel, tetapi adanya luka pada akar tanaman dapat meningkatkan terjadinya infeksi.

Penularan patogen jamur akar putih bisa melalui spora yang dihasilkan oleh badan buah. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Johnston (1989), bahwa penularan penyakit akar putih bisa juga melalui spora. Pada tunggul yang terinfeksi patogen jamur akar putih membentuk badan buah yang membebaskan spora ke udara dan jatuh pada tunggul pada tempat lain, sehingga sebagian spora berkecambah di permukaan tunggul dan menular ke perakaran tanaman yang kontak langsung, sehingga menjadi sumber infeksi baru (Berlian *et al*, 2013).

2.3.3 Pengendalian patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh

Pengendalian patogen penyakit akar putih yang menyerupai jamur akar putih (JAP) cukup sulit, karena patogen ini bersifat tular tanah. Patogen penyakit akar putih dapat bertahan sebagai sumber infeksi selama bertahun-tahun apabila ada tunggul tanaman sebagai alas makanan (*food base*), sehingga tidak mudah dalam pengendaliannya (Amaria dan Wardiana, 2014). Oleh karenanya perlu dilakukan tindakan pengendalian secara terintegrasi berupa kultur teknis (sanitasi kebun, penjarangan jarak tanam), pengendalian biologis dan mekanis (Sudirja, 2011), serta menjaga tanaman agar terhindar dari luka (Semangun, 2008).

Pengendalian penyakit pada tanaman dengan mengaplikasikan fungisida kimia sintetis akhir-akhir ini banyak mendapat perhatian, khususnya yang berkaitan dengan penyakit tanaman. Suwahyono (2009), menyatakan bahwa penggunaan pestisida kimia sintetis dapat membahayakan keselamatan hayati termasuk manusia dan terganggunya keseimbangan ekosistem. Adanya kekhawatiran masyarakat terhadap dampak negatif yang ditimbulkan dari penggunaan pestisida kimia sintetis, maka diperlukan alternatif lain untuk

mengendalikan penyakit tanaman yang lebih aman dan ramah lingkungan (Soesanto, 2008).

2.4. Mikroorganisme sebagai Agensia Pengendali Hayati Patogen Tular Tanah

Mikroorganisme atau sering disebut mikroba, yang didapat di sekitar perakaran tanaman sehat yang tumbuh di sekitar tanaman bergejala sakit, kemungkinan bisa digunakan sebagai agensia hayati pengendali patogen tanaman. Jamur *Trichoderma* sp. mudah didapat pada tanah di sekitar perakaran (rizosfer) tanaman. Beberapa spesies jamur *Trichoderma* mampu berperan sebagai agensia pengendali patogen penyebab penyakit pada tanaman yaitu *T. hamatum* dan *T. koningii* (Hutagaol dan Melin, 2005). Amin *et al.* (2010) juga melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. mempunyai sifat sebagai saprofit dan antagonistik terhadap beberapa patogen tular tanah dan patogen pada benih tanaman.

Penelitian di *Rubber Research Institute of Nigeria* (RRIN) untuk mengendalikan patogen jamur akar putih menggunakan 3 (tiga) jamur antagonis yaitu *Trichoderma* sp, *Penicillium* sp. dan *Aspergillus* sp. Hasil penelitian RRIN menunjukkan bahwa *Trichoderma* sp. paling efektif menghambat patogen jamur akar putih yaitu 81,85% diikuti oleh *Penicillium* sp. (65,27%), sedangkan *Aspergillus* sp. mempunyai daya hambat paling rendah yaitu 45,35% (Omorusi *et al.*, 2011). Pengendalian hayati oleh jamur antagonis dapat terjadi melalui beberapa mekanisme seperti: kompetisi, hiperparasit, antibiosis, induksi resistensi dan memacu pertumbuhan tanaman (Kloppet *et al.*, 1999).

2.4.1 Keunggulan dan kelemahan pengendalian hayati

Pengendalian patogen tular tanah dengan melibatkan agensia hayati mampu bertahan dalam waktu yang relatif lama, karena mikroba sebagai agensia hayati dapat tumbuh dan berkembang dengan cepat di lingkungan alami, tidak menimbulkan pencemaran lingkungan dan aman bagi manusia. Cook dan Baker (1989) melaporkan bahwa penggunaan agensia antagonis dengan satu kali pemakaian dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan patogen untuk jangka waktu yang relatif panjang tanpa menimbulkan pencemaran lingkungan. Benny *et al.* (2013), melaporkan penggunaan agensia pengendali hayati juga mempertimbangkan masalah kesehatan manusia, kekhawatiran akan kerusakan lingkungan, perkembangan dan ketahanan populasi organisme non target.

Menurut Nurhayati (2011), penggunaan agensia pengendali hayati untuk mengendalikan organisme pengganggu tanaman (OPT) mempunyai beberapa keunggulan, antara lain: 1) tidak berdampak negatif terhadap lingkungan, 2) aman bagi musuh alami OPT tertentu, 3) mencegah timbulnya ledakan OPT sekunder, 4) menghasilkan produk yang bebas residu senyawa kimiawi sintetis, 5) aman bagi kesehatan manusia, 6) tersedia di alam sekitar tanaman, sehingga mencegah ketergantungan petani pada pestisida kimiawi sintetis, dan 7) dapat menurunkan biaya produksi, karena pengaplikasian agensia pengendali hayati dilakukan satu atau dua kali dalam satu musim panen.

Kelebihan pemanfaatan *Trichoderma* sp. sebagai agensia pengendali hayati khususnya untuk patogen tular tanah yaitu dengan sekali aplikasi *Trichoderma* sp. akan tetap tinggal dan berkembang dalam tanah (Berlian *et al.*, 2013). Pengendalian hayati juga memiliki kelemahannya ialah reaksi efikasi

mikroba antagonis terhadap organisme sasaran lebih lambat dan daya simpan produk lebih singkat dibandingkan dengan pestisida kimiawi sintetis, yaitu masa kedaluwarsa biopestisida berkisar antara 6-12 bulan (Berlian *et al.*, 2013).

2.4.2 Prospek pengembangan agensia hayati

Perkembangan pengendalian penyakit tanaman akhir-akhir ini mulai tampak tertuju pada pencemaran lingkungan, sehingga penggunaan pestisida kimia sintetis mulai dibatasi. Penggunaan pestisida kimia sintetis banyak mendapat perhatian dunia dan sering kali dibicarakan dalam pertemuan ilmiah dan ditulis dalam bentuk artikel ilmiah, khususnya yang berkaitan dengan penyakit tanaman. Terjadinya keracunan pada hewan dan manusia, pencemaran air, tanah, udara, terjadinya *resistensi* dan *resurgensi* hama merupakan dampak negatif yang ditimbulkan oleh penggunaan pestisida kimia sintetis. Upaya untuk mengurangi penggunaan pestisida kimia sintetis sangat perlu dilakukan dalam menuju pertanian berkelanjutan yang ramah lingkungan.

Adanya kekhawatiran masyarakat dengan penggunaan pestisida kimia sintetis sebagai penyebab kerusakan lingkungan, maka petani harus menerapkan pertanian yang ramah lingkungan. Belakangan ini perhatian mulai tertuju pada sumber daya biologi dalam meningkatkan ketahanan tanaman melalui peran mikroba dalam tanah yang bersifat menguntungkan bagi tanaman, seperti jamur *Trichoderma* sp. Penggunaan *Trichoderma* sebagai biokontrol untuk menekan pertumbuhan jamur patogen pada tanaman di Vietnam telah dibuktikan kemampuannya. Berbagai spesies *Trichoderma* telah berhasil diisolasi dan dievaluasi keefektifannya sebagai agensia pengendali hayati penyakit pada tanaman dan diformulasi dalam bentuk biopestisida. Beberapa produk dari

Trichoderma telah dikomersilkan di Vietnam, diantaranya *Trico-DHCT*, *Promot Plus WP*, dan *NLU-Tri* yang digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman (Ha, 2010). Oleh karena itu pengendalian mulai dialihkan ke pengendalian biologis dengan melibatkan agensia hayati, salah satunya menggunakan *Trichoderma* sp.

Trichoderma sp. memiliki sifat yaitu mudah didapat, penyebarannya luas, tumbuh cepat, kompetitif dan menghasilkan spora yang berlimpah, sehingga mempermudah penyediaan jamur *Trichoderma* sp. sebagai bahan pengendali hayati (Alfiani, 1990). Wells (1998) juga melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. adalah suatu jenis mikroba yang baik sebagai agensia pengendali hayati karena terdapat di mana-mana, mudah diisolasi dan dibiakkan, tumbuh dengan cepat pada beberapa jenis substrat, mampu menghambat pertumbuhan patogen tanaman, jarang bersifat patogenik pada tanaman, bereaksi sebagai mikoparasit, bersaing dengan baik dalam hal makanan, tempat dan menghasilkan senyawa antibiotik.

Berlian *et al.* (2013), menyatakan bahwa *Trichoderma* sp. dapat menjadi hiperparasit pada beberapa jenis jamur patogen penyebab penyakit tanaman dan memiliki kemampuan tumbuh yang sangat cepat. Lebih lanjut Berlian *et al.* (2013), melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. dalam keadaan lingkungan yang kurang baik, miskin hara atau kekeringan, akan membentuk kladospora sebagai propagul untuk bertahan dan berkembang kembali jika keadaan lingkungan sudah menguntungkan. Nagayama *et al.* (2007) melaporkan bahwa *Trichoderma asperellum* merupakan agensia biokontrol yang sangat efektif terhadap beberapa patogen pada berbagai tanaman dan mulai dikembangkan untuk dikomersialkan sebagai biofungisida oleh beberapa perusahaan.

2.4.3 Potensi *Trichoderma* spp. sebagai agensia hayati

Indonesia yang terletak di daerah tropis memiliki kekayaan mikroflora yang sangat beragam. Diantara mikroflora tersebut ialah mikroba antagonis *Trichoderma* spp. Keberhasilan agensia pengendali hayati sebagai salah satu pengendalian patogen penyakit pada tanaman yang telah berkembang sebagai biopestisida. Beberapa jamur biokontrol yang telah dikembangkan antara lain adalah *Beauveria bassiana*, (antiserangga hama) (Sun dan Liu, 2006), *Trichoderma viride* (antijamur patogen pada tanaman) dan *Trichoderma harzianum* (antijamur patogen pada tanaman dan antinematoda) (Harman dan Kubicek, 1998). Lebih lanjut Anggraeni (2004) menyatakan bahwa *Trichoderma* sp. dapat digunakan sebagai agensia biokontrol melawan beberapa jamur petogenik tular tanah.

Trichoderma sp. adalah salah satu jamur yang sudah umum digunakan sebagai biokontrol penyakit tanaman (Rosa dan Herrera, 2009). Bagwan (2011) melaporkan bahwa *Trichoderma* seperti: *T. viridae*, *T. harzianum*, *T. hamatum* berpotensi sebagai biokontrol terhadap *Aspergillus flavus*, *A. niger* dan *Sclerotium rolfsii*. *Trichoderma* sp. banyak digunakan sebagai agensia hayati untuk mengendalikan patogen tular tanah dari *Ganoderma* sp. dan *Rigidoporus ligosus* (Jayasuriya dan Thennakoon, 2007). Lebih lanjut Pitt dan Hocking (1997) melaporkan banyak jenis *Trichoderma* menghasilkan enzim kitinase dan selulase yang dapat mendegradasi media yang kompleks. *Trichoderma* spp. dikenal sebagai agen pendegradasi bahan organik yang kuat. Kemampuan *Trichoderma* spp. sebagai pendegradasi tersebut didukung oleh aktivitas enzimatik dan karakteristik struktural yang dimilikinya.

Pembentukan kitinase oleh beberapa jenis *Trichoderma* telah dibuktikan oleh Lunge dan Patil (2012) dengan menumbuhkan jamur *Trichoderma* tersebut pada media selektif yang mengandung kitin. *T. harzianum*, *T. flavofuscum* dan *T. viride* yang diisolasi memiliki kemampuan membentuk kitinase pada media tersebut, yang dicirikan adanya zone bening di sekitar koloni. Hasil penelitian Rahman *et al.* (2011) yang telah mengisolasi beberapa jenis *Trichoderma* dari habitat yang berbeda ditemukan beberapa jenis *Trichoderma* memiliki kemampuan beradaptasi terhadap habitat dengan kondisi asam. Lebih lanjut Rahman *et al.* (2011) melaporkan bahwa, *T. harzianum* sp. dan strain *T. harzianuum* IMI392432 yang telah diidentifikasi menunjukkan efektif sebagai agen *bioconservation* limbah.

Potensi *Trichoderma* spp. sebagai jamur antagonis yang bersifat preventif terhadap serangan penyakit tanaman telah menjadikan jamur tersebut semakin luas digunakan oleh petani dalam usaha pengendalian organisme pengganggu tanaman (OPT). Jamur antagonis ini telah banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman dan 90% aplikasi yang telah dilakukan berasal dari berbagai macam strain *Trichoderma* (Benitez *et al.*, 2004). Hajieghrari (2008), melaporkan bahwa *T. harizianum*, *T. viride*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. roseum* dan *T. koningii* merupakan spesies yang sering digunakan sebagai agensia pengendalian hayati.

Widyastuti (2006) melaporkan hasil pengujian tiga spesies *Trichoderma* terhadap patogen *Ganoderma pilippii* yang diisolasi dari berbagai macam pohon dan hasilnya menunjukkan bahwa *T. reesei* paling efektif sebagai mikoparasit diikuti oleh *T. koningii* dan *T. harzianum*. Druzhinina *et al.* (2006) menyatakan *T.*

reesei merupakan salah satu spesies *Trichoderma* yang dianggap penting dalam bioteknologi, karena enzim-enzim yang dihasilkannya sudah banyak digunakan dalam proses industri.

Mikroorganisme dari genus *Trichoderma*, memiliki kemampuan sebagai pelindung tanaman, selain itu juga memiliki potensi dalam industri bioteknologi dan kesehatan, karena kemampuannya menghasilkan berbagai biokatalisator (enzim) hidrolitik ekstraselular dan juga antibiotik. Antibiotik dan antijamur yang telah diisolasi dari *Trichoderma* sp. dan *Gliocladium* sp. antara lain merupakan senyawa steroid seperti viridiol (Wipf dan Kerekes, 2003), azaphilon (Vinale *et al.*, 2006), peptaibol (Duclohier, 2007) dan peptaibiotik (Degenkolb *et al.*, 2008). Enzim kitinase (EC 3.2.1.14) dan *N*-asetilglukosaminidase (NAG) (EC 3.2.1.52) sangat penting untuk kebutuhan industri, juga dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. dan *Gliocladium* isolat Riau (Nugroho *et al.*, 2003).

Kitinase dan *N*-asetilglukosaminidase (NAG) digunakan dalam industri bioteknologi untuk memproses kitin menjadi berbagai turunannya (Binod *et al.*, 2007; Nagy *et al.*, 2007). Berbagai turunan kitin digunakan dalam produk kesehatan seperti benang untuk pembedahan (Muzzarelli *et al.*, 2005), produk farmasi, kosmetik, suplemen makanan dan penjernihan air (Sashiwa *et al.*, 2003). Begitu pentingnya spesies *Trichoderma* ini, sehingga seluruh genom dari spesies *Trichoderma* telah disekuens (Druzhinina *et al.*, 2006). Beberapa galur *Trichoderma* menghasilkan enzim β -1,3-glukanase (Sanz *et al.*, 2005) dan enzim amilase (Noguchi *et al.*, 2008). β -1,3-glukanase berpotensi untuk digunakan sebagai pasta gigi enzimatik, untuk menghambat pertumbuhan *streptococci* penyebab gigi berlubang (Ait-Lahsen *et al.*, 2001).

2.4.4 Mekanisme kerja *Trichoderma* spp. dalam menghambat patogen tanaman

Trichoderma spp. adalah jamur saprofit dalam tanah yang secara alami merupakan parasit dan menyerang banyak jenis jamur patogen penyebab penyakit pada tanaman atau memiliki spektrum pengendalian yang luas. Mekanisme penyerangan terhadap patogen tanaman antara lain adalah melalui proses mikoparasitisme, yang melibatkan produksi berbagai enzim (biokatalis) hidrolitik (Lorito *et al.*, 1993; Brunner *et al.*, 2005). *Trichoderma* spp. juga mensekresi senyawa yang bersifat sebagai antijamur, antibakteri dan antinematoda (Vinale *et al.*, 2006; Degenkolb *et al.*, 2008).

Vinale *et al.* (2008) juga menyebutkan beberapa isolat *Trichoderma* sp. mampu menghasilkan fitohormon seperti *Indole Acetic Acid* (IAA) dan enzim pendegradasi yang dapat mempercepat proses dekomposisi bahan organik dan selanjutnya menyediakan hara bagi tanaman. Cornejo *et al.* (2009) melaporkan hasil penelitiannya bahwa *T. virens* juga menghasilkan hormon auksin berupa IAA (*Indole Asetic Acid*) yang berperan dalam pemanjangan sel-sel akar yang menyebabkan serapan hara semakin tinggi. Serapan hara yang tinggi mempengaruhi pertumbuhan tanaman, karena nutrisi yang diperlukan tanaman terpenuhi, sehingga produksinya juga semakin bertambah.

Kerja sinergis antara jamur biokontrol dengan tanaman inang yang dilindunginya, terlihat dari kemampuan galur-galur *Trichoderma* biokontrol dalam menginduksi ketahanan tanaman untuk memproduksi senyawa-senyawa perlindungan diri. Hal ini dikarenakan *Trichoderma* sp. mempunyai sifat antagonistik terhadap beberapa patogen tular tanah dan patogen pada benih

tanaman (Perazzolli *et al.*, 2011). Chaube (2003) juga melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. disamping memiliki kemampuan kompetisi yang tinggi terhadap nutrisi dan ruang, juga dapat menghasilkan antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh mikroba patogen lain. Pendapat ini juga didukung oleh Sivasithamparam dan Ghisalberti (1998) yang menyatakan bahwa *Trichoderma* sp. dapat menghasilkan metabolit sekunder yang dapat berperan dalam kompetisi terhadap mikroba lainnya.

Mikroba biokontrol mempunyai mekanisme menekan pertumbuhan patogen pada tanaman dengan menggunakan mekanisme antagonisnya (Pal *et al.*, 2006). Menurut Soesanto (2008), bila pertumbuhan antagonis berlangsung cepat, maka dapat menyebabkan pengurangan kepadatan populasi atau produksi inokulum patogen, yang disebabkan oleh beberapa jenis mekanisme antagonis. Setiap agensia biokontrol memiliki mekanisme antagonis yang berbeda-beda dalam mengontrol pertumbuhan patogen tanaman. Beberapa mekanisme umum yang dapat terjadi dalam proses biokontrol antagonis terhadap patogen tanaman yaitu:

1. Kompetisi

Kompetisi merupakan mekanisme persaingan antara dua atau lebih mikroorganisme yang hidup pada sumber nutrisi sama yang jumlahnya terbatas (Soesanto, 2008). Pendapat ini juga didukung dari pernyataan Djafaruddin (2000) yang menjelaskan bahwa faktor penting yang menentukan aktivitas mikroba antagonis yang dapat mengendalikan patogen adalah memiliki kecepatan pertumbuhan yang tinggi, sehingga mampu berkompetisi dengan patogen dalam

hal makanan dan penguasaan ruang yang pada akhirnya dapat menekan pertumbuhan patogen.

2. Mikoparasit

Mekanisme mikoparasit diawali dengan kontak antara *Trichoderma* sp. dengan jamur inang (patogen), hifa *Trichoderma* sp. tumbuh memanjang, kemudian membelit atau tumbuh sejajar dengan hifa jamur inang dan membentuk semacam kait yang membantu penetrasi pada dinding sel jamur inang, selanjutnya mengeluarkan enzim kitinase untuk mendegradasi dinding sel jamur inang (patogen), yang kemudian menggunakan isi sel inang sebagai sumber nutriennya (Viterbo *et al.*, 2004).

Interaksi awal dari *Trichoderma* sp. yaitu dengan cara hifanya membelok ke arah hifa jamur inang (patogen) yang diserangnya. Mekanisme ini menunjukkan adanya fenomena respon kemotropik pada *Trichoderma* sp. karena adanya rangsangan dari hifa jamur inang (patogen) berupa senyawa kimia yang dikeluarkan oleh jamur inang. Ketika *Trichoderma* sp. sebagai mikoparasit itu mencapai jamur inang (patogen), hifanya kemudian membelit atau menghimpit hifa jamur inang tersebut dengan membentuk struktur seperti kait (*hook-like structure*), mikoparasit ini juga terkadang melakukan penetrasi miselium inang (patogen) dengan mendegradasi sebagian dinding sel inang. Bersamaan dengan proses masuknya jamur antagonis *Trichoderma* sp. melalui penusukan hifanya, jamur antagonis yang bersifat mikoparasit ini mengeluarkan enzim seperti kitinase dan β -1,3-glukanase yang akan menghancurkan dinding sel jamur inang (patogen).

Kemampuan *Trichoderma* sp. menghasilkan enzim kitinase sangat bervariasi antar strain, mungkin disebabkan perbedaan pada gen yang mengkodennya. Variasi ini tidak saja terlihat pada banyak enzim kitinase, tetapi juga jenis enzim kitinase yang dihasilkan (Nugroho *et al.*, 2003). Akibatnya, hifa jamur inang (patogen) mengalami kerusakan, protoplasmanya keluar dan jamur patogen akan mati.

3. Antibiosis

Antibiosis merupakan mekanisme yang digunakan oleh mikroba antagonis dalam menghambat pertumbuhan patogen dengan menggunakan senyawa antibiotika atau senyawa beracun yang dihasilkannya (Alabouvette *et al.*, 2006). Enzim litik yang disekresikan oleh mikroorganisme dapat menghidrolisis senyawa polimer termasuk kitin, protein, selulosa dan hemiselulosa (Pal *et al.*, 2006). Soesanto (2008), melaporkan bahwa jamur *Trichoderma* sp. merupakan salah satu kelompok mikroorganisme yang menggunakan mekanisme antibiosis dalam menghambat pertumbuhan patogen tanaman.

Widyastuti *et al.* (2001), juga melaporkan *Trichoderma* sp. melakukan penetrasi ke dalam dinding sel inang (patogen) dengan bantuan enzim pendegradasi dinding sel yaitu enzim kitinase, glukonase dan protease, selanjutnya menggunakan isi hifa inang sebagai sumber makanan untuk kebutuhan hidup. Enzim kitinolitik merupakan salah satu enzim yang menguraikan zat kitin sebagai penyusun tubuh jamur. Spesies *Trichoderma* seperti: *T. harzianum*, *T. aureoviride*, *T. viride* mampu menghasilkan enzim kitinolitik (Soesanto, 2008). Lebih lanjut Habazar dan Yaherwandi (2006) menyatakan bahwa Enzim kitinolitik dapat menyebabkan kerusakan sel dan kematian jamur patogen.

2.5. Identifikasi Jamur secara Molekuler

Identifikasi jamur melalui analisis molekuler diperlukan untuk memperkuat dan mendukung identifikasi morfologi. Identifikasi morfologi belum bisa menentukan suatu organisme sampai tingkat spesies. Oleh karena itu diperlukan identifikasi molekuler. Hal tersebut dikarenakan karakter molekuler lebih stabil terhadap pengaruh lingkungan (Serusiaux, 2009). Pendekatan molekuler dengan menggunakan sekuen DNA untuk mengidentifikasi jamur dengan analisis DNA *internal transcribed spacer* (ITS). Hal tersebut dikarenakan daerah ITS memiliki variasi sekuen yang tinggi karena daerah tersebut merupakan daerah *noncoding* yang memiliki laju mutasi lebih tinggi dari daerah *coding* (James *et al.*, 1996). Dengan demikian analisis molekuler berupa perbandingan sekuen daerah ITS rDNA dapat dilakukan pada beberapa spesies berkerabat dekat.

Keunggulan dan keberadaan daerah ITS telah dibuktikan dengan beberapa penelitian yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti, diantaranya Hermosa (2010) yang meneliti spesies *Trichoderma* sp. dari kompos dengan menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4. Hasil amplikon yang didapatkan sepanjang 560-600 bp. Elsalam (2010) juga berhasil mengidentifikasi jamur *Trichoderma* sp. yang didapat dari minyak di Saudi Arabia dengan menggunakan marker rDNA.

Molekul RNA di dalam sel suatu organisme ada dua kelompok yaitu kelompok RNA yang erat kaitannya dengan ekspresi gen yaitu mRNA, tRNA dan kelompok rRNA yang tidak berhubungan dengan *ekspresi* gen. Ribosomal RNA (rRNA) memiliki sifat stabil dan terdapat sekitar 83% dari keseluruhan RNA dalam sel. Secara fungsional, semua rRNA terlibat dalam produksi protein. Sekuen-sekuen dibagian tertentu terus berevolusi dan mengalami perubahan pada

level perubahan struktur primer sambil mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homolog (Gutell *et al.*, 1994).

Ribosomal Deoxyribo Nucleic Acid (rDNA) merupakan daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom. Pada organisme *eukaryotik*, rDNA terletak pada daerah nukleus dan mitokondria. Daerah rDNA dipisahkan antara satu dengan yang lainnya oleh suatu pembatas yang disebut *spacer*. Pada organisme *eukaryotik*, sub unit rDNA, baik yang besar maupun yang kecil dipisahkan oleh ETS (*External Transcribed Spacer*) dan IGS (*Intergenic Spacer*). Kedua pembatas tersebut kadang-kadang disebut NTS (*Non Transcribed Spacer*).

Jamur termasuk organisme *eukaryotik*, dimana pada rDNA jamur terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rDNA 18S, 5.8S dan 28S yang diantaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005). Lebih lanjut Gomez *et al.* (2002) dan O'Brien *et al.* (2005) menyatakan bahwa ITS merupakan suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada antar *prekursor* ribosomal sub unit dan dihilangkan pada proses *splicing* ketika RNA *precursor* tanda molekul yang struktural diproses ke dalam suatu ribosom.

Organisme *eukaryotik* mempunyai dua daerah ITS yaitu ITS 1 terletak di antara gen 18S dan gen 5.8S serta ITS 2 terletak di antara gen 5.8S dan gen 28S. Ketiga gen ribosom tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi. Jamil (2005) menyebutkan daerah ITS biasanya mengalami perubahan atau mutasi sehingga dapat berbeda atau bervariasi di antara spesies. Sekuen rDNA sub unit kecil 18S berkembang relatif lambat dan digunakan untuk studi hubungan kekerabatan pada tingkat spesies suatu organisme. Daerah ITS dan IGS

(*intergenic spacer*) pada unit pengulangan rDNA berkembang lebih cepat dan memungkinkan terjadinya variasi diantara spesies dan populasi.

Identifikasi molekuler dapat dilakukan menggunakan daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) DNA ribosomal (rDNA). Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler. Sekuen DNA pada daerah ITS rDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan daerah gen lainnya, sehingga akan bervariasi pada setiap spesies (White *et al.*, 1990). Hal ini dapat mempermudah dalam identifikasi spesies dengan membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuens DNA daerah ITS yang dimiliki suatu jamur dengan jamur lainnya. Data-data sekuens gen ITS yang dimiliki oleh jamur sebagian besar telah tersimpan pada *GenBank*. Jika dalam penelitian diketahui sekuens ITS pada jamur, maka data tersebut dapat dikonfirmasi menggunakan program BLAST pada *GenBank*, guna mengetahui kemiripan jamur yang diidentifikasi dengan data yang ada pada *GenBank* tersebut.

BAB III

KERANGKA BERPIKIR, KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Berpikir

Kendala yang dihadapi oleh petani dalam budidaya tanaman cengkeh salah satunya adalah patogen penyebab penyakit akar putih yang menyerang akar, sehingga menimbulkan kematian pada tanaman cengkeh. Jamur akar putih merupakan patogen tular tanah (*soil borne pathogens*) yang sebagian besar siklus hidupnya berada di dalam tanah dan memiliki kemampuan untuk menginfeksi akar tanaman (Berlian *et al*, 2013). Patogen penyakit akar putih menjadi masalah penting, karena bersifat parasit pada tanaman (Buzina *et al.*, 2001; Kuo, 2003) dan bersifat saprofit pada tanaman yang telah mati (Schmidt, 2006), memiliki kisaran inang luas dengan menyerang beberapa jenis tanaman (Semangun, 2001), sehingga dikhawatirkan penyebarannya sangat cepat di daerah-daerah yang menjadi sentra penanaman cengkeh.

Petani cengkeh di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt dan Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng, Provinsi Bali merasa resah karena ribuan tanaman cengkehnya yang masih produktif mengalami kematian secara tiba-tiba akibat serangan patogen penyakit akar putih pada tahun 2012. Tanaman cengkeh yang menunjukkan gejala penyakit akar putih, hingga bulan Juli 2013 di Kabupaten Buleleng seluas 1.413,03 ha, dengan jumlah tanaman = 282.606 tanaman cengkeh (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2013). Serangan berat penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh patogen yang menyerupai jamur akar putih hanya dilaporkan terjadi di Kabupaten Buleleng,

walaupun patogen penyakit akar putih ini sudah menyerang tanaman cengkeh di seluruh Bali dengan gejala ringan (Dinas Perkebunan Provinsi Bali, 2013).

Survei pendahuluan dilakukan penulis tanggal 22 Maret sampai 5 Mei 2013 di kebun cengkeh petani yang terletak di Subak Abian “Werdhi Amertha” Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng. Penyakit akar putih juga ditemukan pada tanaman cengkeh di Desa Busungbiu, Kecamatan Busungbiu, Kabupaten Buleleng. Hasil survei didapatkan tanaman cengkeh yang terserang patogen penyakit akar putih ditemukan dengan persentase serangan di atas 50% dengan katagori serangan ringan, sedang dan berat dari 50 tanaman cengkeh populasi yang diamati. Katagori serangan patogen ini mengacu pada skor intensitas serangan jamur akar putih pada tanaman karet oleh Hutagaol dan Melin (2005) serta tanaman mente oleh Tombe (2008).

Keberadaan patogen yang menyerupai jamur akar putih sebagai penyebab penyakit pada tanaman cengkeh menjadi sangat penting di Kabupaten Buleleng, yang memiliki sentra perkebunan cengkeh terluas di Bali. Penyakit jamur akar putih (JAP) ini dapat menyerang tanaman masih muda, umur 3-4 tahun sampai tanaman menghasilkan atau produktif. Hal ini sesuai dengan pernyataan Chatarina (2012) bahwa patogen penyakit jamur akar putih (JAP) dapat menyerang tanaman mulai dari pembibitan sampai tanaman dewasa.

Strategi pengendalian yang baik terhadap patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh belum ditemukan, maka dikhawatirkan terjadi peningkatan intensitas penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh patogen ini dimasa mendatang, sehingga menimbulkan kerugian yang sangat besar. Dinas Perkebunan Provinsi Bali (2013), melaporkan bahwa patogen penyakit akar putih

yang menyerupai jamur akar putih menyerang tanaman cengkeh di Bali mulai ditemukan pada bulan April 2011, namun belum diketahui spesies dari patogen penyakit akar putih tersebut.

Berdasarkan percobaan pendahuluan yang dilakukan pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca yang menunjukkan gejala penyakit akar putih ditemukan miselia jamur patogen berupa *rizomorf* berwarna putih menempel sangat kuat dan menjalar pada akar serabut bibit cengkeh. Tanaman cengkeh yang terinfeksi patogen penyakit akar putih berupa *rizomorf* berwarna putih menunjukkan gejala daun berwarna hijau gelap, kemudian daun mengering, daun gugur dan hanya tinggal ranting, akhirnya tanaman cengkeh mati. Hasil pengujian patogenitas menunjukkan bahwa jamur patogen berupa *rizomorf* berwarna putih ini menyebabkan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, tetapi belum diketahui spesiesnya dan hanya diberi nama jamur patogen isolat SK (isolat Seririt Koleksi). Identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dilanjutkan identifikasi molekuler untuk mengetahui spesies jamur patogen isolat SK, sehingga didapat jamur *Scizophyllum commune*.

Pengendalian patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh petani diantaranya penggunaan bibit sehat, eradikasi, sanitasi lingkungan dan pemberian fungisida kimia sintetis, tetapi tidak memberikan hasil yang memuaskan. Suwahyono (2009), menyatakan bahwa penggunaan pestisida kimia sintetis dapat membahayakan keselamatan hayati termasuk manusia dan terganggunya keseimbangan ekosistem. Oleh karena itu penulis ingin mencoba melakukan pengendalian hayati dengan menggunakan mikroba antagonis yang

diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) dan tanaman duwet atau jamblang (*S. cumini* L.) tanpa gejala penyakit.

Menurut Soesanto (2013), interaksi yang terjadi antara agensia pengendali hayati dan patogen tanaman biasanya berada di tanah dekat perakaran tanaman (rizosfer). Cook dan Baker (1989) melaporkan bahwa penggunaan agensia antagonis dengan satu kali pemakaian dapat menekan pertumbuhan dan perkembangan patogen untuk jangka waktu yang relatif panjang tanpa menimbulkan pencemaran lingkungan. Agrios (2005) juga melaporkan bahwa penyakit tidak terjadi pada suatu jenis tanaman bila ada tanaman sehat dan tahan terhadap penyakit tertentu (biotik), lingkungan disekitarnya seperti iklim dan tanah (abiotik) yang mendukung pertumbuhan tanaman, tetapi tidak mendukung pertumbuhan patogen. Hubungan antara ketiga komponen ini dikenal dengan istilah segitiga penyakit (Lynch, 1990).

Percobaan pendahuluan dalam pengujian jamur antagonis didapat 37 isolat jamur yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet yang memiliki daya hambat >60% terhadap luas koloni patogen penyakit akar putih. Dari 37 isolat yang memiliki daya hambat terhadap jamur patogen isolat SK, ditemukan 5 isolat *Trichoderma* spp. yang memiliki daya hambat tinggi (>80%) yang berpotensi sebagai kandidat jamur antagonis, yaitu: isolat (BK2, BD1, MB1, JB1 dan LC2). Antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 memiliki kemampuan terbaik dalam pengendalian jamur patogen, kemudian dilakukan identifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dilanjutkan identifikasi molekuler untuk mengetahui spesiesnya, sehingga didapat *Trichoderma asperellum*. Mekanisme kerja *T. asperellum* isolat JB1 diduga memproduksi senyawa

antibiotik untuk mendegradasi hifa jamur patogen *S. commune* isolat SK. Lorito *et al.* (1993) dan Brunner *et al.* (2005) menyatakan bahwa mekanisme antagonis *Trichoderma* sp. terhadap patogen tanaman antara lain, melibatkan produksi berbagai enzim (biokatalis) hidrolitik dan sekresi senyawa antijamur.

Menurut Rahman *et al.* (2011), *Trichoderma* sp. telah dipercaya memiliki kemampuan hidup yang lebih baik dan daya kompetisi cukup tinggi pada berbagai kondisi. Kemampuan beberapa spesies dari genus *Trichoderma* sp. sebagai mikroba biokontrol sangat efektif untuk menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman dikaitkan dengan kemampuannya menghasilkan enzim kitinase (Paulitz dan Belanger, 2001). Lebih lanjut Lone, (2012) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. tumbuh aktif menghasilkan sejumlah besar enzim ekstraselular β -1,3-glukanase dan kitinase, yang dapat melarutkan dinding sel jamur patogen dengan cara mendegradasi polisakarida dan kitin yang ada pada dinding selnya.

3.2. Konsep Penelitian

Berdasarkan kerangka berpikir, maka dapat dibuat konsep penelitian sebagai berikut: tanaman cengkeh yang menunjukkan gejala penyakit akar putih, pada bagian akarnya diisolasi untuk mendapatkan patogen, dilakukan uji patogenitas untuk memastikan patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, dilakukan identifikasi morfologi dilanjutkan identifikasi molekuler untuk mengetahui spesiesnya. Kandidat jamur antagonis yang didapat dari rizosfer diuji kemampuan daya hambatnya terhadap luas koloni jamur patogen secara *in vitro* dan dilanjutkan dengan uji secara *in vivo* pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca. Jamur antagonis yang memiliki kemampuan terbaik sebagai pengendali

hayati, diidentifikasi morfologi secara makroskopis dan mikroskopis dilanjutkan dengan identifikasi molekuler untuk mengetahui spesiesnya.

Pengendalian hayati dilakukan melalui pelibatan mikroba antagonis, karena mikroba ini dapat ditemukan di alam sekitar akar tanaman, sehingga mengurangi ketergantungan pada pestisida kimiawi sintetis. Mikroba antagonis mudah dibiakan dan terus berkembang bila kondisi lingkungan tempat hidupnya mendukung, sehingga tidak perlu sering diaplikasikan, maka menurunkan biaya produksi dan ramah lingkungan (Nurhayati, 2011). Berdasarkan kerangka berpikir tersebut, maka dapat dibuat konsep penelitian, disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1
Kerangka konsep penelitian

3.3 Hipotesis

Berdasarkan latar belakang rumusan masalah yang telah diuraikan tersebut di atas, maka dapat dikemukakan hipotesis sebagai berikut:

1. Penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng disebabkan oleh jamur patogen dari klas Basidiomycetes.
2. Isolat mikroba antagonis yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit dapat menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.
3. Mikroba antagonis diduga *Trichoderma* sp. mampu menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh secara *in vitro* dan mampu menekan intensitas serangan penyakit akar putih pada bibit cengkeh dalam *polybag* pada percobaan di rumah kaca.
4. Mekanisme kerja jamur antagonis dalam menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh diduga dengan cara antibiosis, mikoparasit dan kompetisi.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian secara *in vitro* dilaksanakan di Laboratorim Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Udayana dari bulan Mei 2013 dan secara *in vivo* dilaksanakan mulai bulan April 2015 sampai Januari 2016 di Rumah Kaca yang berlokasi di Jalan Batas Dukuh Sari Gang Cenderawasih No. 14 Denpasar Selatan. Identifikasi jamur patogen penyebab penyakit akar putih dan jamur antagonis melalui analisis genetika DNA ribosomal (rDNA) dilakukan di Pusat Penelitian (Puslit) Biologi bidang Mikrobiologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Cibinong, Jawa Barat.

Penelitian karakterisasi struktur mikroskopis jamur patogen dan jamur antagonis menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) yang dilakukan di Pusat Penelitian Biologi bidang Zoologi LIPI Cibinong. Pengamatan mikroskopis histologi akar bibit cengkeh yang terinfeksi jamur patogen dengan metode mikroteknik yang dilakukan di Pusat Penelitian Biologi bidang Botani LIPI Cibinong, di Desa Sampora, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Cibinong, Provinsi Jawa Barat.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: cawan Petri (*iwaki-pyrex*), tabung reaksi (*iwaki-pyrex*), rak tabung reaksi, *autoclave* (*Hirayama. HA-300 Niv. Japan*), *laminar air flow* (*SW-IB. Japan*), *Eppendorf* volume 1,5 mL,

PCR (*Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400, Germany*), perangkat *electrophoresis* (*Cosmo bio*), perangkat SEM (SEI 10 KV WD12 mm SS30), mikroskop (*Olympus*), timbangan analitik (*AND EK-300i Japan*), gelas ukur, *beaker glass* (*iwaki-pyrex*), labu *erlenmeyer* (*iwaki-pyrex*), *object glass*, *cover glass*, mikropipet (*Gilson*), oven (*NVC. Australia PTY.CTD*), lampu *bunsen*, vortek (*Labinco*), *Sheker*, *hand counter*, bor gabus, jarum *ose*, pinset, sendok, gunting, pisau, spidol, penggaris dan saringan.

4.2.2 Bahan

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini yaitu: PDA (*Potato Dextrosa Agar*), PDB (*Potato Dextrosa Broth*), alkohol 70%, alkohol 95%, *Levofloxacin*, buffer STE (Sukrosa Tris-HCL EDTA), proteinase-K, isopropanol, natrium asetat, CTAB, NaCl, *lisozim*, *sodium hipoklorit*, *sodium cacodylate*, *osmium tetroxide*, *glutaraldehyde*, *t-butylalcohol*, *lactophenol*, *kloroform*, fenol, etil alkohol, natrium asetat, ddH₂O, DMSO, air steril, spritus, kapas, tisu, *aluminium foil*, bibit cengkeh umur 12 bulan, tanah *rizosfer*, batang ketela pohon, *polybag*, jagung halus, dedak, tanah kompos, pupuk kandang, kertas transparan (kalkir), kertas millimeter blok, kantong plastik ukuran 2 kg, kertas karbon dan kertas label.

4.3. Isolasi dan Uji Patogenitas Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh

Penelitian pendahuluan sebagai tahap penelitian eksplorasi dilakukan dengan mengisolasi akar tanaman cengkeh yang menunjukkan gejala penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di lapangan. Isolasi sampel dan pemurnian dilakukan sesuai dengan metode Shivas dan Beasley (2005) pada media PDA. Akar tanaman cengkeh yang terinfeksi jamur patogen penyakit akar putih sebagai sampel dicuci

dengan air mengalir dilanjutkan dengan air steril, kemudian dipotong-potong dengan ukuran $\pm 0,5$ cm dan didesinfeksi ke dalam larutan *sodium hipoklorit* 0,5% selama ± 30 detik.

Sampel akar cengkeh dikeringkan dengan kertas tisu steril dan diletakkan pada cawan Petri yang telah berisi 15 mL media PDA + *Levofloxacin* 0,25%. Setiap cawan Petri diisi 10 potongan akar tanaman cengkeh sebagai sampel dan diinkubasi pada suhu kamar (28°C) sampai tumbuh jamur pada potongan akar. Miselium jamur patogen yang tumbuh di pinggir potongan akar tersebut diisolasi dan dimurnikan kembali pada media PDA baru dan diinkubasi pada suhu kamar (28°C).

Identifikasi morfologi jamur patogen penyakit akar putih dilakukan secara makroskopis dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis hifanya di mikroskop dengan pembesaran 400x, kemudian dicocokkan dengan gambar pada penuntun identifikasi jamur dari buku CMI (*Commonwealth Mycology Institute*), yang kemudian dilanjutkan dengan melakukan uji patogenitas, untuk memastikan bahwa jamur yang diisolasi tersebut sebagai patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.

Uji patogenitas dilakukan dengan cara jamur patogen yang telah dimurnikan itu diisolasi kembali pada media PDA dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 10 hari. Koloni jamur patogen yang tumbuh pada media PDA, dipotong dengan bor gabus (*cork borer*) berupa lempeng biakan jamur, seperti cakram berdiameter 0,5 cm, diambil dengan jarum *ose* steril, lalu ditumbuhkan dengan cara menempelkan pada batang tanaman ketela pohon steril berdiameter ± 1 cm dan panjang 3 cm sebagai alas makanan (*food base*). Batang tanaman ketela

pohon tersebut kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik steril dan diinkubasi kembali pada suhu 28°C selama 7 hari. Batang ketela pohon yang telah ditumbuhi jamur patogen, diinfeksi masing-masing sebanyak 2 batang secara bersinggungan pada pangkal akar dari 30 bibit cengkeh yang akarnya telah dilukai dengan pisau. Perlakuan kontrol dilakukan pada 10 bibit cengkeh lainnya tanpa diberikan perlakuan jamur patogen. Uji patogenitas ini semuanya dilakukan di rumah kaca.

Gejala penyakit yang muncul pada bibit cengkeh yang diuji patogenitasnya di rumah kaca dibandingkan dengan gejala penyakit akar putih pada tanaman cengkeh yang terjadi di lapangan. Gejala penyakit yang muncul pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca yang diuji patogenitas itu, apabila menunjukkan gejala yang sama seperti gejala penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di lapangan, berarti patogen yang diisolasi dari tanaman cengkeh sakit di lapangan tersebut menyebabkan penyakit akar putih, kemudian dilanjutkan dengan reisolasi jamur patogen pada PDA. Isolat jamur patogen hasil reisolasi kemudian dipelihara pada media PDA miring, diinkubasi pada suhu 28°C sebagai isolat stok dengan memberi label nama isolat SK artinya isolat Seririrt Koleksi, agar dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya.

4.4 Identifikasi Jamur Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh

Kultur murni isolat jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh hasil uji patogenitas diidentifikasi secara makroskopis, berdasarkan karakterisasi morfologi dan pigmentasi pada media PDA, seperti: warna, elevasi tekstur dan tepi koloni. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara

meneteskan satu tetes *lactophenol* tepat pada bagian tengah *object glass*, lalu dengan menggunakan jarum secara aseptik diambil sedikit biakan jamur yang sudah dimurnikan kemudian digoreskan pada bagian *lactophenol* yang telah diteteskan, selanjutnya ditutup dengan *cover glass*. Preparat ini selanjutnya diamati pada mikroskop binokuler dengan pembesaran 400x. Identifikasi secara mikroskopis berdasarkan karakterisasi miselia jamur dicocokkan dengan ciri dan gambar pada penuntun identifikasi jamur dari buku CMI (*Commonwealth Mycology Institute*). Identifikasi molekuler jamur patogen penyakit akar putih dilakukan menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS) dengan menggunakan 2 primer yaitu primer ITS 5 dan primer ITS 4.

4.4.1 Isolasi DNA Genom Patogen

Isolasi DNA genom dari jamur patogen isolat SK dilakukan dengan mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989) yaitu jamur patogen yang tumbuh pada media PDA selama 4 hari diambil hifanya lalu disuspensikan dalam 2 mL air steril. Suspensi jamur tersebut sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke *Eppendorf* volume 1,5 mL, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan buffer STE (komposisi: 0,3 M sukrosa; 25 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA 2Na pH 8), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci sebanyak 3 kali secara berulang, selanjutnya supernatan dibuang dan pada pelet yang didapat ditambahkan 200 μ L buffer STE dan 45 μ L lisozim (20 mg/mL) dibolak-balik secara berulang sebanyak 10-20 kali, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit sehingga terbentuk protoplas.

Proteinase-K (20 mg/mL) sebanyak 20 μ L ditambahkan pada campuran tersebut dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit. Setelah itu ditambahkan 400 μ L 10% CTAB dalam larutan 0,7 M NaCl lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan 1 kali volume fenol:kloroform (25:24) dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Fase bening dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 0,6 kali volume isopropanol dan 20 μ L Natrium asetat, inkubasi pada suhu -20°C selama 12 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan dibuang, sedangkan pada pelet dicuci menggunakan alkohol 70% sebanyak 1 mL. DNA dikeringanginkan selama 60 menit untuk membuang alkohol lalu dilarutkan ke dalam 50 μ L ddH₂O (*double destillation* H₂O) steril, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C atau suhu -20°C.

4.4.2 Amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Identifikasi isolat jamur dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika dengan menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS) yaitu ITS1 dan ITS2. Amplifikasi daerah ITS menggunakan primer ITS 5 (F : 5`-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3`) dan primer ITS 4 (R : 5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3`) (White *et al.*, 1990).

Amplifikasi dilakukan dengan mesin *Polymerase Chain Reaction* (Perkin Elmer GeneAmp PCR *system* 2400, German) pada volume 25 μ L dengan komposisi reaksi yaitu: *nuclease free water* 10 μ L, *Go taq green mastermix*TM 12,5 μ L, primer ITS 5 dan primer ITS 4 masing-masingnya 0,5 μ L, DMSO 0,5 μ L, dan DNA *template* 1 μ L. Amplifikasi PCR untuk daerah ITS terdiri dari: *pra-denaturasi* 95°C selama 90 detik, dilanjutkan *denaturasi* 95°C selama 30 detik

dengan 35 siklus, *annealing* 55°C selama 30 detik, ekstensi 72°C dalam 90 detik dan ekstensi akhir 72°C selama 5 menit. Hasil elektroforesis yang didapat dipurifikasi untuk dilanjutkan ketahapan sekuensing.

4.4.3 Sekuensing ITS dan Analisis Sekuen DNA

Analisis pembacaan urutan basa nitrogen menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data mentah hasil sekuensing selanjutnya di *trimming* dan di *assembling* menggunakan program *Chromas Pro version 1.5*. Data yang telah di *assembling* selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Thompson *et al.*, 1997). Beberapa data sekuen hasil BLAST yang merupakan spesies terdekat dan merupakan *Type Strain* dari masing-masing spesies tersebut diambil dari data *GenBank* di NCBI. Data dianalisis kembali dengan *mengaligment sequen* tersebut dengan menggunakan program MEGA v.5.0 (Nishizawa *et al.*, 2010), dan *bootstrap* yang digunakan adalah 1.000 kali ulangan (Felsenstein, 1985).

4.5 Isolasi Kandidat Jamur Antagonis

Jamur antagonis diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit akar putih sebagai sampel. Sampel untuk penelitian diambil didelapan Kabupaten di Bali dan di areal perkebunan pusat penelitian (Puslit) LIPI Cibinong yang berlokasi di Desa Sampora, Kecamatan Cibinong, Kabupaten Cibinong, Provinsi Jawa Barat.

Tanah sampel diambil seberat ± 300 g dengan cara menggali tanah sedalam 20-30 cm di sekitar perakaran tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala

penyakit akar putih. Tanah sampel kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik yang diberi label berupa informasi lokasi pengambilan sampel, waktu dan jenis tanaman, disimpan untuk dibawa ke laboratorium. Sampel yang diperoleh dari lapangan dicampur sampai homogen, kemudian disimpan pada tempat yang terlindung dari cahaya matahari langsung, sampai dilakukan isolasi. Jamur antagonis dari rizosfer diisolasi menggunakan *plating method* dengan seri pengenceran (Nester *et al.*, 2007).

Pengenceran dilakukan dengan tahapan sebagai berikut: tanah sampel ditimbang seberat 10 g dimasukkan ke dalam 90 mL aquades steril dalam labu *erlenmeyer* berukuran volume 250 mL, lalu dihomogenkan dengan vortek, sehingga mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} dilakukan dengan mengambil 1 mL suspensi dari pengenceran 10^{-1} kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL aquades steril dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan dengan vortex, demikian seterusnya sampai pengenceran 10^{-4} . Suspensi sebanyak 1 mL pada pengenceran 10^{-4} dituangkan dalam cawan Petri yang masing-masing telah berisi 15 mL media PDA dengan menggoyangkan cawan Petri hingga merata, diinkubasi selama 2-3 hari pada suhu kamar (28°C). Jamur yang tumbuh di PDA dimurnikan kembali dengan memindahkan ke media PDA baru, mengikuti metode Chernin *et al.*, (1995). Kultur murni isolat jamur yang akan dijadikan kandidat jamur antagonis diujikan dengan jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh isolat SK dengan metode dua kultur (*dual culture method*) (Noveriza *et al.*, 1999). Isolat jamur antagonis yang menunjukkan daya hambat besar ($>60\%$) diisolasi kembali pada media miring

dalam tabung reaksi dan disimpan dalam lemari pendingin (suhu -20°C) untuk penelitian selanjutnya.

4.6 Uji Daya Hambat Kandidat Jamur Antagonis terhadap Luas Koloni Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh secara *In Vitro*

Kultur murni isolat kandidat jamur antagonis diuji daya hambatnya terhadap luas koloni jamur patogen isolat SK penyebab penyakit akar putih dilakukan secara *in vitro* dengan metode dua kultur (*dual culture method*) (Noveriza *et al.*, 1999). Aktivitas penghambatan isolat dari kandidat jamur antagonis terhadap luas koloni jamur patogen isolat SK dilakukan dengan menyiapkan biakan jamur patogen pada media PDA. Koloni jamur patogen isolat SK dan koloni jamur kandidat antagonis umur 7 hari di media PDA dipotong dengan bor gabus (*cork borer*) berupa lempeng biakan seperti cakram berdiameter 0,5 cm diambil dengan jarum *ose* steril, kemudian diisolasi pada media PDA dalam cawan Petri secara berlawanan pada jarak 3 cm dengan metode *dual culture*.

Perlakuan kontrol sebagai pembanding dilaksanakan dengan mengisolasi jamur patogen isolat SK pada media PDA tanpa diberikan perlakuan jamur antagonis. Semua pengujian dilakukan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang masing-masing diulang sebanyak 4 kali dan diinkubasi pada suhu kamar (28°C) selama 6 hari dengan mengamati daya hambatnya terhadap pertumbuhan luas koloni jamur patogen. Luas koloni jamur patogen dihitung dengan cara mempolakan pada kertas kalkir transparan merek “*Diamant*” mengikuti perkembangan koloni, kemudian diterakan pada kertas milimeter blok dan dihitung luasnya masing-masing. Kandidat jamur antagonis

yang memiliki daya hambat paling tinggi (>80%) disimpan pada media miring dalam tabung reaksi untuk uji pengendali agensia hayati pada penelitian secara *in vivo* di rumah kaca. Menurut Ghildival dan Pandev (2008) persentase daya hambat ditentukan berdasarkan rumus:

$$P = \frac{P_k - P_t}{P_k} \times 100\%$$

Keterangan:
 P = Persentase hambatan
 P_k = luas koloni jamur patogen pada kontrol
 P_t = luas koloni jamur antagonis pada perlakuan

4.7 Penyiapan Bahan untuk SEM

Preparat untuk SEM (*scanning electron microscope*) berasal dari jamur patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh isolat SK yang ditumbuhkan pada media PDA, diisolasi kembali di PDA dalam cawan Petri secara berlawanan (metode *dual culture*) dengan jamur antagonis, lalu dinkubasi selama 6 hari setelah isolasi pada suhu 28°C. Miselium jamur yang tumbuh disepanjang zone pertemuan diantara kedua jamur yaitu jamur patogen dan antagonis dipotong-potong dengan ukuran lebar 3 mm dan selanjutnya difiksasi dengan larutan 2% *glutaraldehyde* dalam buffer 0,1 M *sodium cacodylate* (pH 7,2) pada suhu 4°C selama 4 jam dan setelah itu didiamkan pada suhu kamar (28°C) selama 1 jam.

Sampel yang sudah difiksasi dicuci kembali dengan buffer *sodium cacodylate* (pH 7,2) dan dilakukan fiksasi lanjutan dengan 1% *osmium tetroxide* dalam 0,1 M buffer *sodium cacodylate*, kemudian didiamkan pada suhu ruang (26-28°C) selama 5 jam. Setelah itu sampel dicuci dengan menggunakan aquades steril, selanjutnya dilakukan proses dehidrasi dengan menggunakan etil alkohol

secara berseri (40%, 60%, 80%, 99,5% dan 100%). Sampel dipotong dengan menggunakan *freeze cutting device* (TF-2, Eiko, Japan) setelah proses dehidrasi. Sampel selanjutnya ditetesi larutan *t-butylalcohol* dan diletakkan pada *vaccum freeze-drying* (ID-2, Eiko, Japan). Sampel yang telah kering diletakkan di tempat khusus dan dilapisi dengan *osmium tetroxide* (OPC 60A, Filgen, Japan) dan platinum (JUC-5000, JEOL, Japan). Sampel yang telah dilapisi *osmium tetroxide* tersebut diobservasi dengan SEM menggunakan JSM-5410LA, JEOL, Japan dengan akselerasi voltase 5 kV.

4.8 Uji Potensi Kandidat Jamur Antagonis sebagai Agensia Pengendali Hayati terhadap Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh secara *In Vivo*

Uji potensi kandidat jamur antagonis sebagai agensia pengendali hayati patogen penyakit akar putih diaplikasikan dalam bentuk kompos pada bibit cengkeh umur 12 bulan dalam *polybag* di rumah kaca. Jamur antagonis sebagai agensia pengendali hayati yang diujikan yaitu isolat jamur yang menunjukkan daya hambat besar (>80%) terhadap jamur patogen penyakit akar putih pada bibit cengkeh yang diuji secara *in vitro*, mendapat 5 (lima) isolat jamur yaitu: isolat BK2, BD1, MB1, JB1 dan LC2 yang dijadikan kandidat jamur antagonis terhadap patogen penyakit akar putih. Biakan murni 5 (lima) kandidat jamur antagonis *Trichoderma* spp. masing-masing ditumbuhkan pada media PDA + *Levofloxacin* 0,25% (v/b) mg dalam cawan Petri (sesuai kebutuhan), diinkubasi selama 6 hari. Miselium kelima jamur kandidat antagonis itu diambil dengan jarum *ose* dan masing-masing dimasukkan ke dalam labu *erlenmeyer* ukuran volume 250 mL yang telah diisi 100 mL aquades steril, kemudian divortek selama 3 hari. Suspensi

kelima isolat jamur kandidat antagonis itu diambil sebanyak 1 mL dengan mikropipet dan masing-masing ditumbuhkan pada media campuran jagung+dedak yang telah disterilkan dalam *autoclave*, untuk dijadikan sebagai bahan kompos.

Kompos sebagai media tumbuh dari jamur antagonis yang diaplikasikan pada bibit cengkeh dalam *polybag* pada percobaan di rumah kaca, dibuat dari campuran jagung + dedak + jamur antagonis (perbandingan 50:10:1) (b/b/v), diinkubasi pada suhu 28°C selama 30 hari. Kandidat jamur antagonis *Trichoderma* spp. yang sudah tumbuh di media jagung dan dedak dicampur dengan tanah kompos mengandung kotoran sapi yang telah disterilkan (perbandingan 1:50) (b/b), diinkubasi pada suhu 28°C selama 21 hari, sehingga menjadi kompos *Trichoderma* spp. (dibuat sesuai kebutuhan). Pengujian kandidat jamur antagonis *Trichoderma* spp. dilakukan dengan mengaplikasikan kompos *Trichoderma* spp. tersebut sebanyak 500 g kedalam *polybag* pada masing-masing bibit cengkeh umur 12 bulan di rumah kaca.

Percobaan dirancang dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) berjumlah 6 perlakuan yang masing-masing diulang sebanyak 4 kali. Setiap unit perlakuan terdiri dari 30 bibit cengkeh, sehingga keseluruhan dibutuhkan $6 \times 4 \times 30$ bibit = 720 bibit cengkeh dalam *polybag*. Perbanyakan patogen penyakit akar putih dilakukan dengan menumbuhkan jamur patogen isolat SK pada batang tanaman ketela pohon diameter ± 1 cm dan panjang 3 cm, yang berjumlah 720 bibit cengkeh x 2 batang ketela pohon, sehingga diperlukan 1.440 batang ketela pohon (sesuai kebutuhan) yang diinkubasi pada suhu kamar (28°C) selama 7 hari.

Bibit cengkeh yang diuji, pada bagian pangkal akarnya dilukai dengan pisau, kemudian diinfeksi jamur patogen 7 hari setelah diaplikasikan kompos *Trichoderma* spp. Jamur patogen yang telah tumbuh di batang ketela pohon, yang telah disiapkan itu, kemudian masing-masing diinfeksi 2 batang ketela pohon secara bersinggungan pada bagian pangkal akar bibit cengkeh yang telah dilukai tersebut. Parameter yang diamati adalah pertumbuhan bibit cengkeh (tinggi bibit cengkeh, jumlah daun, berat basah akar dan berat kering akar), intensitas serangan penyakit akar putih dan populasi *Trichoderma* sp. pada setiap perlakuan antagonis yang dilakukan di rumah kaca.

4.8.1 Pengamatan pertumbuhan bibit cengkeh

Pengamatan pertumbuhan bibit cengkeh yang meliputi: tinggi bibit cengkeh (diukur dari permukaan tanah di *polybag* sampai ujung tanaman atau kuncup tertinggi) serta jumlah daun yang diamati setiap 30 hari setelah infeksi patogen (HSIP). Pengamatan tinggi dan jumlah daun dilakukan pada 3 bibit cengkeh dalam *polybag* di masing-masing unit perlakuan selama penelitian. Penentuan 3 bibit cengkeh dalam *polybag* untuk pengamatan pertumbuhan bibit cengkeh dilakukan agar tidak mendapatkan hasil pengamatan pertumbuhan yang bias.

Penentuan berat basah akar bibit cengkeh dan berat kering akar dilakukan dengan mencabut 10 bibit cengkeh pada masing-masing unit perlakuan setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP). Bibit cengkeh yang dicabut dari *polybag* pada bagian pangkal akar bibit cengkeh (perbatasan akar dengan batang) dipotong dan tanah yang melekat pada akar dibersihkan. Akar bibit cengkeh dimasukkan ke dalam kertas amplop yang telah diketahui beratnya. Akar bibit cengkeh yang

sudah dimasukkan kedalam kertas amplop, kemudian ditimbang kembali untuk menentukan berat basah akar. Akar bibit cengkeh dalam kertas amplop tadi dioven pada suhu 80°C sampai berat akar konstan (dioven selama ± 72 jam, sesuai dengan percobaan pendahuluan yang telah dilakukan). Akar bibit cengkeh yang telah dioven selanjutnya ditimbang, kemudian dikurangi berat kertas amplop, sehingga mendapatkan berat kering akar bibit cengkeh.

4.8.2 Penentuan intensitas serangan penyakit akar putih

Penentuan intensitas serangan penyakit dilakukan setiap 60 HSIP dengan mencabut 10 bibit cengkeh di masing-masing unit perlakuan. Intensitas serangan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh ditentukan dengan mengacu pada skor intensitas serangan penyakit layu pada tanaman karet. Menurut Hutagaol dan Melin (2005); Tombe (2008), bahwa intensitas serangan penyakit layu pada tanaman karet dan tanaman mente yang disebabkan oleh patogen jamur akar putih dengan skor sebagai berikut:

1. Skor 0 (Sehat) = rizomorf atau miselium patogen jamur akar putih tidak ada pada permukaan akar tanaman dan tanaman sehat (serangan 0%).
2. Skor 1 (Ringan) = daun tanaman kelihatan kusam dan pertumbuhan tanaman terlambat serta rizomorf atau miselium patogen melekat pada permukaan akar, yang dikategorikan serangan penyakit ringan (serangan 1-25%).
3. Skor 2 (Sedang) = daun tanaman mulai layu dan rizomorf atau miselium patogen melakukan penetrasi ke jaringan *floem* akar tetapi akar belum membusuk, dikategorikan serangan penyakit sedang (serangan >25-50%).

4. Skor 3 (Berat) = daun tanaman sudah menguning, mengering dan gugur serta rizomorf atau miselium patogen telah melakukan penetrasi jaringan *xylem*, sehingga akar membusuk dan tanaman mati, dikategorikan serangan penyakit berat (serangan >50%).

Penentuan intensitas serangan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh oleh jamur patogen dilakukan berdasarkan metode Krebs (Krebs, 1999), ditentukan dengan rumus:

Keterangan:

$$I = \frac{\sum (n \times v)}{Z \times N} \times 100\%$$

I = Intensitas serangan penyakit
n = Jumlah tanaman bergejala penyakit dari setiap skor
v = Nilai skor gejala penyakit
N = Jumlah tanaman yang diamati
Z = Nilai skor gejala penyakit tertinggi

4.8.3 Penentuan populasi *Trichoderma* spp.

Populasi *Trichoderma* spp. ditentukan menggunakan *plating method* dengan seri pengenceran (Nester *et al.*, 2007). Adapun langkah-langkah yang dilakukan adalah mengambil tanah sampel seberat ± 300 g pada bagian rizosfer bibit cengkeh yang dicabut dari *polybag* pada setiap perlakuan *Trichoderma* spp. kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dicampur sampai homogen dan diberi label berupa informasi sampel. Tanah sampel ditimbang seberat 10 g dimasukkan ke dalam 90 mL dalam labu *erlenmeyer* berukuran volume 250 mL lalu dihomogenkan dengan vortek, sehingga mendapatkan pengenceran 10^{-1} . Untuk mendapatkan pengenceran 10^{-2} dilakukan dengan mengambil 1 mL suspensi dari pengenceran 10^{-1} dimasukkan ke dalam 9 mL aquades steril dalam tabung reaksi, lalu dihomogenkan dengan vortek, demikian seterusnya sampai

pada pengenceran 10^{-4} . Suspensi sebanyak 1 mL pada pengenceran 10^{-4} dituangkan dalam cawan Petri yang masing-masing telah berisi 15 mL media PDA dengan menggoyangkan cawan Petri hingga merata, diinkubasi pada suhu kamar (28°C) selama 3 hari. Penghitungan populasi *Trichoderma* spp. dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan alat *hand counter*. Populasi *Trichoderma* spp. dihitung pada masing-masing pengenceran kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran sehingga didapat populasi *Trichoderma* spp. dengan satuan *Coloni Form Unit* per gram (CFU/g).

4.9 Identifikasi Jamur Antagonis

Jamur antagonis hasil pengujian daya hambat secara *in vitro* dan pengujian pada bibit cengkeh di rumah kaca yang terbaik, selanjutnya diidentifikasi. Identifikasi morfologi secara makroskopis dengan mengamati warna, elevasi, tekstur dan tepi koloni, kemudian dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis bentuk hifa, warna hifa dan spora di mikroskop, yang kemudian dicocokkan dengan ciri dan gambar pada penuntun identifikasi jamur dari buku CMI (*Commonwealth Mycology Institute*). Identifikasi molekuler jamur antagonis dilakukan menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS) dengan menggunakan 2 primer yaitu primer ITS 5 dan primer ITS 4.

4.9.1 Isolasi DNA Genom Antagonis

Isolasi DNA genom dari *Trichoderma* sp. isolat JB1 dilakukan dengan mengikuti metode Sambrook *et al.* (1989) yaitu jamur *Trichoderma* sp. isolat JB1 yang tumbuh pada media PDA selama 4 hari diambil hifanya, lalu disuspensikan dalam 2 mL air steril. Suspensi jamur tersebut sebanyak 1,5 mL dimasukkan ke

Eppendorf volume 1,5 mL, selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet yang terbentuk dicuci kembali dengan buffer STE (komposisi: 0,3 M sukrosa; 25 mM Tris-HCl; 25 mM EDTA 2Na pH 8), kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8.000 rpm selama 10 menit. Pelet dicuci sebanyak 3 kali secara berulang, selanjutnya supernatan dibuang dan pada pelet yang didapat ditambahkan 200 μ L buffer STE dan 45 μ L lisozim (20 mg/mL) dibolak-balik secara berulang sebanyak 10-20 kali, kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit sehingga terbentuk protoplas.

Proteinase-K (20 mg/mL) sebanyak 20 μ L ditambahkan pada campuran tersebut dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 60 menit. Setelah itu ditambahkan 400 μ L 10% CTAB dalam larutan 0,7 M NaCl lalu diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. Kemudian ke dalam larutan ditambahkan 1 kali volume fenol:kloroform (25:24) dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit. Fase bening dipindahkan ke tabung baru dan ditambahkan 0,6 kali volume isopropanol dan 20 μ L Natrium asetat, diinkubasi pada suhu -20°C selama 12 jam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit. Bagian supernatan dibuang, sedangkan pada pelet dicuci menggunakan alkohol 70% sebanyak 1 mL. DNA dikeringanginkan selama 60 menit untuk membuang alkohol lalu dilarutkan ke dalam 50 μ L ddH₂O (*double destillation* H₂O) steril, selanjutnya disimpan pada suhu 4°C atau suhu -20°C.

4.9.2 Amplifikasi DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Identifikasi isolat jamur dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis genetika dengan menggunakan daerah *internal transcribed spacer* (ITS) yaitu ITS1 dan ITS2. Amplifikasi PCR menggunakan primer ITS5 (F : 5`-

GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3') dan primer ITS4 (R : 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3') (White *et al.*, 1990).

Amplifikasi dilakukan dengan mesin *Polymerase Chain Reaction* (Perkin Elmer GeneAmp PCR system 2400, German) pada volume 25 µL dengan komposisi reaksi yaitu: *nuclease free water* 10 µL, *Go taq green mastermix*TM 12,5 µL, primer ITS 5 dan primer ITS 4 masing-masingnya 0,5 µL, DMSO 0,5 µL, dan DNA *template* 1 µL. Amplifikasi PCR untuk daerah ITS terdiri dari: *pradenaturasi* 95°C selama 90 detik, dilanjutkan *denaturasi* 95°C selama 30 detik dengan 35 siklus, *annealing* 55°C selama 30 detik, ekstensi 72°C dalam 90 detik dan ekstensi akhir 72°C selama 5 menit. Hasil elektroforesis yang didapat dipurifikasi untuk dilanjutkan ketahapan sekuensing.

4.9.3 Sekuensing ITS dan Analisis Sekuen DNA

Analisis pembacaan urutan basa nitrogen menggunakan *automated DNA sequencer* (ABI PRISM 3130 *Genetic Analyzer*) (*Applied Biosystems*). Data mentah hasil sekuensing selanjutnya di *trimming* dan di *assembling* menggunakan program *ChromasPro version 1.5*. Data yang telah di *assembling*, selanjutnya di BLAST dengan data genom yang telah didaftarkan NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Thompson *et al.*, 1997).

Beberapa data sekuen hasil blast yang merupakan spesies terdekat dan merupakan *Type Strain* dari masing-masing spesies tersebut diambil dari data *GenBank* di NCBI. Data dianalisis kembali dengan *mengaligment sequen* tersebut dengan menggunakan proram MEGA v.5.0 (Nishizawa *et al.*, 2010), dan bootstrap yang digunakan adalah 1.000 kali ulangan (Felsenstein, 1985).

4.10 Analisis Statistik

Data yang didapat dalam penelitian, dianalisis secara kuantitatif dengan menggunakan *Analysis of Varian* (ANOVA) dengan bantuan *software SPSS for windows version 17.0* tahun 2009. Percobaan untuk mengetahui daya hambat kandidat jamur antagonis dilaksanakan di laboratorium menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Percobaan untuk mengetahui efektivitas *Trichoderma* spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh, pengaruh aplikasi *Trichoderma* spp. terhadap intensitas serangan penyakit dan populasi koloni *Trichoderma* spp. di rizosfer bibit cengkeh dilaksanakan di rumah kaca menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK). Data dianalisis menggunakan *analisis varians* (Anova) dan uji beda rata-rata dilakukan menggunakan uji beda nyata terkecil (BNT) pada taraf 5%. Penentuan jumlah perlakuan dan ulangan dari setiap desain penelitian berdasarkan pada ketentuan minimal $(P-1) \times (n-1) \geq 15$ (Gomez dan Gomez, 2007).

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh

5.1.1 Gejala penyakit akar putih

Tanaman cengkeh yang terinfeksi patogen penyakit akar putih di Desa Unggahan, Kecamatan Seririt, Kabupaten Buleleng, menunjukkan gejala daun tanaman layu, kering, kemudian daun gugur, sehingga tinggal ranting tanaman mengering (Gambar 5.1A). Pada bagian akar dan pangkal akar tanaman cengkeh tampak *rizomorf* berwarna putih (Gambar 5.1B).



Gambar 5.1

Tanaman cengkeh di lapangan bergejala penyakit akar putih
A= daun mengering, gugur, tinggal ranting; B= akar cengkeh terinfeksi patogen
1= akar terinfeksi *rizomorf* patogen, 2= pangkal akar terinfeksi *rizomorf* patogen

5.1.2 Hasil pengujian patogenitas

Hasil pengujian patogenitas yang dilakukan pada bibit cengkeh umur 12 bulan dalam *polybag* di rumah kaca, didapatkan bahwa bibit cengkeh yang

diinfeksi patogen isolat SK mulai menunjukkan gejala penyakit akar putih pada saat 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP). Gejala penyakit pada bibit cengkeh ditunjukkan berupa daun kelihatan kusam, kemudian layu, daun melengkung kearah dalam dan mengering, akhirnya daun gugur. Ranting bibit cengkeh mengering dan akhirnya mati (Gambar 5.2).



Gambar 5.2

Bibit cengkeh pada uji patogenitas (60 hari setelah infeksi patogen)

1 = bibit cengkeh tidak diinfeksi patogen isolat SK (kontrol)

2 = bibit cengkeh diinfeksi patogen isolat SK (daun kelihatan kusam, layu, daun melengkung kearah dalam dan mengering, akhirnya daun gugur dan hanya tinggal ranting yang mengering)

Bibit cengkeh yang tidak diinfeksi jamur patogen isolat SK (kontrol) dalam *polybag* di rumah kaca, bila dicabut tidak terlihat ada *rizomorfe* jamur berwarna putih di permukaan akar (Gambar 5.3A). Bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen isolat SK, bila dicabut kelihatan ada *rizomorfe* jamur berwarna putih menjalar pada permukaan akar dan bagian akar bibit cengkeh tersebut berwarna hitam, lunak dan membusuk (Gambar 5.3B).



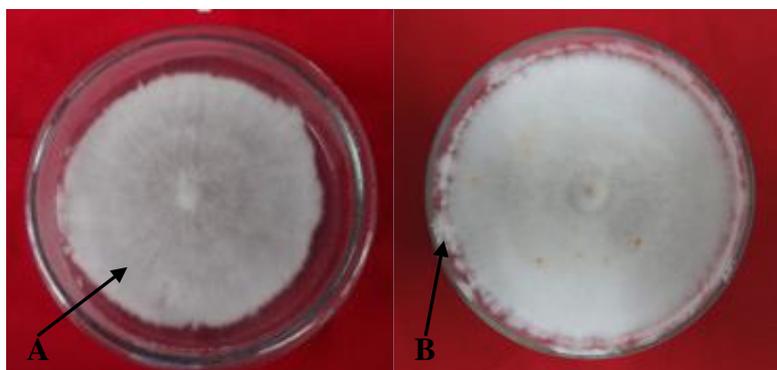
Gambar 5.3

Akar bibit cengkeh yang dicabut pada uji patogenitas (60 HSIP)
 A = akar bibit cengkeh perlakuan kontrol (tidak ada *rizomorf* jamur)
 B = akar bibit cengkeh diinfeksi patogen penyakit akar putih
 (tanda panah 1=*rizomorf* patogen pada akar, 2=akar membusuk, berwarna hitam)

5.2 Identifikasi Patogen Penyakit Akar Putih pada Tanaman Cengkeh

5.2.1 Identifikasi berdasarkan morfologi

Identifikasi morfologi jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh secara makroskopis yaitu permukaan koloni jamur datar dan berwarna putih mengkilap, koloni berbentuk bulat halus serta dibagian tepi agak rata (Gambar 5.4A). Miselium jamur patogen akar putih naik ke tepi cawan Petri pada umur 12 hari setelah isolasi (Gambar 5.4B).



Gambar 5.4

Koloni biakan murni patogen penyakit akar putih pada media PDA
 A= miselium jamur isolat SK umur 10 hari (tanda panah)
 B= miselium jamur isolat SK, naik ke dinding cawan Petri saat umur 12 hari
 (tanda panah)

Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah (*basidiokarp*) jamur patogen isolat SK berupa lempengan setengah lingkaran berwarna putih halus. Pada permukaan bagian atas berupa lingkaran berwarna kuning kecoklatan yang dibatasi lingkaran berwarna putih halus di bagian tepinya, disajikan pada Gambar 5.5A. Pada permukaan bagian bawah badan buah jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh, terdapat *gill* (berupa lempengan radial seperti insang), disajikan pada Gambar 5.5B.

Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah (*basidiokarp*) jamur akar putih pada tanaman mente dan badan buah jamur akar putih pada tanaman karet berupa lempengan setengah lingkaran, sebagai ciri dari klas Basidiomycetes. Struktur karakterisasi badan buah jamur akar putih pada tanaman mente bila dilihat pada permukaan atas, berupa lempengan setengah lingkaran berwarna coklat kehitaman pada bagian dalamnya yang dibatasi lingkaran berwarna putih di bagian tepi, disajikan pada Gambar 5.5C. Karakterisasi bagian bawah badan buah jamur akar putih pada tanaman mente berwarna putih halus dan tidak ada *gill* (Gambar 5.5D).

Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur akar putih pada tanaman karet, berupa lempengan setengah lingkaran berwarna kuning kecoklatan, disajikan pada Gambar 5.5E. Pengamatan karakterisasi mikroskopis jamur patogen isolat SK di mikroskop binokuler pada pembesaran 400x menunjukkan hifa bercabang dan bersepta serta membentuk kait (*clamp connection*) untuk membantu penetrasi pada inangnya, sebagai ciri khas dari kelompok jamur klas Basidiomycetes, disajikan pada Gambar 5.6.



Gambar 5.5

Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur patogen dan jamur akar putih

A= Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur patogen isolat SK, permukaan atas berbentuk kipas (1= lingkaran tengah berwarna kuning kecoklatan, 2= lingkaran tepi berwarna putih) (tanda panah)

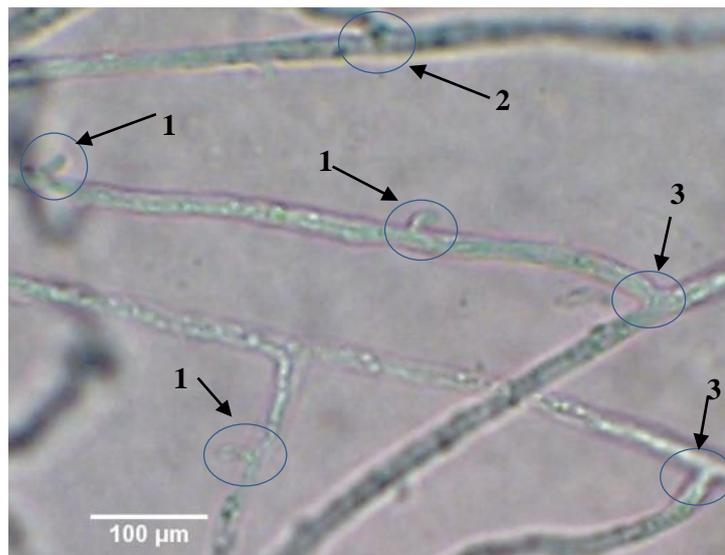
B= Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur patogen isolat SK permukaan bawah: *g= gill* (bentuk lempengan radial seperti insang) (tanda panah)

C= Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur akar putih di tanaman mente, permukaan atas (1= lingkaran bagian dalam berwarna coklat kehitaman, 2= lingkaran bagian luar berwarna putih) (tanda panah)

D= Karakterisasi morfologi makroskopis badan buah jamur akar putih di tanaman mente, permukaan bawah berwarna putih halus (tidak ada *gill*) (tanda panah)

E= Karakteristik morfologi makroskopis badan buah jamur akar putih di tanaman karet, permukaan atas berwarna kuning kecoklatan (tanda panah)

(sumber: E= Suprianto, 2013)



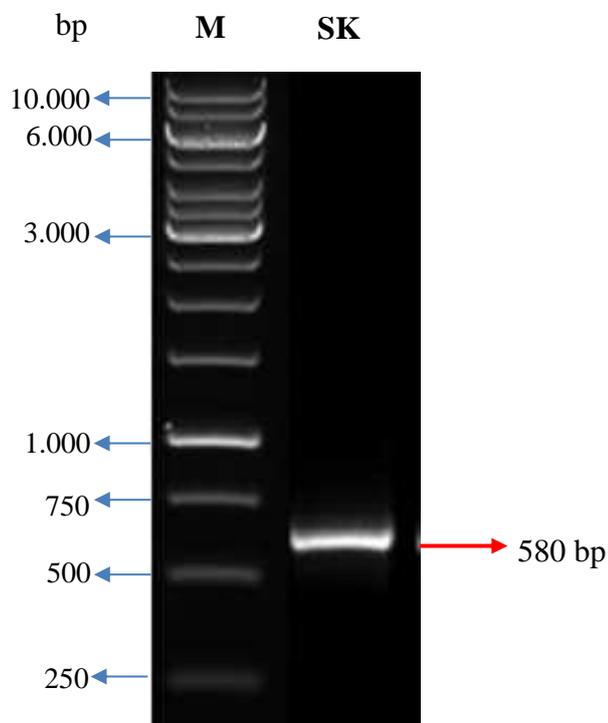
Gambar 5.6
Karakterisasi morfologi mikroskopis hifa jamur patogen isolat SK
pengamatan di bawah mikroskop binokuler pembesaran 400x
(tanda panah 1 = *clamp connection*; 2 = septa hifa; 3 = percabangan hifa)

5.2.2 Identifikasi molekuler jamur patogen

Identifikasi jamur patogen penyakit akar putih isolat SK dilakukan secara molekuler dengan mengamplifikasi daerah *internal transcribed spacer* (ITS) menggunakan 2 primer yaitu ITS 5 dan ITS 4 rDNA (DNA ribosomal). Menurut Druzhirina *et al.* (2005), salah satu analisis molekuler yang dikembangkan menggunakan sekuen DNA ribosomal (rDNA) pada daerah *internal transcribed spacer* (ITS). Amplifikasi DNA dilakukan untuk menggandakan fragmen gen yang terletak pada daerah ITS, posisi target amplifikasi dengan primer yang digunakan sesuai dengan temuan White *et al.* (1990).

Amplifikasi DNA daerah ITS jamur patogen isolat SK menggunakan primer ITS 5 (F: 5`- GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG- 3`) dan primer ITS 4 (R: 5`- TCCTCCGCTTATTGATATGC- 3`) menghasilkan fragmen DNA dengan ukuran basa 580 bp (Gambar 5.7). White *et al.* (1990) menyatakan bahwa

pasangan primer ITS 5 dan ITS 4 dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA pada daerah ITS 1 dan ITS 2 dengan ukuran basa antara 563-602 bp.



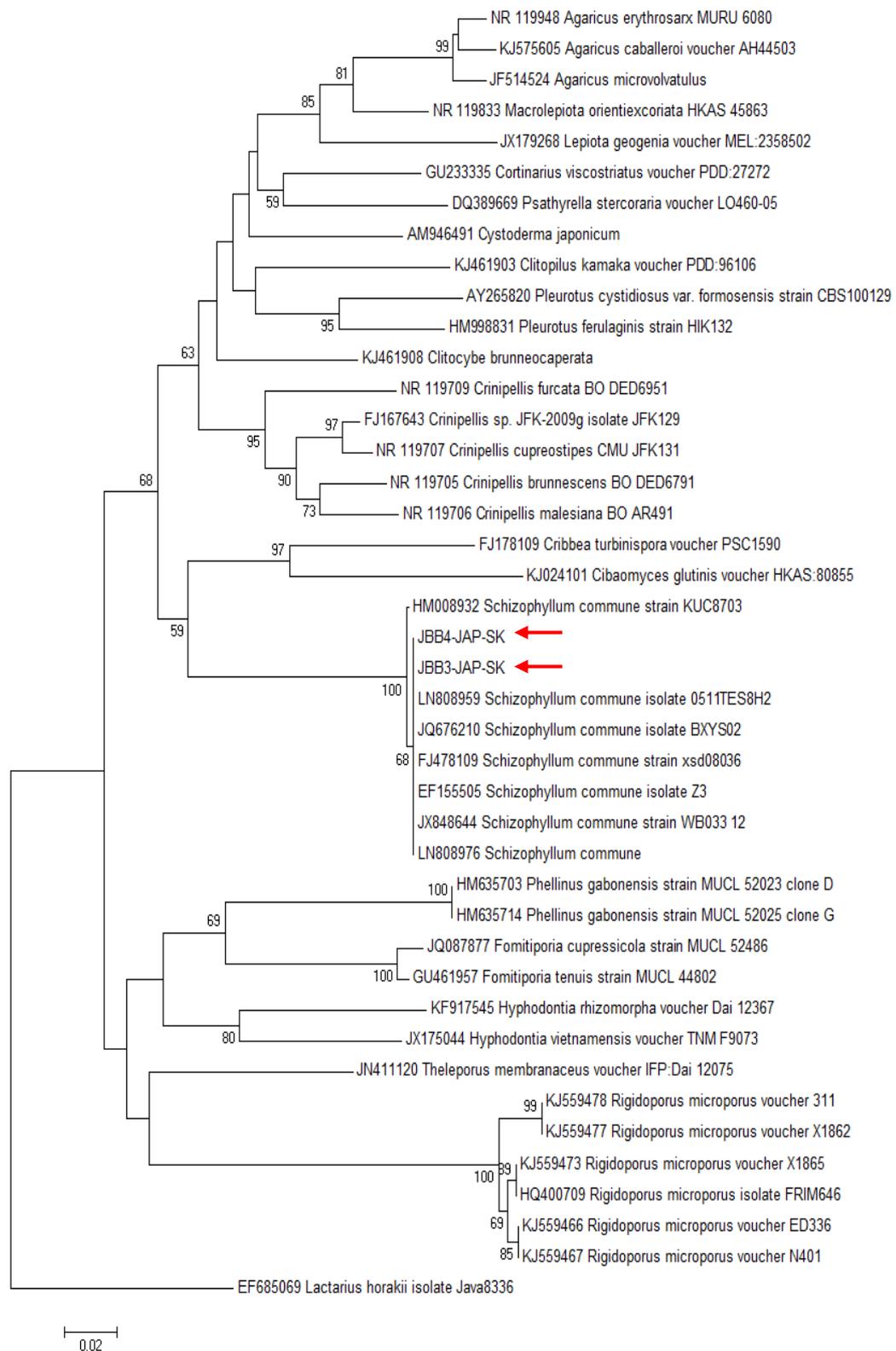
Gambar 5.7

Amplifikasi daerah ITS isolat SK menggunakan Primer ITS 5 dan ITS 4.

Lajur M = marker, 1 Kb DNA ladder (*fermentas*)

Lajur SK merupakan pita patogen isolat SK (tanda panah merah)

Fragmen DNA yang dihasilkan selanjutnya disekuensing untuk mengidentifikasi spesies jamur patogen isolat SK berdasarkan kemiripan dengan spesies jamur lainnya yang telah teridentifikasi. Hasil analisis menggunakan metode *Maximum Parsimony* dengan 1.000 kali ulangan *bootstrap* menunjukkan bahwa kekerabatan terdekat jamur patogen isolat SK adalah jamur *Schizophyllum commune*, karena berada satu *klade* (kelompok) dengan sekuen-sekuen jamur *S. commune* dengan dukungan *similaritas* 99%. Pohon filogeni yang menunjukkan kedekatan jamur patogen isolat SK terhadap spesies lain berdasarkan *bootstrap* 1.000 kali ulangan, disajikan pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8
Pohon filogeni yang dibangun dari sekuen ITS dari *library GenBank* jamur patogen isolat SK (tanda panah) yang telah dikarakterisasi. Nilai *bootstrap* 1.000 kali ulangan.

Berdasarkan hasil pensejajaran sekuen dari jamur patogen isolat SK dengan sekuen homolog *database* di *Genbank*, jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh isolat SK memiliki kemiripan sebesar 99% dengan *Schizophyllum commune* isolat 0511TES8H2 (*Accession Number GenBank* FJ478109.1), *Schizophyllum commune* isolat BXYSO2 (*Accession Number GenBank* JQ676210.1), *Schizophyllum commune* strain xsd08036 (*Accession Number GenBank* FJ478109.1), *Schizophyllum commune* isolat Z3 (*Accession Number GenBank* EF155505.1) dan *Schizophyllum commune* (*Accession Number GenBank* LN808976.1). Perbandingan persentase kemiripan gen jamur *S. commune* isolat SK dan asal negara dengan beberapa sekuen DNA di *GenBank* menggunakan program BLAST dan hasil analisis menggunakan metode *Maximum Parsimony* dengan 1.000 kali ulangan *bootstrap*, dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1

Perbandingan persentase kemiripan gen jamur patogen isolat SK dan asal negara dengan beberapa sekuen DNA di *Genbank* menggunakan program BLAST

No.	Isolat	Similaritas (%)	Accession (kode akses)	Asal Negara
1.	<i>Schizophyllum commune</i> isolat 0511TES8H2	99	LN808959.1	Spanyol
2.	<i>Schizophyllum commune</i> isolat BXYSO2	99	JQ676210.1	China
3.	<i>Schizophyllum commune</i> strain xsd08036	99	FJ478109.1	China
4.	<i>Schizophyllum commune</i> isolat Z3	99	EF155505.1	Jerman
5.	<i>Schizophyllum commune</i> isolat WB033_12	99	JX848644.1	Austria
6.	<i>Schizophyllum commune</i>	99	LN808976.1	Spanyol

5.3. Karakterisasi Jamur *Schizophyllum commune*

Jamur *S. commune* dapat tumbuh pada media PDA, suhu 25-40°C dan pH 4,0-8,5 serta pertumbuhan akan terhenti pada suhu di atas 45°C. Kecepatan tumbuh miselium optimum pada suhu 29°C dan pH 5,5 di media PDA dengan diameter 1,07 cm/hari, sedangkan pada suhu 25°C diameter miselium adalah 0,96 cm/hari. Berdasarkan diameter miselia yang tumbuh itu, berarti pertumbuhan jamur *S. commune* pada suhu 25-29°C yang tepat mencapai suhu optimumnya, termasuk klasifikasi pertumbuhan agak cepat (Adejoye *et al.*, 2007). Berdasarkan percobaan Adejoye *et al.* (2007), suhu optimum pertumbuhan *S. commune* pada media PDA adalah 25°C dengan memperlihatkan respon pertumbuhan setelah inkubasi lebih dari 10 hari.

Menurut Emberger (2006), ciri-ciri morfologi dari *S. commune* termasuk kedalam klas Basidiomycetes yaitu kelompok jamur yang memiliki *gill* (lempengan radial berbentuk seperti insang). Badan buah (*basidiokarp*) bentuknya seperti kipas yang lebarnya 1-3 cm. Bila dilihat dari permukaan atas, pada lingkaran luar badan buah berwarna putih dan pada lingkaran dalam berwarna kuning kecoklatan, serta dari permukaan bawah memiliki *gill* (lempengan radial berbentuk seperti insang).

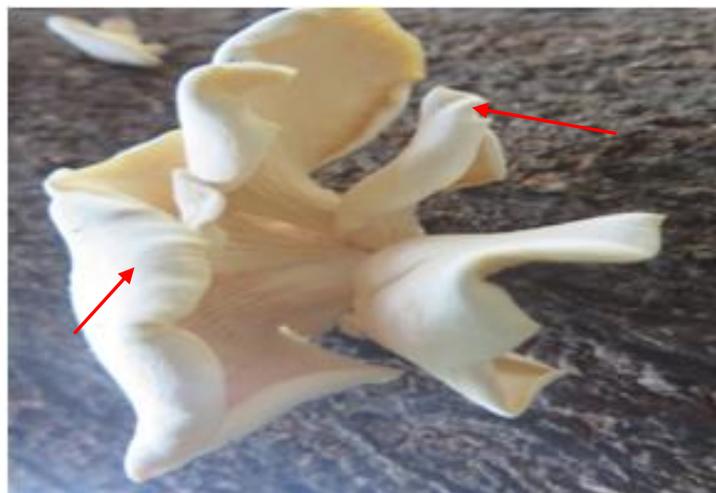
Badan buah tumbuh berkelompok atau tunggal dengan tangkai tudung pendek atau tidak ada tangkai (Nasreen *et al.*, 2015). Miselia jamur *S. commune* akan tumbuh dan berkembang ke segala arah pada substrat tanaman atau kayu di tempatnya berada. Apabila perkembangan miselia sudah cukup dan kondisi lingkungan memadai, maka miselia jamur *S. commune* akan tumbuh kuncup seperti bulatan sebesar kepala jarum pentul. Kuncup jamur yang berupa bulatan

tersebut, makin lama tumbuh membesar hingga akhirnya membentuk badan buah (*basidiokarp*), disajikan pada Gambar 5.9. *Basidiokarp* jamur *S. commune* pada tanaman cengkeh, tanaman mangga dan bambu jika mengering, maka setiap bagian tersebut akan menggulung ke arah permukaan bawah, disajikan pada Gambar 5.10.



Gambar 5.9

Miselia dan *Basidiokarp* (badan buah) jamur patogen isolat SK tumbuh pada pangkal batang bibit cengkeh di *polybag*
1 = miselia jamur (tanda panah),
2 = *Basidiokarp* atau badan buah (tanda panah)



Gambar 5.10

Badan buah jamur patogen *S. commune* isolat SK menggulung (tanda panah)

Menurut Kuo (2003) bahwa jamur *S. commune* tumbuh pada kayu dan bersifat parasit pada pohon serta tumbuh secara soliter, tetapi lebih sering berkelompok. Pernyataan serupa juga dilaporkan oleh Buzina *et al.* (2001) bahwa *S. commune* adalah jamur yang tumbuh di berbagai pohon dan bersifat parasit. Jamur *S. commune* juga sebagai penyebab penyakit pada pohon meranti merah (*Shorea smithiana*) (Erwin *et al.*, 2008). Lebih lanjut Arif *et al.* (2007) melaporkan bahwa jamur *S. commune* ditemukan hidup dan merusak pohon *Ficus* sp. Jamur *S. commune* ini juga hidup sebagai parasit pada pohon mangga (*Mangifera indica* L.) serta sebagai jamur pembusuk kayu (Schmidt, 2006).

Jamur *S. commune* dikenal sebagai penyebab *root rot* (busuk akar) atau *Schizophyllum rot*, *sap rot* dan *heart rot* pada beberapa jenis tanaman seperti: meranti (*Shorea smithiana*) di Kalimantan (Indonesia), pohon linden (*Tilia* sp.) atau pohon saru di Indonesia, buna (*Fagus crenata*) (*Japan beech*) dan ceri asam (*Prunus cerosus*) (Takemoto *et al.*, 2010). *S. commune* juga bersifat parasit pada pohon mangga (*Mangifera indica* L.) di Changa Manga Forest Pakistan dan *S. commune* merupakan jamur yang paling agresif menginfeksi pohon jenis berangan kuda (*Aesculus hippocastaneum*) yang di tanaman di pinggir jalan di Kota Lithuania (Nasreen *et al.*, 2015). Monahan (1998), melaporkan bahwa jamur *S. commune* juga menyebabkan pembusukan (*decay*) dan pelapukan (*deterioration*) pada bambu (*Bambusa vulgaris* Schrad). Lebih lanjut Nasreen *et al.* (2015), juga melaporkan bahwa *S. commune* merupakan jamur pelapuk putih (*white rot*), yang menghasilkan enzim pendegradasi berupa lignin (ligninolitik) yang mampu untuk merombak lignin dan enzim selulase mampu untuk merombak selulosa pada tanaman.

Jamur pelapuk kayu mampu merusak selulosa dan lignin dengan cara menguraikan kayu melalui proses enzimatik dari bentuk yang kompleks menjadi lebih sederhana. Jamur *S. commune* juga sebagai patogen biodegradasi kayu yang memiliki kemampuan mendegradasi lignin, mampu menyerang batang tanaman yang masih hidup, terutama di bagian empulur kayu yang sel-selnya sudah mati atau cabang yang patah. Aktivitas ekstraselulernya didominasi oleh enzim selulase, sehingga menyebabkan dinding sel kayu mengalami degradasi (Erwin *et al.*, 2008). Hal ini menyebabkan bobot kayu menjadi menurun pada saat penyimpanan. Besarnya nilai kehilangan bobot kayu akibat serangan jamur dalam waktu tertentu menunjukkan tingkat penyerangan jamur terhadap kayu tersebut (Fitriyani, 2010).

Penurunan bobot kayu ini terkait dengan variasi kandungan ekstraktif pada kayu. Butterfield (2006) menyatakan bahwa zat ekstraktif sangat penting dalam memperlambat pelapukan kayu oleh jamur. Pernyataan ini juga dikuatkan oleh Bowyer *et al.* (2003) yang menyebutkan bahwa jamur pelapuk kayu mendegradasi sel dari lumen ke luar dinding sel sehingga menjadi tipis, tetapi kayu tidak menyusut atau retak, bentuk kayu relatif tetap, tetapi menjadi massa serabut terurai serta berongga, sehingga kualitas kayu menurun. Lebih lanjut Clausen dan Kartal (2003) juga melaporkan bahwa pelapukan kayu oleh jamur *S. commune* menyebabkan terjadinya perubahan struktur kayu akibat kerja enzim pendegradasi, sehingga mengakibatkan terjadi penurunan kekuatan kayu. Menurut Alexopoulos *et al.* (1996), jamur *Schizophyllum commune* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom	: Mycetae (Fungi)
Divisio	: Amastigomycota
Sub Divisio	: Basidiomycota
Klas	: Basidiomycetes
Sub klas	: Holobasidiomycetes
Ordo	: Aphylophorales (Agaricales)
Famili	: Schizophyllaceae (Agaricaceae)
Genus	: <i>Schizophyllum</i>
Spesies	: <i>Schizophyllum commune</i> Fries.

5.4 Daya Hambat Kandidat Jamur Antagonis terhadap Luas Koloni Jamur Patogen *S. commune* Isolat SK secara *In Vitro*

Isolat jamur antagonis dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit akar putih yang memiliki daya hambat besar (>60%) terhadap luas koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK (isolat Seririt Koleksi) secara *in vitro* yang disimpan pada media miring dalam tabung reaksi. Isolat jamur antagonis yang disimpan pada media miring, diisolasi kembali pada media PDA, kemudian dilakukan identifikasi morfologi dengan melakukan pengamatan secara makroskopis, dilanjutkan dengan pengamatan mikroskopis di mikroskop, kemudian dicocokkan dengan gambar pada penuntun identifikasi jamur dari buku CMI (*Commonwealth Mycology Institute*).

Isolat jamur yang memiliki daya hambat >60% terhadap luas koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK didapat sebanyak 37 isolat jamur yang terdiri dari: 32 isolat *Trichoderma* spp. yaitu: 26 isolat *Trichoderma* spp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan 6 isolat yang diisolasi dari rizosfer

tanaman duwet; 3 isolat *Aspergillus* spp. yang meliputi 1 isolat diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan 2 isolat diisolasi dari rizosfer tanaman duwet; 1 isolat *Penicillium* sp. diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh serta 1 isolat *Fusarium* sp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh, seperti disajikan pada Tabel 5.2.

Tabel 5.2
Aktivitas penghambatan beberapa isolat kandidat jamur antagonis terhadap luas koloni jamur patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh secara *in vitro* (diinkubasi selama 5 hari pada suhu 28°C)

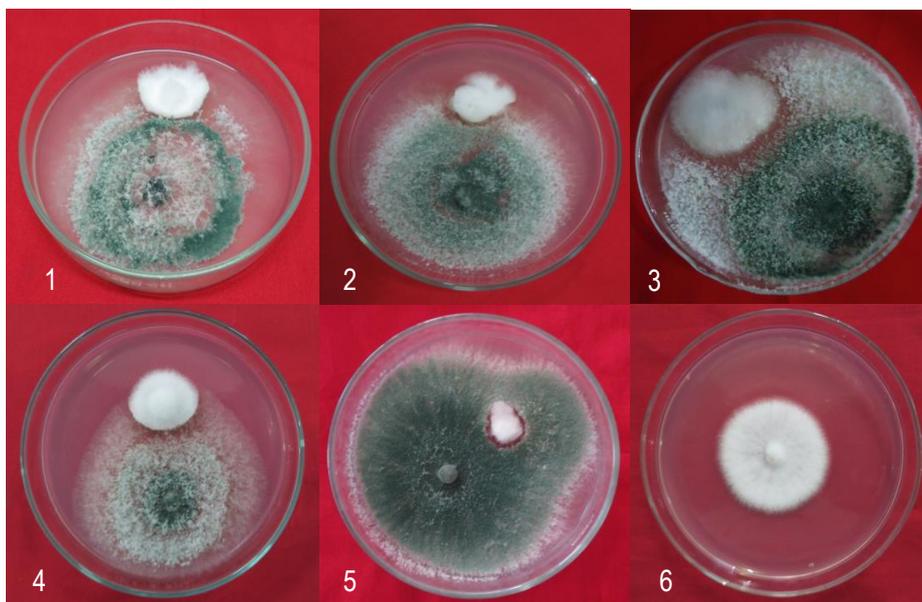
No.	Nama Isolat	Asal Isolat (Desa, Kecamatan, Kabupaten)	Daya Hambat (%)	Keterangan
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
1.	BK1	Ungasan, Kuta Selatan, Badung	65,76	<i>Trichoderma</i> (b)
2.	BK2	Ungasan, Kuta Selatan, Badung	88,26	<i>Trichoderma</i> (b)
3.	BK3	Ungasan, Kuta Selatan, Badung	64,73	<i>Aspergillus</i> (b)
4.	PB1	Pecatu, Kuta Selatan, Badung	67,50	<i>Aspergillus</i> (b)
5.	PB2	Pecatu, Kuta Selatan, Badung	68,85	<i>Trichoderma</i> (b)
6.	BD1	Pelaga, Petang, Badung	89,57	<i>Trichoderma</i> (a)
7.	BD2	Pelaga, Petang, Badung	67,15	<i>Trichoderma</i> (a)
8.	KG1	Kerta, Payangan, Gianyar	65,60	<i>Trichoderma</i> (a)
9.	KG2	Kerta, Payangan, Gianyar	66,72	<i>Trichoderma</i> (a)
10.	KB1	Dauasa, Kintamani, Bangli	65,15	<i>Aspergillus</i> (a)
11.	KB2	Dauasa Kintamani, Bangli	65,87	<i>Trichoderma</i> (a)
12.	RK1	Rendang, Rendang, Karangasem	63,70	<i>Trichoderma</i> (a)
13.	RK2	Rendang, Rendang, Karangasem	68,00	<i>Trichoderma</i> (a)
14.	UB1	Unggahan, Seririt, Buleleng	67,55	<i>Trichoderma</i> (a)
15.	UB2	Unggahan, Seririt, Buleleng	64,75	<i>Trichoderma</i> (a)
16.	UB3	Unggahan, Seririt, Buleleng	66,65	<i>Trichoderma</i> (a)
17.	UB4	Unggahan, Seririt, Buleleng	70,90	<i>Trichoderma</i> (a)
18.	UB5	Unggahan, Seririt, Buleleng	62,88	<i>Trichoderma</i> (a)
19.	MB1	Munduk, Banjar, Buleleng	87,00	<i>Trichoderma</i> (a)
20.	MB2	Munduk, Banjar, Buleleng	67,65	<i>Trichoderma</i> (a)
21.	JB1	Umejero, Busungbiu, Buleleng	90,14	<i>Trichoderma</i> (a)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
22.	JB2	Umejero, Busungbiu, Buleleng	69,03	<i>Trichoderma</i> (a)
23.	JB3	Umejero, Busungbiu, Buleleng	70,15	<i>Trichoderma</i> (a)
24.	BB1	Busungbiu, Busungbiu, Buleleng	62,75	<i>Trichoderma</i> (a)
25.	BB2	Busungbiu, Busungbiu, Buleleng	65,15	<i>Trichoderma</i> (a)
26.	TB	Telaga, Busungbiu, Buleleng	65,20	<i>Trichoderma</i> (a)
27.	SR1	Seririt, Seririt, Buleleng	63,22	<i>Fusarium</i> (a)
28.	SR2	Seririt, Seririt, Buleleng	62,25	<i>Trichoderma</i> (a)
29.	SR3	Seririt, Seririt, Buleleng	66,95	<i>Trichoderma</i> (a)
30.	PJ1	Asahduren, Pekutatan, Jemberana	68,15	<i>Trichoderma</i> (a)
31.	PJ2	Asahduren, Pekutatan, Jemberana	62,60	<i>Penicillium</i> (a)
32.	PT	Belimbing, Pupuan, Tabanan	67,73	<i>Trichoderma</i> (a)
33.	MT1	Petiga, Marga, Tabanan	65,50	<i>Trichoderma</i> (a)
34.	MT2	Petiga, Marga, Tabanan	63,00	<i>Trichoderma</i> (a)
35.	LC1	Sampora, Cibinong, Cibinong	69,80	<i>Trichoderma</i> (a)
36.	LC2	Sampora, Cibinong, Cibinong	88,04	<i>Trichoderma</i> (a)
37.	LC3	Sampora, Cibinong, Cibinong	71,55	<i>Trichoderma</i> (a)

Keterangan: (a) = isolat antagonis berasal dari rizosfer tanaman cengkeh
(b) = isolat antagonis berasal dari rizosfer tanaman duwet

Tabel 5.2 menunjukkan pengujian terhadap 37 isolat jamur antagonis dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet terhadap daya hambat luas koloni patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh (*S. commune* isolat SK) sebagai perlakuan kontrol secara *in vitro*, didapatkan 32 isolat *Trichoderma* spp. yang menunjukkan daya hambat antara 62,25 sampai 90,14%; 3 isolat *Aspergillus* spp. daya hambatnya antara 64,73 sampai 67,50%; 1 isolat *Penicillium* sp. daya hambatnya sebesar 62,60% dan 1 isolat *Fusarium* sp. daya hambatnya sebesar 63,22%. Dari Tabel 5.2 didapat 5 (lima) isolat *Trichoderma* spp. yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet menunjukkan paling berpotensi menghambat pertumbuhan luas koloni jamur *S.*

commune isolat SK sebagai patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh dengan daya hambat tinggi (>80%) yaitu: isolat (BK2, BD1, MB1, JB1, LC2) dan isolat JB1 memiliki daya hambat tertinggi (Gambar 5.11).



Gambar 5.11

Isolat kandidat jamur antagonis yang diuji daya hambat dengan jamur patogen (secara *in vitro*, inkubasi selama 5 hari, pada suhu 28°C)

1= BK2 (Ungahan, Kuta Selatan, Badung); 2= BD1 (Pelaga, Petang, Badung);
 3= MB1 (Munduk, Banjar, Buleleng); 4= LC2 (Sampora, Cibinong, Cibinong);
 5= JB1 (Umejero, Busungbiu, Buleleng (isolat terbaik);
 6= SK (patogen dari Unggahan, Seririt, Buleleng)

Gambar 5.11, merupakan pengujian *dual culture* yang berupa persentase daya hambat dari kelima kandidat jamur antagonis terhadap pertumbuhan luas koloni jamur patogen. Hasil pengamatan visual uji antagonis *Trichoderma* spp. terhadap jamur patogen *S. commune* isolat SK dengan metode *dual culture* memperlihatkan pertumbuhan koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK ke arah titik tengah cawan Petri lebih lambat dibanding pertumbuhan koloni kandidat jamur antagonis *Trichoderma* spp.

Isolat kandidat jamur antagonis ini belum diidentifikasi sampai pada tingkat spesies, maka untuk penamaan awal diberi nama *Trichoderma* sp. isolat BK2 (Ungasan, Kuta Selatan, Badung); BD1 (Pelaga, Petang, Badung); MB1 (Munduk, Banjar, Buleleng); JB1 (Umejero, Busungbiu, Buleleng) dan isolat LC2 (Sampora, Cibinong, Cibinong). Data persentase daya hambat yang didapat dianalisis dan dilanjutkan dengan melakukan uji BNT pada taraf 5%, untuk mengetahui signifikansi daya hambat masing-masing isolat antagonis *Trichoderma* spp. (Tabel 5.3).

Tabel 5.3
Rata-rata persentase daya hambat *Trichoderma* spp. terhadap luas koloni jamur patogen isolat SK pada PDA secara *in vitro* (inkubasi 5 hari)

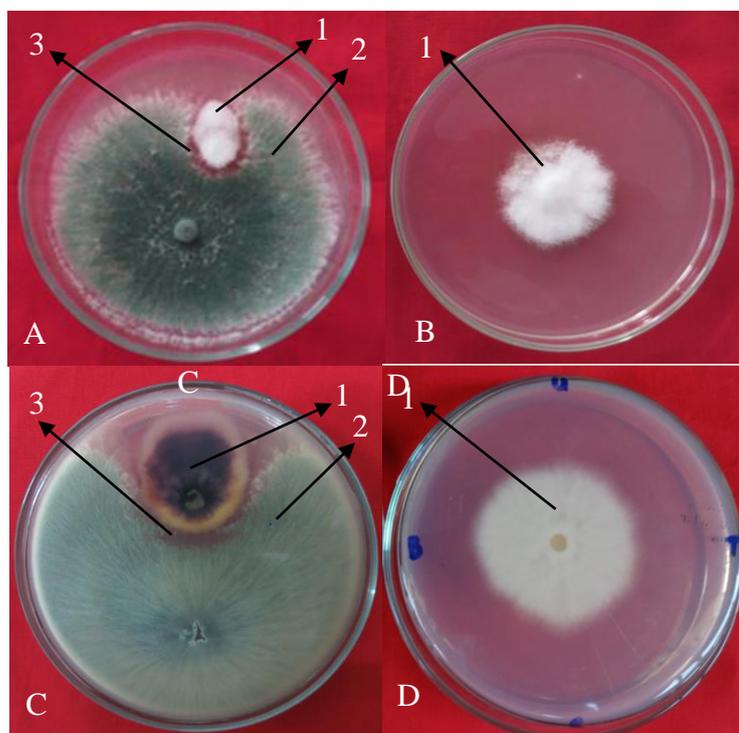
No.	Ulangan	Perlakuan					BNT 5%
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	
1.	I	86,59	87,63	85,57	87,63	86,59	
2.	II	89,58	90,62	87,50	90,62	88,54	
3.	III	88,54	90,62	88,54	91,67	88,54	
4.	IV	88,42	89,47	86,31	90,53	88,42	
5.	Total	353,13	358,34	347,92	360,45	349,98	
6.	Rata-rata	88,28 bc	89,59 ab	86,98 c	90,11 a	88,02 bc	1,786

Keterangan:

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 5.3 kelima isolat kandidat jamur antagonis memiliki persentase daya hambat berbeda-beda terhadap pertumbuhan luas koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK pada media PDA secara *in vitro*. Daya hambat antagonis isolat JB1, BD1, BK2, LC2 dan isolat MB1 menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap luas koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK. Uji BNT pada taraf 5% perlakuan isolat MB1 menunjukkan tidak berbeda

nyata ($P>0,05$) dengan perlakuan isolat BK2 dan LC2, namun isolat MB1 berbeda nyata ($P<0,05$) dengan isolat BD1 dan isolat JB1. Isolat JB1 menunjukkan tidak berbeda nyata dengan isolat BD1, tetapi isolat BD1 tidak berbeda nyata dengan isolat BK2 dan LC2. Hal ini menunjukkan bahwa isolat JB1 memiliki daya hambat paling kuat terhadap luas koloni jamur patogen *S. commune*, yaitu 90,11%. Oleh karena itu *Trichoderma* sp. isolat JB1 kembali diuji daya hambatnya terhadap jamur patogen dengan metode *dual culture* secara *in vitro*, disajikan pada Gambar 5.12.



Gambar 5.12

Daya hambat *Trichoderma* sp. isolat JB1 terhadap jamur *S. commune* isolat SK

A = pengujian dengan metode *dual culture* (inkubasi 5 hari)

B = koloni jamur patogen isolat SK (kontrol) (inkubasi 5 hari)

C = pengujian dengan metode *dual culture*, patogen berwarna coklat kehitaman, diduga antagonis menekan dan menghasilkan senyawa antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan koloni patogen (dilihat dari permukaan bawah cawan Petri) (inkubasi 5 hari)

D = koloni patogen isolat SK (permukaan bawah cawan Petri) (inkubasi 7 hari).

(tanda panah 1 = patogen isolat SK; 2 = antagonis isolat JB1; 3 = zone hambatan)

Berdasarkan Gambar 5.12 perlakuan kontrol menunjukkan pertumbuhan jari-jari koloni jamur patogen isolat SK lebih cepat dibandingkan pertumbuhan koloni jamur patogen isolat SK di cawan Petri perlakuan *dual culture*. Pertumbuhan luas koloni patogen *S. commune* isolat SK sangat lambat dan terjadi perubahan warna koloni jamur patogen pada perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat JB1. Kondisi ini terjadi diduga karena pertumbuhan jamur patogen isolat SK pada perlakuan *dual culture* mendapat tekanan dan pengaruh senyawa antibiotik yang dieksekresikan antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1, sehingga terjadi kegagalan dalam perluasan koloni jamur patogen isolat SK didekat antagonis isolat JB1 pada media PDA dan koloni jamur patogen menjadi berwarna coklat kehitaman bila dilihat dari permukaan bawah cawan Petri.

Interaksi antara jamur antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 dengan jamur patogen isolat SK diduga antagonis *Trichoderma* sp. menghasilkan suatu senyawa antibiostatik, sehingga menyebabkan terbentuk zone hambatan sebesar 2,00 mm (masa inkubasi 5 hari pada suhu 28°C). Semakin besar zone hambatan yang terbentuk, maka semakin tinggi daya antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1. Zone hambatan yang terbentuk pada pengujian *dual culture* di media PDA dalam cawan Petri, mengindikasikan adanya metabolit atau senyawa aktif yang dieksekresikan oleh jamur antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Herliyana *et al.* (2013) yaitu adanya penghambatan terhadap pertumbuhan diameter koloni patogen *Ganoderma* sp. diduga karena adanya senyawa antibiotik yang diproduksi *Trichoderma* sp. sehingga menyebabkan pertumbuhan luas koloni patogen menjadi lambat.

Herliyana *et al.* (2013) menyatakan bahwa perbedaan daya hambat dari antagonis menggambarkan perbedaan kemampuan masing-masing isolat untuk menghambat pertumbuhan luas koloni patogen. Lebih lanjut Herliyana *et al.* (2013) menyebutkan perbedaan daya hambat ini diduga dipengaruhi oleh jenis, kuantitas dan kualitas antibiotik atau senyawa sekunder yang dihasilkan *Trichoderma* sp. yang dapat menghambat pertumbuhan luas koloni pathogen. Hasil penelitian Suanda dan Ratnadi (2015), mendapatkan bahwa *Trichoderma* sp. isolat JB1 dapat menghambat pertumbuhan luas koloni *Sclerotium rolfsii* penyebab penyakit rebah kecambah (*damping off*) pada tanaman tomat sebesar 95,45% secara *in vitro*. Lebih lanjut Chaube (2003) juga melaporkan *Trichoderma* sp. memiliki sifat kompetisi yang tinggi terhadap nutrien dan ruang, menghasilkan senyawa antibiotik yang mampu menghambat atau membunuh mikroba lain. Hal ini dipertegas lagi oleh Sivasithamparam dan Ghisalberti (1998), menyatakan bahwa *Trichoderma* sp. dapat menghasilkan metabolit sekunder yang dapat berperan dalam kompetisi terhadap mikroorganisme lainnya.

Trichoderma sp. juga telah dipercaya memiliki kemampuan hidup yang lebih baik dan daya kompetisi cukup tinggi pada berbagai kondisi (Rahman *et al.*, 2011). Dalam berkompetisi *Trichoderma* sp. dengan patogen berbagai mekanisme dapat terjadi, seperti memproduksi antibiotik atau enzim yang dapat mengganggu proses fisiologis dari patogen. *Trichoderma* sp. banyak digunakan sebagai agensia hayati untuk mengendalikan patogen tular tanah yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma* sp. dan jamur *Rigidoporus microporus* (Widyastuti, 2006; Jayasuriya dan Thennakoon, 2007). Harman *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. memproduksi senyawa ekstraseluler eksokitinase yang bersifat

fungitoksik dan mampu mendegradasi dinding sel jamur patogen. Lebih lanjut Steyaert *et al.* (2003), melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. merupakan jamur hiperparasit yang sudah banyak digunakan sebagai biokontrol dalam bidang pertanian, karena jamur antagonis *Trichoderma* sp. ini mampu menghasilkan enzim hidrolisis yaitu: β -1,3-glukanase, selulase, kitinase dan proteinase yang berperan sangat aktif dalam memparasitasi dinding sel inangnya (patogen).

5.5 Efektivitas *Trichoderma* spp. untuk Pengendalian Penyakit Akar Putih pada Bibit Cengkeh di Rumah Kaca

5.5.1 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh

Jamur antagonis *Trichoderma* spp. dalam bentuk kompos diberikan pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca saat pengujian pengaruh antagonis *Trichoderma* spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh. Variabel yang diamati pada pengujian pengaruh antagonis *Trichoderma* spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh, meliputi: tinggi bibit cengkeh, jumlah daun bibit cengkeh, berat basah akar dan berat kering akar bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca.

5.5.1.1 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap tinggi bibit cengkeh

Hasil analisis statistika pada pengamatan awal menunjukkan rata-rata tinggi bibit cengkeh antar perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf 5% ($P > 0,05$). Pada pengamatan I (30 HSIP) bibit cengkeh yang diinfeksi patogen isolat SK dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap tinggi bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen. Pengamatan I (30 HSIP), tinggi bibit cengkeh pada perlakuan patogen isolat SK menunjukkan tidak berbeda nyata pada taraf 5% ($P > 0,05$) dengan tinggi bibit

cengkeh pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BK2 dan isolat MB1. Tinggi bibit cengkeh pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BK2 dan isolat MB1 juga tidak berbeda nyata dengan tinggi bibit cengkeh pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BD1, JB1 dan LC2. Pada pengamatan II (60 HSIP), III (90 HSIP), IV (120 HSIP), V (150 HSIP) dan VI (180 HSIP) tinggi bibit cengkeh pada perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen, disajikan pada Tabel 5.4.

Tabel 5.4
Rata-rata tinggi bibit cengkeh setiap 30 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (cm)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	awal	72,34 ab	74,13 a	72,54 ab	73,04 ab	74,38 a	70,04 b	3,85
2.	30	75,00 bc	78,83 ab	75,42 bc	76,29 ab	79,04 a	71,67 c	4,01
3.	60	76,92 b	83,04 a	77,21 b	82,83 a	80,33 ab	72,17 c	3,46
4.	90	78,00 b	86,25 a	78,58 b	87,08 a	81,04 b	72,88 c	3,51
5.	120	81,38 b	88,71 a	81,54 b	89,25 a	83,04 b	73,88 c	3,20
6.	150	85,21 b	96,83 a	85,17 b	97,75 a	85,92 b	74,17 c	3,52
7.	180	88,96 bc	110,33 a	86,21 c	113,75 a	90,08 b	74,19 d	3,50
8.	kenaikan kumulatif	16,62	15,70	13,67	40,71	39,54	3,40	-

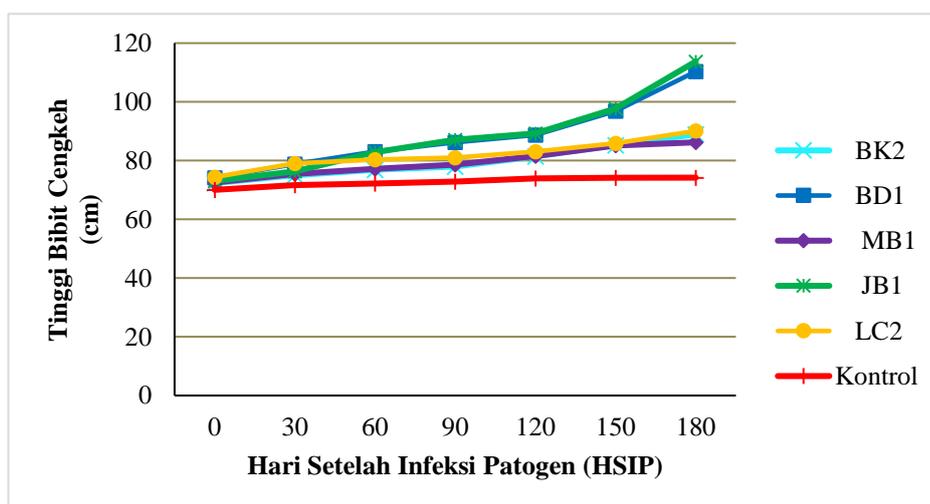
Keterangan:

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 5.4 analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%) tinggi bibit cengkeh pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan isolat BK2, LC2 dan MB1, mulai dari pengamatan III (90 HSIP), IV (120 HSIP), V (150 HSIP) dan VI (180 HSIP), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan isolat BD1. Pertumbuhan tinggi bibit cengkeh yang diaplikasikan *Trichoderma* spp. mengalami

peningkatan yang tajam dari pengamatan I (30 HSIP) sampai pengamatan VI (180 HSIP).

Bibit cengkeh yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat JB1 mengalami pertumbuhan tinggi paling pesat yaitu 113,75 cm disusul oleh *Trichoderma* sp. isolat BD1, yaitu 110,33 cm pada pengamatan VI (180 HSIP) dan meninggalkan pertumbuhan tinggi bibit cengkeh pada perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat MB1, BK2 dan LC2. Bibit cengkeh yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat MB1 pertumbuhannya sebesar 86,21 cm; isolat BK2 yaitu 88,96 dan isolat LC2 adalah 90,08 pada pengamatan VI (180 HSIP). Grafik tinggi bibit cengkeh pengamatan setiap 30 hari. Pertumbuhan tinggi bibit cengkeh pada perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen terjadi sangat lambat dari pengamatan I (30 HSIP), II (60 HSIP), III (90 HSIP), IV (120 HSIP) dan V (150 HSIP), bahkan tidak ada pertumbuhan tinggi bibit cengkeh pada pengamatan VI (180 HSIP), seperti disajikan pada Gambar 5.13.



Gambar 5.13

Grafik tinggi bibit cengkeh setiap 30 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (BK2 = Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2 = Sampora, Cibinong, Cibinong; MB1 = Munduk, Banjar, Buleleng; JB1 = Umejero, Busungbiu, Buleleng; BD1 = Pelaga, Petang, Badung; kontrol = patogen Unggahan, Seririt,

Bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen *S. commune* isolat SK dan tidak diaplikasikan *Trichoderma* spp. pertumbuhan tinggi bibit cengkeh sangat lambat dan tidak terjadi pertumbuhan tinggi pada pengamatan VI (180 HSIP). Hal ini disebabkan karena bibit cengkeh pada perlakuan yang tidak diaplikasikan *Trichoderma* spp. di bagian akar serabut dan pangkal akar sudah terinfeksi jamur patogen penyakit akar putih (Gambar 5.13). Bibit cengkeh dalam *polybag* yang dicabut saat pengamatan VI (180 HSIP), akar bibit cengkeh sudah terinfeksi jamur patogen, sehingga akar tidak mampu menyerap unsur hara dan air untuk proses fotosintesis yang menyebabkan bibit cengkeh pertumbuhannya terganggu dan terhambat, akibatnya bibit cengkeh mengalami kelayuan dan akhirnya mati. Pada perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat JB1 pertumbuhan tinggi bibit cengkeh sangat cepat, karena *Trichoderma* sp. isolat JB1 memiliki kemampuan pertumbuhan yang sangat cepat di sekitar perakaran dan diduga juga menghasilkan senyawa antibiotik untuk menekan jamur patogen *S. commune* isolat SK.

Kemampuan beberapa spesies dari genus *Trichoderma* sp. sebagai mikroba biokontrol sangat efektif untuk menghambat pertumbuhan jamur patogen tanaman dikaitkan dengan kemampuannya menghasilkan enzim kitinase (Paulitz dan Belanger, 2001). Lebih lanjut Martins *et al.* (2008) melaporkan bahwa jamur *T. reesei* dapat menghasilkan enzim endo- β -1,3-glukanase dan ekso- β -1,3-glukanase sampai dengan 80%. Beberapa jenis *Trichoderma*, seperti: *T. harzianum*, memiliki kemampuan sebagai biokontrol terhadap patogen tanaman (Jeger *et al.*, 2009).

Enzim kitinase yang diproduksi oleh genus *Trichoderma* sp. lebih efektif untuk menghambat berbagai jamur patogen tanaman dibandingkan enzim kitinase yang dihasilkan jamur lain (Lorito *et al.*, 1994). Shores *et al.* (2005) menyatakan bahwa enzim kitinase dapat berperan sebagai elisitor dalam menginduksi ketahanan tanaman. Seiring bertambahnya umur tanaman, maka keberadaan jamur antagonis mampu menunjukkan mekanisme antibiosis, mikoparasit dan kompetisi sebagai penghambatan terhadap patogen dan memberikan kemudahan kepada tanaman inang dalam menyerap unsur hara (Shores *et al.*, 2005).

5.5.1.2 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap jumlah daun bibit cengkeh

Hasil analisis statistika pada pengamatan awal menunjukkan rata-rata jumlah daun bibit cengkeh antar perlakuan tidak berbeda nyata pada taraf 5% ($P>0,05$). Bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen *S. commune* isolat SK dan diaplikasikan antagonis *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P<0,05$) terhadap jumlah daun bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen, mulai dari pengamatan IV (120 HSIP), disajikan pada Tabel 5.5.

Berdasarkan Tabel 5.5 jumlah daun bibit cengkeh pada perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen pada pengamatan I (30 HSIP) dan pengamatan II (60 HSIP) tidak menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P>0,05$) dengan jumlah daun bibit cengkeh perlakuan yang diinfeksi patogen dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. Pada pengamatan VI (180 HSIP), jumlah daun bibit cengkeh pada perlakuan yang diinfeksi patogen dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P<0,05$)

dengan jumlah daun bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen (kontrol).

Tabel 5.5
Rata-rata jumlah daun bibit cengkeh setiap 30 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (helai)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	awal	51,50 ab	56,67 a	46,84 b	53,59 ab	56,17 a	54,58 ab	8,730
2.	30	55,00 ab	61,58 a	50,50 b	58,33 ab	60,00 a	56,58 ab	8,819
3.	60	60,25 ab	65,83 a	54,83 b	64,00 a	64,83 a	58,33 ab	8,871
4.	90	66,42 abc	73,50 a	61,17 bc	73,92 a	70,17 ab	58,92 c	9,402
5.	120	73,17 ab	81,75 a	63,00 c	83,08 a	75,67 ab	60,17 c	9,259
6.	150	83,17 b	95,00 a	71,42 c	95,83 a	83,58 b	59,17 c	9,393
7.	180	93,92 b	104,50 a	79,08 c	105,75 a	89,67 b	57,58 d	10,036
8.	kenaikan kumulatif	42,42	47,83	32,24	52,16	33,50	3,00	-

Keterangan:

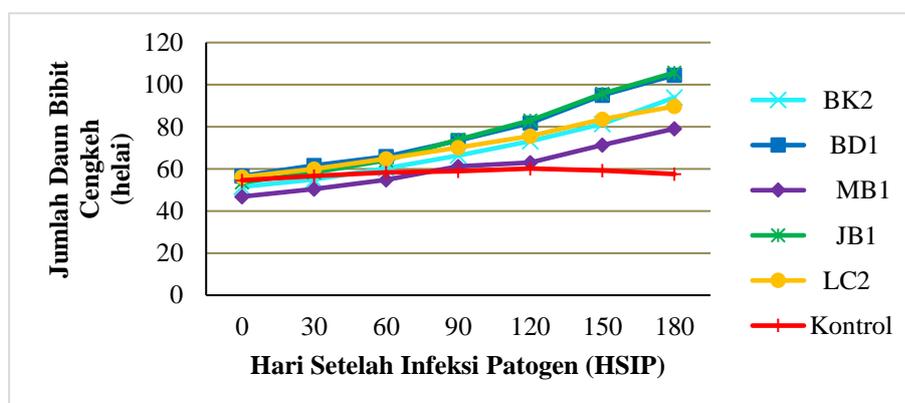
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Tabel 5.5 menunjukkan jumlah daun bibit cengkeh pada perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen pada pengamatan I (30 HSIP) dan pengamatan II (60 HSIP) tidak menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P > 0,05$) dengan jumlah daun bibit cengkeh perlakuan yang diinfeksi patogen dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. Pada pengamatan VI (180 HSIP), jumlah daun bibit cengkeh pada perlakuan yang diinfeksi patogen dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan jumlah daun bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen (kontrol).

Analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%) jumlah daun bibit cengkeh pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda nyata

pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat MB1 dan LC2, mulai dari pengamatan III (90 HSIP), IV (120 HSIP), V (150 HSIP) dan VI (180 HSIP), tetapi tidak berbeda nyata dengan perlakuan BD1. Jumlah daun bibit cengkeh paling banyak terdapat pada perlakuan infeksi patogen *S. commune* isolat SK yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat JB1 yaitu 105,75 helai, disusul jumlah daun perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BD1 sebanyak 104,50 tetapi tidak menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P > 0,05\%$).

Jumlah daun paling sedikit terjadi pada perlakuan infeksi patogen *S. commune* isolat SK tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. (kontrol) yaitu 57,58 helai karena jumlah daun cengkeh mengalami penurunan pada perlakuan kontrol hingga pengamatan VI (180 HSIP). perlakuan yang diinfeksi jamur patogen *S. commune* isolat SK dan diaplikasikan antagonis *Trichoderma* spp. menunjukkan jumlah daun bibit cengkeh meningkat terus dari pengamatan awal sampai pengamatan VI (180 HSIP) dan sebaliknya perlakuan infeksi patogen *S. commune* isolat SK yang tidak diaplikasikan *Trichoderma* spp. mengalami tren penurunan daun dari pengamatan IV (120 HSIP, V (150 HSIP) dan VI (180 HSIP), disajikan pada Gambar 5.14.



Gambar 5.14

Grafik jumlah daun bibit cengkeh setiap 30 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (BK2 = Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2 = Sampora, Cibinong, Cibinong; MB1 = Munduk Banjar, Buleleng; JB1 = Umejero, Busungbiu, Buleleng; BD1 = Pelaga Petang, Badung; kontrol = patogen Unggahan, Seririt, Buleleng)

Trichoderma spp. dapat memberikan pengaruh positif yang nyata terhadap jumlah daun bibit cengkeh, karena antagonis *Trichoderma* spp. ini sangat efektif dan berkembang dengan baik di sekitar perakaran bibit cengkeh dalam *polybag*, sehingga terjadi simbiosis mutualisme antara jamur antagonis dengan bibit cengkeh yang dilindunginya. Elad dan Freeman (2002); Harman (2006) menyatakan bahwa mekanisme utama pengendalian patogen tanaman yang bersifat tular tanah dengan menggunakan jamur *Trichoderma* sp. dapat melalui mikoparasitisme, antibiosis, kompetisi nutrisi, melarutkan nutrisi anorganik, menginaktivasi enzim patogen dan menginduksi resistensi tanaman inang. Hasil penelitian Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (2002) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. ternyata juga memberikan pengaruh positif pada pertumbuhan vegetatif dan perkembangan generatif tanaman serta hasil panen.

5.5.1.3 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap berat basah akar bibit cengkeh

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen *S. commune* isolat SK dan diaplikasikan antagonis *Trichoderma* spp. berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap berat basah akar bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen dan tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. Analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%) perlakuan antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan perlakuan antagonis *Trichoderma* sp. isolat BK2, LC2 dan MB1, tetapi tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BD1 pada pengamatan III (180 HSI), yang disajikan pada Tabel 5.6.

Tabel 5.6
Rata-rata berat basah akar bibit cengkeh setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP)
(gram)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	60	9,36 b	9,37 b	9,30 b	10,08 a	9,18 b	6,86 c	0,486
2.	120	9,71 c	10,17 b	9,48 c	11,49 a	9,63 c	7,23 d	0,448
3.	180	11,08 b	11,69 a	11,05 b	11,90 a	11,09 b	7,95 c	0,401

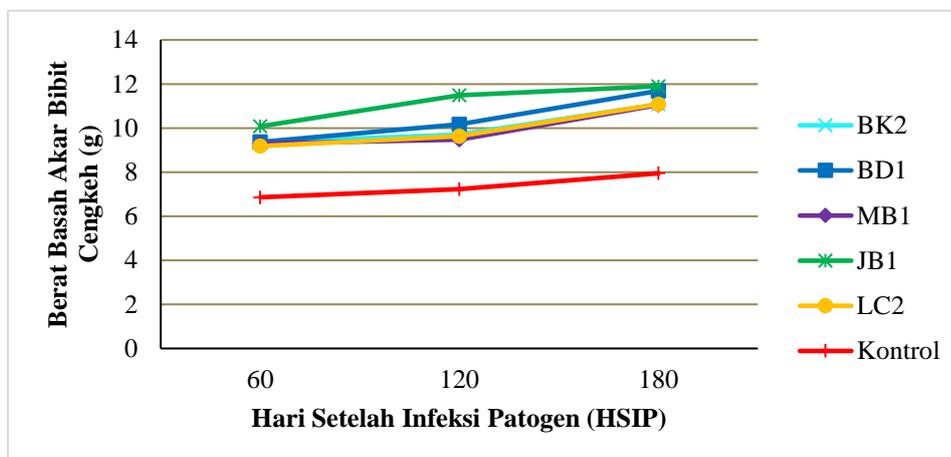
Keterangan:

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 5.6 pada perlakuan aplikasi *Trichoderma* sp. isoalt JB1 menunjukkan berat basah akar bibit cengkeh paling besar, karena *Trichoderma* sp. isolat JB1 mampu berkembangbiak dengan cepat dan mengkolonisasi akar bibit cengkeh dalam *polybag* pada percobaan di rumah kaca. Gusnawaty *et al.* (2014) menyatakan bahwa *Trichoderma* sp. dapat berkembangbiak dengan cepat pada daerah perakaran tanaman. Pendapat ini diperkuat lagi oleh Harrison dan Van Buuren (1995); Bryla dan Koide (1998), melaporkan *Trichoderma* sp. yang telah mengkolonisasi akar tanaman inang dapat membantu tanaman inang menyerap unsur hara tertentu terutama fosfat.

Serapan unsur hara yang banyak oleh akar tanaman dapat mempengaruhi pertumbuhan tanaman karena nutrisi yang dibutuhkan oleh tanaman dapat terpenuhi, sehingga pertumbuhan vegetatif tanaman termasuk pertumbuhan akar juga semakin banyak (Cornejo *et al.*, 2009). Lebih lanjut Sumarsih (2003) menyatakan, bahwa antagonis *Trichoderma* sp. mampu menekan perkembangan patogen penyakit tanaman dan mampu juga merombak bahan organik menjadi substansi yang bermanfaat bagi tanaman inang. Grafik perlakuan *Trichoderma*

spp. terhadap berat basah akar bibit cengkeh pada percobaan di rumah kaca, disajikan pada Gambar 5.15.



Gambar 5.15

Grafik berat basah akar bibit cengkeh setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP)

(BK2= Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2= Sampora, Cibinong, Cibinong; MB1= Munduk, Banjar, Buleleng; JB1= Umejero, Busungbiu, Buleleng; BD1= Pelaga, Petang, Badung; kontrol= patogen Unggahan, Seririt, Buleleng)

5.5.1.4 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap berat kering akar bibit cengkeh

Hasil analisis statistika bahwa bibit cengkeh yang diinfeksi patogen *S. commune* isolat SK dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap berat kering akar bibit cengkeh pada perlakuan infeksi patogen *S. commune* isolat SK tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. Analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%), pada pengamatan I (60 HSIP), pengamatan II (120 HSIP) dan pengamatan III (180 HSIP) perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BK2, LC2, MB1 dan BD1. Peningkatan berat kering akar bibit cengkeh yang terjadi pada perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1, seperti disajikan pada Tabel 5.7.

Tabel 5.7
Rata-rata berat kering akar bibit cengkeh setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (gram)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	60	6,83 b	6,97 b	6,78 b	7,46 a	6,76 b	5,37 c	0,335
2.	120	7,43 b	7,56 b	7,24 b	8,49 a	7,26 b	5,45 c	0,375
3.	180	8,11 bc	8,50 a	7,84 c	8,84 a	7,79 c	5,57 d	0,346

Keterangan:

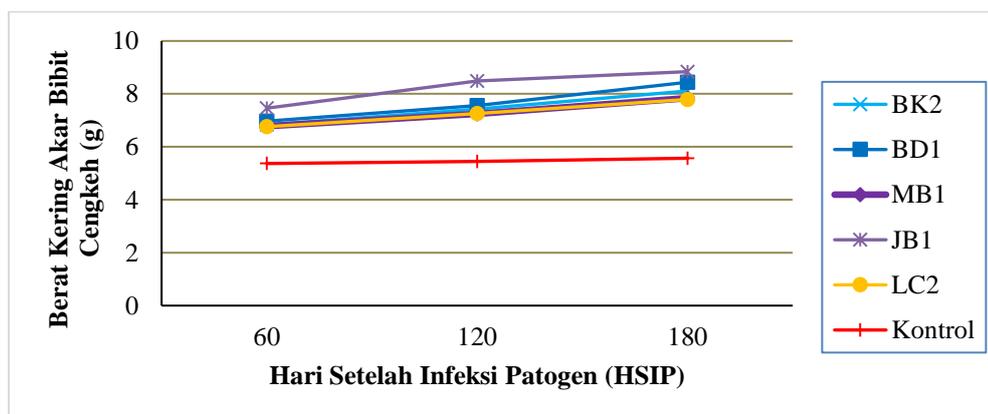
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Tabel 5.7 menunjukkan terjadi peningkatan berat kering akar bibit cengkeh yang signifikan pada perlakuan yang diaplikasikan *Trichoderma* spp. terhadap berat kering akar bibit cengkeh perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen (kontrol). Hal ini disebabkan karena antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 pada saat mengkolonisasi akar tanaman cengkeh, juga menghasilkan senyawa antibiotik yang memiliki kemampuan menekan pertumbuhan koloni jamur patogen, sehingga pertumbuhan tanaman inang menjadi lebih baik. Hasil penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Simanungkalit (1993), bahwa penggunaan *Trichoderma* sp. pada tanaman kedelai, mampu meningkatkan berat kering tanaman. Kondisi ini diduga karena jamur antagonis *Trichoderma* spp. memiliki mekanisme PGPF (*Plant Growth Promoting Fungi*).

Agrios (2005), menyatakan bahwa tanaman inang yang diaplikasikan biokontrol akan bereaksi terhadap patogen yang menyerangnya, sehingga memungkinkan terjadi perubahan fisiologi tanaman inang, seperti: respirasi, fotosintesis dan translokasi, transpirasi, pertumbuhan serta perkembangan menjadi lebih baik. Pendapat ini dipertegas lagi oleh Castro *et al.* (2009), yang

menyatakan bahwa *T. virens* adalah kompetitor ruang tumbuh yang sangat baik, pertumbuhannya yang cepat, dapat mengkolonisasi dan tumbuh berasosiasi pada perakaran tanaman dengan baik, serta secara signifikan meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan tanaman. *T. virens* juga menghasilkan hormon auksin berupa IAA (*Indole Asetic Acid*) yang berperan dalam pemanjangan sel-sel akar tanaman, sehingga menyebabkan terjadinya serapan hara semakin luas dan semakin besar, kondisi yang menguntungkan bagi tanaman ini tidak terjadi pada tanaman yang tidak diaplikasikan biokontrol.

Jamur antagonis yang bersifat mutualisme dapat membantu proses penyerapan unsur hara yang dibutuhkan tanaman serta melindungi tanaman inang dari serangan patogen melalui mekanisme kompetisi, induksi resistensi, antibiosis dan mikoparasit serta hasil fotosintesis inangnya dapat digunakan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya (Clay, 1996). *Trichoderma* sp. yang berasosiasi dengan akar tanaman dapat membantu tanaman inang dalam menyerap unsur hara dari media tumbuh (Shivanna *et al.*, 1995). Grafik berat kering akar bibit cengkeh disajikan pada Gambar 5.16.



Gambar 5.16

Grafik berat kering akar bibit cengkeh setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP)

(BK2= Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2= Sampora, Cibinong, Cibinong; MB1= Munduk, Banjar, Buleleng; JB1= Umejero, Busungbiu, Buleleng; BD1= Pelaga, Petang, Badung; kontrol= patogen Unggahan, Seririt, Buleleng)

Kehadiran *Trichoderma* sp. secara ekologis dapat memberikan dampak positif pada tanah perkebunan, sehingga akar tanaman yang dikolonisasi antagonis *Trichoderma* sp. mempunyai kemampuan antagonistik yang kuat terhadap patogen busuk akar pada tanaman kopi (Samingan *et al.*, 2012). Lebih lanjut Ozbay *et al.* (2004) juga melaporkan bahwa pengaplikasian *Trichoderma* sp. dapat meningkatkan pertumbuhan tinggi tanaman, berat basah dan berat kering tanaman.

5.5.2 Pengaruh *Trichoderma* spp. terhadap intensitas serangan penyakit

Hasil analisis statistika menunjukkan bahwa perlakuan bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen *S. commune* isolat SK dan diaplikasikan antagonis *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) terhadap intensitas serangan penyakit akar putih pada bibit cengkeh yang hanya diinfeksi jamur patogen pada percobaan di rumah kaca. Analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%), pada pengamatan I (60 HSIP), intensitas serangan penyakit menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) antar perlakuan yang diaplikasikan antagonis *Trichoderma* spp. (Tabel 5.8).

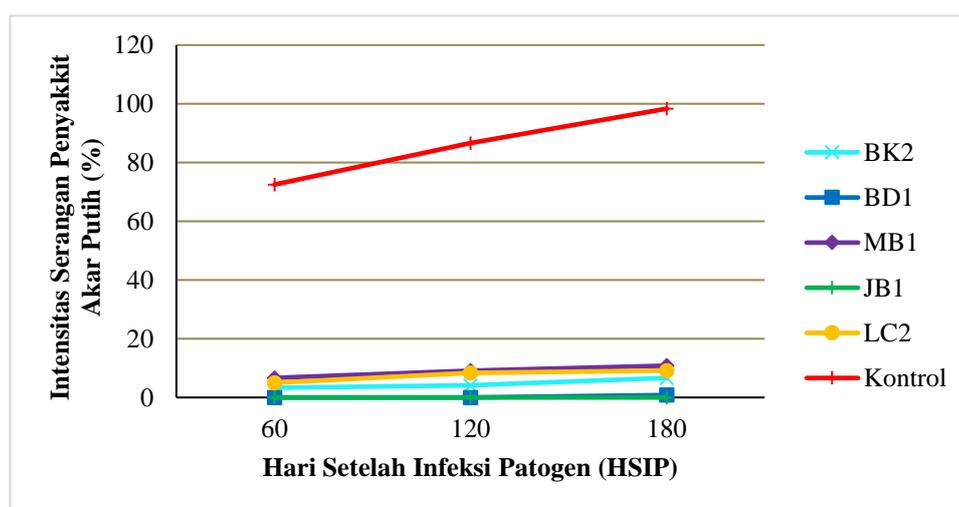
Tabel 5.8
Rata-rata intensitas serangan penyakit pada bibit cengkeh setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (%)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	60	3,33 a	0,00 a	6,67 a	0,00 a	4,99 a	72,50 b	7,989
2.	120	4,17 ab	0,00 a	9,17 b	0,00 a	8,33 b	86,67 c	5,717
3.	180	6,67 b	0,83 a	10,83 c	0,00 a	9,17 bc	98,33 d	3,275

Keterangan:

Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Pengamatan III (180 HSIP) perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$) dengan perlakuan *Trichoderma* sp. isolat BK2, LC2 dan MB1, tetapi isolat JB1 tidak menunjukkan berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan isolat BD1 (Tabel 5.8). Dari Tabel 5.8 ternyata bibit cengkeh yang diinfeksi patogen *S. commune* isolat SK dan tanpa diaplikasikan *Trichoderma* spp. (kontrol), menunjukkan intensitas serangan penyakit akar putih sangat cepat pada pengamatan I (60 HSIP) yaitu sebesar 72,50%; pengamatan II (120 HSIP) yaitu 86,67% dan meningkat lagi hingga mencapai 98,33% saat pengamatan III (180 HSIP), katagori serangan berat (skor 3). Grafik perlakuan *Trichoderma* spp. terhadap intensitas serangan penyakit akar putih setiap 60 HSIP (Gambar 5.17).



Gambar 5.17

Grafik intensitas serangan penyakit akar putih pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP) (BK2 = Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2 = Sampora, Cibinong, Cibinong; MB1 = Munduk, Banjar, Buleleng; JB1 = Umejero, Busungbiu, Buleleng; BD1 = Pelaga, Petang, Badung; kontrol = patogen Unggahan, Seririt, Buleleng)

Gambar 5.17 memperlihatkan intensitas serangan penyakit akar putih pada bibit cengkeh pada perlakuan yang hanya diinfeksi patogen *S. commune* isolat SK, sangat tinggi dan sebaliknya pada perlakuan yang diinfeksi patogen

dan diaplikasikan *Trichoderma* spp. menunjukkan intensitas serangan jauh berada di bawahnya. Hal ini diduga disebabkan oleh keaktifan antagonis *Trichoderma* spp. sebagai biokontrol yang tumbuh lebih cepat karena ketersediaan nutrisi dan beradaptasi dengan mengkolonisasi akar bibit cengkeh serta melakukan mekanisme antagonistik. Menurut Gaigole *et al.* (2011), bahwa pemberian *Trichoderma* sp. yang terkandung dalam bahan organik dapat menekan intensitas serangan penyakit yang disebabkan patogen tular tanah. Pendapat ini juga didukung oleh pernyataan Umrah *et al.* (2009) yang menyebutkan bahwa rendahnya intensitas serangan penyakit pada perlakuan *Trichoderma* sp. karena terjadi pertumbuhan yang pesat *Trichoderma* sp. disekitar perakaran tanaman inang, sehingga mampu berkompetisi dengan menghasilkan senyawa antibiotik

Senyawa antibiotik sebagai antijamur, seperti: viridin dan trichomidin yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. dapat menghambat dan bahkan mematikan jamur patogen (Kucuk dan Kivanc, 2003). Menurut Atanasova *et al.* (2013), bahwa *Trichoderma* sp. mempunyai mekanisme pengendalian utama sebagai mikoparasit atau memparasit miselium jamur patogen dengan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel patogen untuk mengambil zat makanan dari dalam sel, sehingga jamur inang menjadi mati. Kemampuan antagonistik *Trichoderma* sp. telah diujikan terhadap beberapa patogen tanaman, seperti *Ganoderma* sp., *Rigidoporus microporus* dan *Fusarium* sp. menunjukkan efektif menekan pertumbuhan jamur patogen secara *in vitro* dan *in vivo* (Widyastuti, 2006).

T. koningii dapat menghambat pertumbuhan jamur *Ganoderma boninense* dan juga telah dilaporkan dapat mengendalikan jamur tular tanah lain yaitu jamur

akar putih pada tanaman karet (Jayasuriya dan Thenakoon, 2007)._ Lebih lanjut Bailey *et al.* (2008), menyatakan spesies *Trichoderma* yang sudah diketahui bersifat antagonis, yaitu: *T. asperellum*, *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. ovalisporum* dan *T. koningiopsis*. Villalobos *et al.* (2013) melaporkan hasil pengujian antagonis dengan metode *dual culture* diperoleh *T. asperellum* memiliki kemampuan paling tinggi dalam menghambat pertumbuhan *Sclerotinia sclerotiorum* (>60%).

Mekanisme antagonistik yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. sangat berpengaruh terhadap tingkat kerusakan akar bibit cengkeh. Pertumbuhan *Trichoderma* sp. yang cepat dan mengkolonisasi akar bibit cengkeh menyebabkan patogen *S. commune* isolat SK tidak dapat menginfeksi akar bibit cengkeh, sehingga intensitas kerusakan yang ditimbulkan ringan. Bailey *et al.* (2008) melaporkan *Trichoderma* sp. merupakan jamur antagonis yang baik digunakan sebagai agensia pengendali hayati, karena memiliki peranan penting di dalam jaringan tanaman inang yang memperlihatkan interaksi mutualistik, yaitu interaksi positif dengan tanaman inangnya dan interaksi negatif terhadap patogen tanaman. *Trichoderma* sp. telah banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman dan 90% aplikasi yang telah dilakukan berasal dari berbagai macam strain *Trichoderma* (Benitez *et al.*, 2004).

5.5.3 Populasi koloni *Trichoderma* spp.

Penghitungan populasi *Trichoderma* spp. yang terdapat pada tanah disekitar akar (rizosfer) bibit cengkeh dalam *polybag* pada masing masing perlakuan pada percobaan di rumah kaca, dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC) menggunakan alat *hand counter*. Populasi *Trichoderma* spp.

dihitung pada masing-masing pengenceran, kemudian dikalikan dengan faktor pengenceran, sehingga didapat populasi *Trichoderma* spp. dengan satuan *Colony Form Unit* per gram (*CFU/g*).

Populasi *Trichoderma* spp. pada setiap perlakuan aplikasi *Trichoderma* spp. menunjukkan berbeda sangat nyata pada taraf 5% ($P < 0,05$) dengan populasi *Trichoderma* pada perlakuan yang hanya diinfeksi jamur patogen pada bibit cengkeh dalam *polybag* pada percobaan di rumah kaca. Analisis sidik ragam pada uji beda nyata (BNT 5%), pada pengamatan I (60 HSIP), II (120 HSIP) dan III (180 HSIP), populasi *Trichoderma* sp. isolat JB1 menunjukkan tidak berbeda nyata ($P > 0,05$) dengan isolat BD1, tetapi dengan isolat BK2, MB1 dan LC2 menunjukkan berbeda nyata ($P < 0,05$), disajikan pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9
Rata-rata koloni *Trichoderma* spp. pada bibit cengkeh perlakuan antagonis setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP) ($CFU \times 10^4/g$ tanah)

No.	Pengamatan (HSIP)	Perlakuan						
		BK2	BD1	MB1	JB1	LC2	kontrol	BNT 5%
1.	60	69,75 c	84,25 a	76,50 b	86,25 a	77,75 b	0,00 d	4,844
2.	120	76,75 c	103,00 a	86,50 b	104,25 a	88,00 b	0,00 d	6,788
3.	180	83,25 c	119,75 a	99,75 b	117,75 a	99,25 b	0,00 d	6,492

Keterangan:

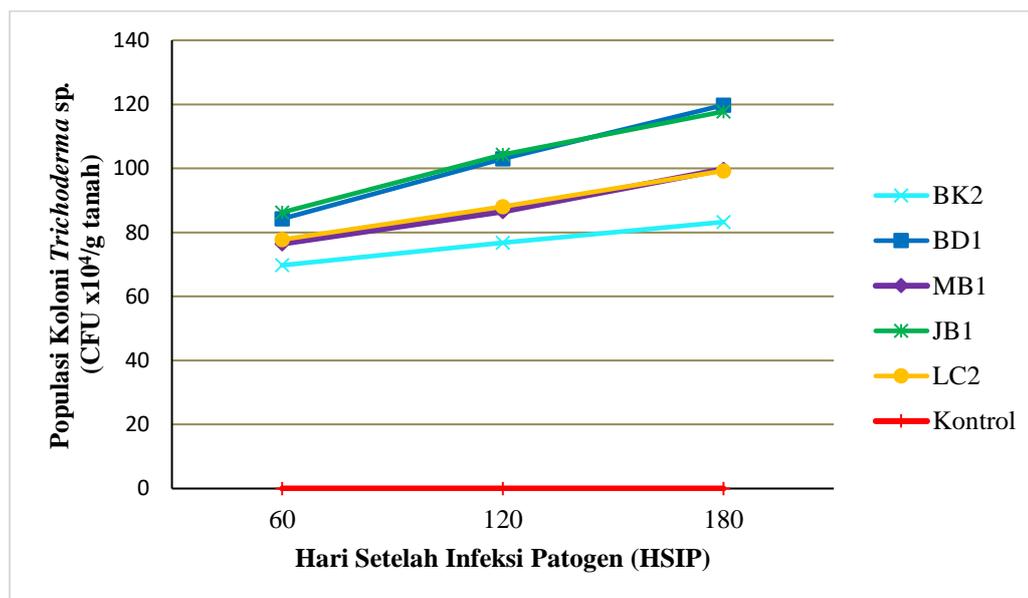
Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang sama pada baris yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji BNT 5%.

Berdasarkan Tabel 5.9 bibit cengkeh yang diaplikasikan *Trichoderma* sp. isolat BD1 dan isolat JB1 menunjukkan populasi *Trichoderma* sp. paling tinggi, dibandingkan aplikasi *Trichoderma* sp. pada perlakuan yang lain. Hal ini terjadi diduga karena pengaruh persaingan dari *Trichoderma* spp. untuk mempertahankan diri. Populasi *Trichoderma* spp. yang diaplikasikan pada bibit

cengkeh terus berkembang selama tersedianya nutrisi dan faktor lingkungan dalam tanah yang mendukung.

Kemampuan pertumbuhan dari *Trichoderma* spp. yang cepat ini, sangat cocok digunakan dalam pengendalian hayati jamur patogen pada tanaman. Pendapat ini diperkuat lagi oleh Jayasuriya dan Thennakoon (2007), yang menyatakan bahwa *Trichoderma* isolat Srilanka (T310) yang diperbanyak dalam medium campuran pupuk kandang dan dedak padi dengan perbandingan (1:1) dapat meningkatkan kepadatan konidianya sampai 20 minggu setelah diintroduksi ke dalam tanah dan efektif menekan penyakit akar putih yang disebabkan oleh *Rigidiporus lignosus* pada tanaman karet. Lebih lanjut Soesanto *et al.* (2004) melaporkan pemberian perlakuan agensia hayati *T. harzianum* mampu memperlambat masa inkubasi jamur patogen.

Handayanto (1998) melaporkan bahwa semakin banyak mikroorganisme atau mikroba yang ada pada pupuk organik dapat membantu terjadinya proses metabolisme dalam tanah, sehingga tanah yang diberikan pupuk organik tersebut lebih mampu menyediakan unsur hara yang diperlukan oleh tanaman. Ketersediaan nutrisi sebagai kebutuhan hidup bagi jamur antagonis sangat tergantung pada pelepasan enzim-enzim dari degradasinya (Deacon, 1997). Selanjutnya Matrouid *et al.* (2009), menyatakan *Trichoderma* sp. merupakan antagonis yang baik digunakan sebagai agensia pengendali hayati jamur patogen. Populasi *Trichoderma* spp. dalam bentuk grafik (Gambar 5.18).



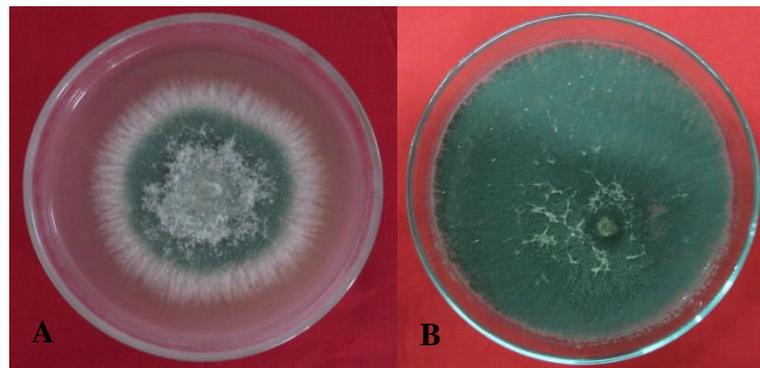
Gambar 5.18

Grafik populasi koloni *Trichoderma* spp. di rizosfer bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca setiap 60 hari setelah infeksi patogen (HSIP)
 (BK2 = Ungasan, Kuta Selatan, Badung; LC2 = Sampora, Cibinong, Cibinong;
 MB1 = Munduk, Banjar, Buleleng; JB1 = Umejero, Busungbiu, Buleleng;
 BD1 = Pelaga, Petang, Badung; kontrol = patogen Unggahan, Seririt, Buleleng)

5.5.4 Identifikasi jamur antagonis isolat JB1

5.5.4.1 Identifikasi berdasarkan morfologi

Identifikasi *Trichoderma* sp. isolat JB1 secara makroskopis pada media PDA terlihat koloninya berbentuk bulat dengan tepi halus dan permukaan koloni rata. Miselium awalnya berwarna putih halus, kemudian warna miselium berubah menjadi hijau dengan bagian pinggir berwarna putih (Gambar 5.19A). Miselium *Trichoderma* sp. isolat JB1 strukturnya padat dengan permukaan datar, bagian tepi koloni rata dan warnanya berubah menjadi kehijau-hijauan, akhirnya warna miselium berubah menjadi hijau tua dengan bertambahnya umur. Miselium *Trichoderma* sp. isolat JB1 tumbuh dengan struktur padat di media PDA dan koloni menutupi seluruh permukaan cawan Petri berdiameter 9 cm, setelah diinkubasi selama 6 hari pada suhu 28°C, disajikan pada Gambar 5.19B.



Gambar 5.19

Koloni *Trichoderma* sp. isolat JB1

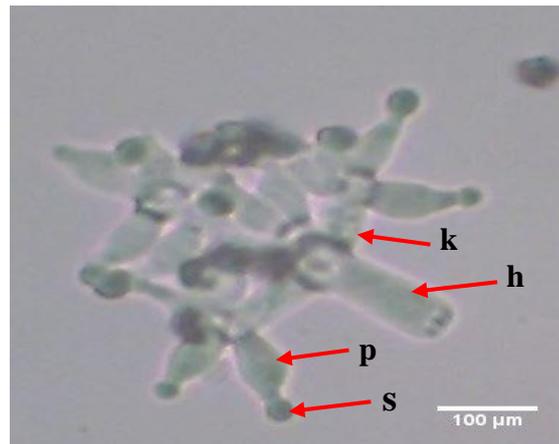
A= koloni *Trichoderma* sp. isolat JB1 pada media PDA masa inkubasi 4 hari

B= koloni *Trichoderma* sp. isolat JB1 pada media PDA masa inkubasi 6 hari

Stamets (2000) melaporkan sebagian besar jamur saprofit pada mulanya memiliki miselium berwarna putih, kemudian warna dapat berubah ketika miselium tersebut dewasa. Subash *et al.* (2013), melaporkan pada media pertumbuhan PDA, tampak miselia *Trichoderma* sp. tumbuh tidak teratur, pada awalnya koloni kelihatan berwarna putih, selanjutnya berubah menjadi warna kehijauan, kadang-kadang pada bagian tengah koloni miselianya ada yang masih berwarna putih, walaupun pada akhirnya semua menjadi hijau, jika diinkubasi lebih lama. Soesanto *et al.* (2011) menyatakan beberapa isolat *Trichoderma* sp yang sama ditumbuhkan pada media berbeda (PDA dan MEA) memberikan karakterisasi morfologi koloni yang berbeda.

Identifikasi secara mikroskopis *Trichoderma* sp. isolat JB1 hasil pengamatan menggunakan mikroskop pada pembesaran 400x yaitu: miselium berwarna hijau, fialid (*phialid*) tersusun pada kelompok-kelompok yang berbeda dengan susunan jarang, jumlah *phialid* tidak lebih dari 3 yang bentuknya pendek menyerupai botol dengan ujung meruncing dibandingkan bagian tengahnya, tangkai *phialid* (*sterigma*) pendek, tiap kelompok konidia (*spora*) berbentuk bulat

berwarna hijau muda berkumpul di ujung *phialid*. Konidiofor memiliki banyak percabangan membentuk sudut siku-siku pada konidiofor utama, tersusun menyerupai piramid yaitu cabang yang lebih panjang terletak di bawahnya (Suanda, 2016), disajikan pada Gambar 5.20.



Gambar 5.20
Struktur mikroskopis hifa *Trichoderma* sp. isolat JB1
memiliki *phialid* pada konidia jarang, hanya 1-3
(p= *phialid* atau sterigma, s= konidia atau spora, k= konidiofor dan h= hifa)

Semangun (1996) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. Memiliki konidiofor bercabang teratur, tidak membentuk berkas, konidium berbentuk jorong atau bulat dengan diameter 3,5-4,5 μm dan bersel satu dalam kelompok-kelompok kecil terminal serta berwarna hijau tua. Lebih lanjut Pitt dan Hocking (1997) juga menyatakan secara umum konidia (spora) dari *Trichoderma* berwarna hijau.

Identifikasi *Trichoderma* isolat JB1 berdasarkan morfologinya sangat sedikit karakterisasi yang dapat digunakan (Geiser, 2004). Jika identifikasi *Trichoderma* sampai pada tingkat spesies hanya berdasarkan karakterisasi morfologi koloni saja, dapat menimbulkan kesalahan dalam mengidentifikasinya, oleh karenanya analisis *sequencing* gen dengan membuat pohon filogeni sangat

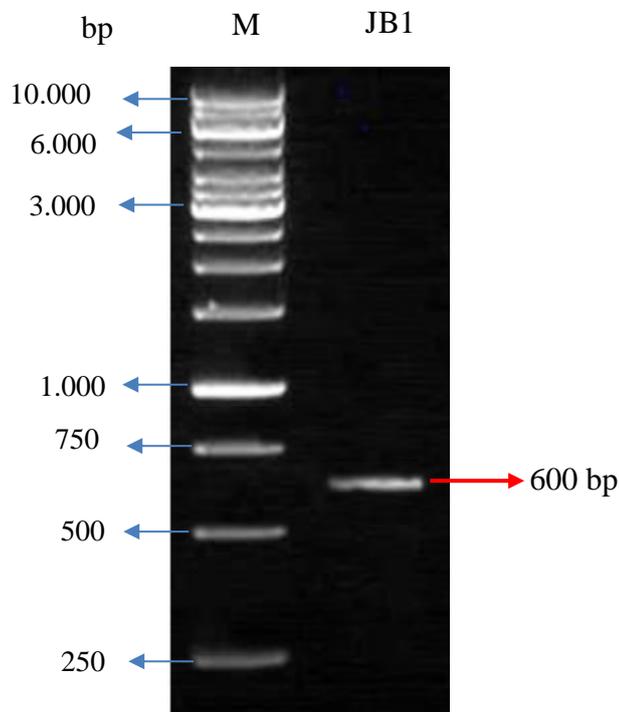
diperlukan, sehingga kedudukan antar spesies *Trichoderma* dapat diketahui secara jelas.

Data hasil penelitian secara *in vitro* dan *in vivo* di rumah kaca yang meliputi: efektivitas daya hambat antagonis terhadap luas koloni jamur patogen *S. commune* isolat SK, efektivitas antagonis *Trichoderma* spp. terhadap pertumbuhan bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen isolat SK, pengaruh antagonis terhadap intensitas serangan penyakit dan populasi koloni antagonis *Trichoderma* spp. menunjukkan bahwa *Trichoderma* sp. isolat JB1 memberikan hasil yang paling baik dibandingkan jamur kandidat antagonis *Trichoderma* sp. (isolat BK2, BD1, MB1 dan LC2). Oleh karena itu jamur antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 perlu diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui kemiripan dengan spesies *Trichoderma* yang telah tersedia di *GenBank*.

5.5.4.2 Identifikasi molekuler *Trichoderma* sp. isolat JB1

Identifikasi jamur *Trichoderma* sp. isolat JB1 secara molekuler dilakukan di daerah *internal transcribed spacer* (ITS) menggunakan 2 primer yaitu primer ITS 5 dan primer ITS 4 rDNA yang bertujuan untuk mengidentifikasi jamur antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1. Menurut Druzhirina *et al.* (2005) salah satu analisis molekuler yang dikembangkan menggunakan sekuen ribosomal DNA (rDNA) pada daerah *internal transcribed spacer* (ITS). Amplifikasi PCR dari DNA *Trichoderma* sp. isolat JB1 menggunakan primer ITS 5 (F : 5`--GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-- 3`) dan ITS 4 (R : 5`--TCCTCCGCTTATTGATATGC--3`) (White *et al.*, 1990) dan menghasilkan

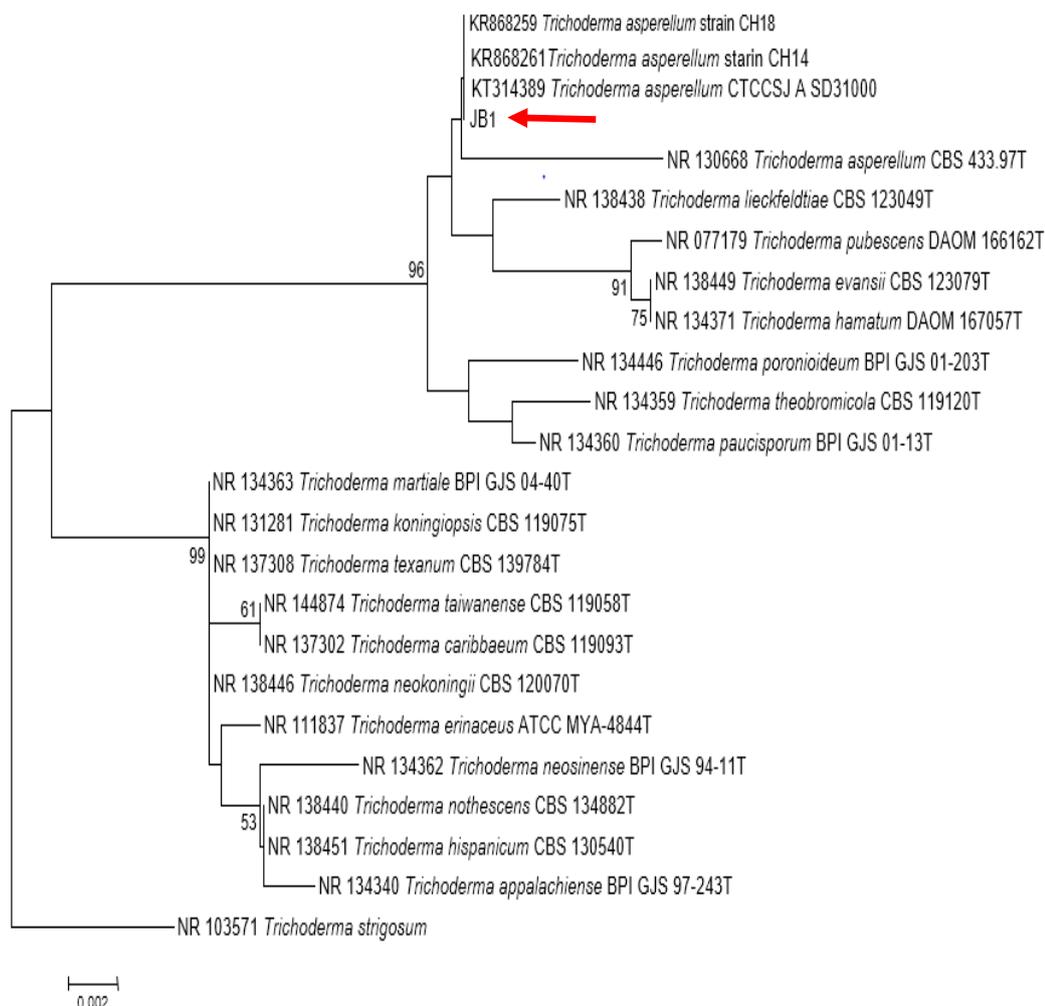
fragmen DNA dengan ukuran 600 bp. Amplifikasi PCR antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 menggunakan primer ITS 5 dan ITS 4 (Gambar 5.21).



Gambar 5.21.

Amplifikasi PCR *Trichoderma* sp. isolat JB1 menggunakan Primer ITS 5 dan ITS 4. Lajur M = marker, Kb DNA ladder (*fermentas*). Lajur JB merupakan pita antagonis isolat JB1 (tanda panah merah)

Fragmen DNA yang dihasilkan selanjutnya disekuensing untuk mengidentifikasi spesies jamur berdasarkan kemiripan dengan spesies jamur lainnya yang telah teridentifikasi. Hasil analisis menggunakan metode *Maximum Parsimony* dengan 1.000 kali ulangan *bootstrap* menunjukkan bahwa kekerabatan terdekat patogen isolat SK adalah jamur *Schizophyllum commune*, karena berada satu *klade* (kelompok) dengan sekuen jamur *S. commune* dengan dukungan *similaritas* 99%. Pohon filogeni yang menunjukkan kedekatan patogen isolat SK terhadap spesies lain berdasarkan *bootstrap* 1.000 kali ulangan (Gambar 5.22).



Gambar 5.22.

Pohon filogeni yang dibangun dari sekuen ITS dari *library GenBank* *Trichoderma* sp. isolat JB1 (tanda panah merah) yang telah dikarakterisasi. Nilai *Bootstrap* 1.000 kali ulangan.

Berdasarkan hasil pensejajaran sekuen dengan sekuen homolog *database GenBank*, antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 memiliki kemiripan sebesar 99% dengan *Trichoderma asperellum* strain CTCCSJ A SD31000 (*Accession Number GenBank* KF737411.1), *T. asperellum* strain CH14 (*Accession Number GenBank* KR868261.1) dan *T. asperellum* strain CH18 (*Accession Number GenBank* KR868259.1) dengan persentase masing-masing similaritas 99% (Tabel 5.10).

Perbandingan persentase kemiripan gen *T. asperellum* isolat JB1 dengan beberapa sekuen DNA di *GenBank* menggunakan program BLAST, disajikan pada Tabel 5.10.

Tabel 5.10
Perbandingan persentase kemiripan gen *Trichoderma* sp. isolat JB1 dengan beberapa sekuen DNA di *Genbank* menggunakan program BLAST

No.	Isolat	Similaritas (%)	Accession (kode akses)	Asal Negara
1.	<i>Trichoderma asperellum</i> strain CTCCSJ A SD31000	99	KF737411.1	China
2.	KR868261 <i>Trichoderma asperellum</i> strain CH14	99	KR868261.1	China
3.	KR868259 <i>Trichoderma asperellum</i> strain CH18	99	KR868259.1	China

Villalobos *et al.* (2013) mengisolasi *Trichoderma* sp. dari 3 tempat penghasil mangga yang berbeda di Mexico (Chalapas, Oaxaca dan Michoacan). Hasil penelitiannya dengan menggunakan *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS 1) dan ITS 2 menemukan 21 strain *Trichoderma*, tiga diantaranya merupakan isolat *T. asperellum*. Lopes *et al.* (2012) juga menemukan 21 isolat *Trichoderma* sp. yang diisolasi dari kacang-kacangan di daerah Gerrado Brazilia, setelah diidentifikasi molekuler dengan menggunakan *Internal Transcribed Spacer 1* (ITS 1) dan ITS 2 diperoleh 42,86% merupakan *Trichoderma asperellum* dan sisanya *Trichoderma* dari jenis yang lain. Darmayasa *et al.* (2015) melaporkan hasil penelitiannya bahwa *T. asperellum* yang diisolasi dari rizosfer tanaman jagung (*Zea mays*) memiliki potensi menghambat pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 sebesar 98,849%.

5.6 Karakterisasi Jamur *Trichoderma asperellum*

Trichoderma asperellum merupakan jamur yang dapat ditemukan pada berbagai ekosistem seperti dipermukaan tanah, ekosistem pertanian dan lingkungan lain seperti kayu dari tanaman yang telah melapuk (Samuels *et al.*, 2006). *T. asperellum* banyak diuji dalam penelitian dan dikomersialkan sebagai biopestisida karena memiliki kemampuan sebagai agensia biokontrol yang sangat efektif terhadap patogen tanaman (Nagayama *et al.*, 2007). Selanjutnya Aziz *et al.* (2013), melaporkan hasil penelitiannya bahwa isolat *T. asperellum* tampak relatif persisten dalam jaringan bibit kakao selama kurang lebih dua bulan dan setelah enam bulan aplikasi, sejumlah buah kakao terdeteksi mengandung *T. asperellum*. Hal ini merupakan bukti bahwa *T. asperellum* dapat bertahan lama pada pertanaman kakao (Hakkar *et al.*, 2014).

T. asperellum merupakan jamur bersifat simbiosis mutualisme dengan tanaman inangnya karena mampu menekan intensitas serangan penyakit *vascular streak dieback* disebabkan oleh jamur *Oncobasidium theobromae*, sedangkan tanaman inang menyediakan sumber makanan untuk *T. asperellum*, sehingga mampu merangsang pertumbuhan tanaman dan akibatnya terjadi peningkatan berat kering tanaman (Kowalska *et al.*, 2014). Aziz *et al.* (2013) melaporkan bahwa *T. asperellum* dapat mengendalikan penyakit Hawar Daun *Phytophthora* pada bibit Kakao. Klasifikasi *T. asperellum* menurut Alexopoulos *et al.* (1996), yaitu:

Kingdom	Mycetae (Fungi)
	:
Divisio	Amastigomycota
	:
Sub Divisio	: Deuteromycota

Klas : Deuteromycetes
Ordo : Moniliales
Famili : Moniliaceae
Genus : *Trichoderma*
Spesies : *Trichoderma asperellum*

5.7 Mekanisme Antagonis *T. asperellum* Isolat JB1 terhadap Jamur Patogen *S. commune* Isolat SK

Trichoderma spp. merupakan jamur yang hidup secara alami di dalam tanah dan bersifat parasit serta menyerang beberapa jenis jamur patogen penyebab penyakit pada tanaman serta memiliki spektrum pengendalian sangat luas. Mekanisme antagonis *Trichoderma* sp. terhadap patogen tanaman antara lain melalui kompetisi ruang dan nutrisi, proses mikoparasitisme serta melalui proses antibiosis terhadap jamur patogen. Lebih lanjut Bae *et al.* (2011) menyatakan mekanisme *Trichoderma* sp. menghambat patogen *Phytophthora* sp. ialah melalui mikoparasit atau antibiosis. Pada saat hifa antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 melilit hifa jamur patogen, diduga hifa antagonis *Trichoderma* sp. isolat JB1 aktif menghasilkan enzim ekstraseluler untuk mempenetrasi hifa jamur patogen. Rawat dan Tewari (2010) melaporkan hasil pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa *Trichoderma* sp. berperan sebagai mikoparasit dengan cara membelit hifa patogen *Sclerotium rolfsii*, sehingga menyebabkan terjadinya degradasi dinding sel hifa dan lisis miselium patogen.

Mekanisme kerja antagonis *T. asperellum* diduga memproduksi senyawa antibiotik untuk mendegradasi hifa jamur patogen *S. commune* isolat SK. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Lorito *et al.* (1993) dan Brunner *et al.*, (2005)

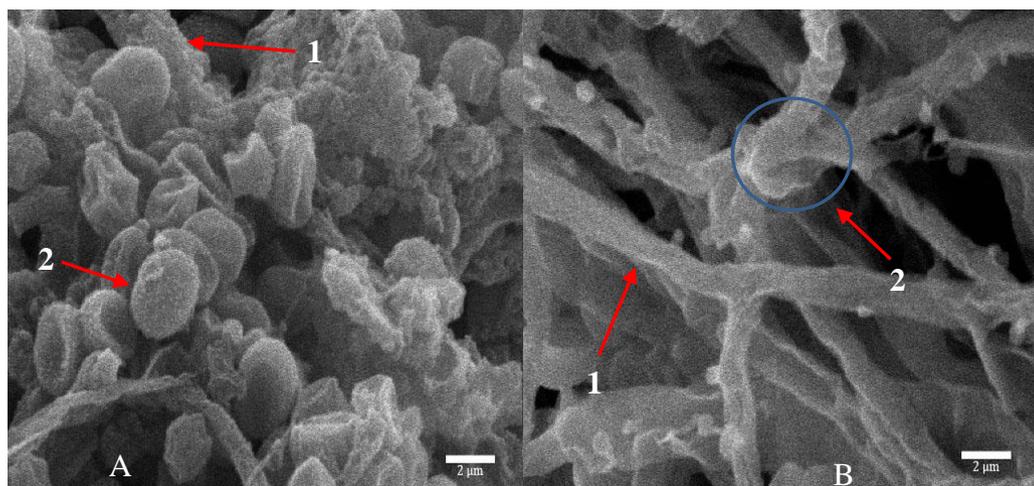
bahwa mekanisme antagonis *Trichoderma* sp. terhadap patogen tanaman antara lain, melibatkan produksi berbagai enzim (biokatalis) hidrolitik dan sekresi senyawa antijamur. Lewis *et al.* (1998) melaporkan bahwa pertumbuhan hifa *Trichoderma* sp. sejajar dengan pertumbuhan hifa jamur inang (patogen), maka hifa *Trichoderma* sp. akan menempel pada hifa inang dengan melilit hifa inangnya berupa lilitan spiral yang agak jarang dan membentuk alat pengait (*hook-like structure*), sambil menetrasi miselium inang dengan mendegradasi sebagian dinding sel inang.

Mikroba biokontrol mempunyai mekanisme menekan pertumbuhan patogen pada tanaman dengan menggunakan antagonisnya (Pal *et al.*, 2006). Lebih lanjut Nugroho (2003) melaporkan bahwa spesies *Trichoderma* dapat menghasilkan berbagai metabolit sekunder seperti kitinase yang berperan sebagai antijamur patogen. Bendahmane *et al.* (2012) menyatakan *Trichoderma* sp. yang telah masuk ke dalam sel patogen akan menggunakan bahan yang ada di dalam sitoplasma patogen untuk kebutuhan nutrisinya, sehingga jamur *Trichoderma* sp. mengalami pertumbuhan koloni yang cepat.

Jamur antagonis *T. asperellum* isolat JB1 dan jamur patogen *S. commune* isolat SK yang diisolasi pada media PDA dalam cawan Petri yang diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar (28°C), kemudian diamati melalui mikroskop elektron menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) (SEI 10 KV WD12 mm SS30). Hasil pengamatann dengan SEM terlihat hifa antagonis *T. asperellum* isolat JB1 dengan struktur yang kuat dan jumlah spora yang berlimpah, seperti pada Gambar 5.23A. Pengamatann dengan menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) dari hifa jamur patogen *S. commune* isolat SK dalam keadaan

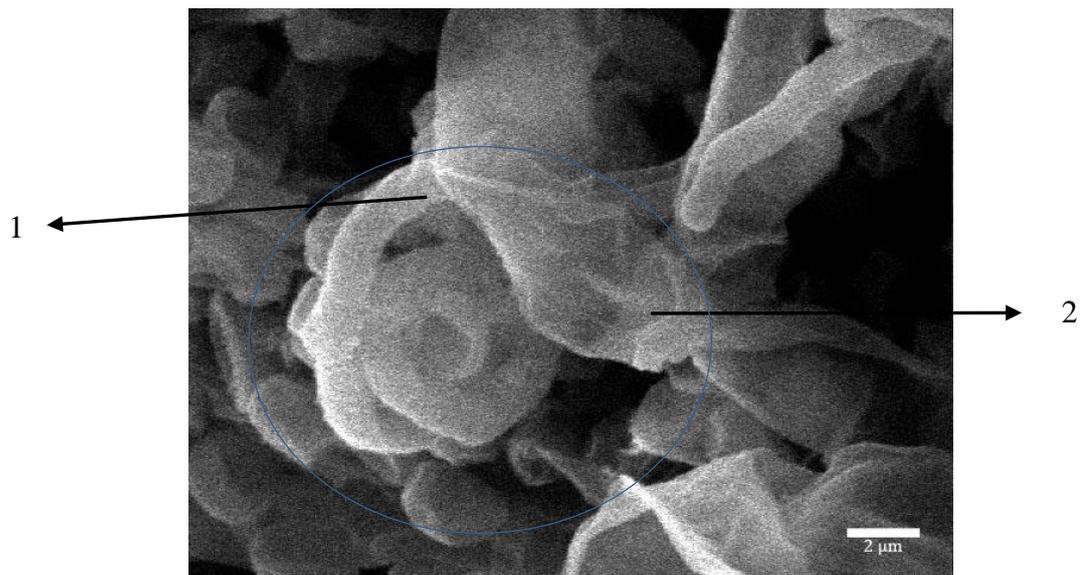
normal, tidak menunjukkan kerusakan atau masih utuh, seperti disajikan pada Gambar 5.23B.

Antagonis *T. asperellum* isolat JB1 ditumbuhkan secara *dual culture* dengan jamur patogen *S. commune* isolat SK di media PDA diinkubasi pada umur 7 hari pada suhu 28°C secara *in vitro*. Pertumbuhan koloni jamur antagonis *T. asperellum* isolat JB1 dan jamur patogen *S. commune* isolat SK, di zone pertemuan koloni dari kedua jamur itu diamati melalui mikroskop elektron menggunakan SEM (SEI 10 KV WD12 mm SS30). Berdasarkan hasil pengamatan menggunakan SEM, terlihat mekanisme antibiosis oleh antagonis *T. asperellum* isolat JB1 terhadap jamur patogen *S. commune* isolat SK menunjukkan bahwa morfologi hifa jamur patogen *S. commune* mengalami degradasi. Hifa jamur patogen *S. commune* isolat SK pada hifanya mengalami kerusakan, struktur hifa kelihatan rusak (robek) dan strukturnya tidak utuh, seperti disajikan pada Gambar 5.24.



Gambar 5.23

Hifa *T. asperellum* isolat JB1 dan *S. commune* isolat SK diamati melalui SEM
 A = hifa antagonis *T. asperellum* isolat JB1 (1= hifa; 2= spora) (tanda panah)
 B = (1) hifa patogen *S. commune* belum rusak, (2) permukaan hifa patogen
 masih belum rusak atau masih utuh (tanda panah)



Gambar 4.16

Antagonis *T. asperellum* isolat JB1 merusak hifa patogen *S. commune* isolat SK diamati melalui SEM

- 1= hifa patogen sebagian masih utuh (tanda panah)
 2= hifa patogen *S. commune* isolat SK mengalami degradasi dan struktur hifa patogen rusak serta tidak utuh (tanda panah)

Lone, (2012) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. tumbuh aktif menghasilkan sejumlah besar enzim ekstraselular β -1,3-glukanase dan kitinase, yang dapat melarutkan dinding sel patogen dan dengan cara mendegradasi polisakarida serta kitin yang ada pada dinding selnya. Teresa *et al.* (2002) mengemukakan bahwa β -1,3-glukan adalah komponen dinding sel sebagian besar jamur dan enzim β -1,3-glukanase telah diketahui berperan dalam interaksi antara spesies beberapa *Trichoderma* yang bersifat parasit terhadap patogen. Hal ini juga didukung beberapa penelitian tentang pemanfaatan *T. asperellum* sebagai jamur antagonis pada tanaman kakao dalam menanggulangi serangan penyakit *vascular streak dieback*. *T. asperellum* dapat mengendalikan penyakit tanaman, baik yang disebabkan oleh jamur maupun oleh bakteri secara langsung maupun tidak langsung. Sistem pengendalian *T. asperellum* secara tidak langsung yaitu

dengan memacu ketahanan tanaman (resistensi terinduksi) terhadap serangan patogen (Hendarto, 2015).

Howell (2003) meneliti mekanisme molekuler enzim litik yang terlibat dalam aktivitas agensia hayati *T. harzianum* dan menyatakan bahwa degradasi dinding sel jamur terutama disebabkan oleh enzim kitinase, glukanase dan protease. Jika hifa *Trichoderma* spp. melekat pada hifa jamur inang yang bersifat patogen, maka hifa jamur inang mengalami vakoulasi, lisis dan akhirnya hancur. Pendapat ini didukung oleh Patil (2012) yang menyatakan strain tertentu dari *Trichoderma* juga dapat menghasilkan enzim kitinolitik yang dapat merusak hifa inangnya sebelum antibiotik yang dihasilkannya bekerja. Selanjutnya Lorito *et al.* (1996) melaporkan bahwa senyawa peptaibol yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. mampu menghambat sintesis β -glucan, sehingga dapat mencegah rekonstruksi dari dinding sel jamur inangnya.

Enzim hidrolitik yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. yaitu β -1,3-glukanase, kitinase, selulase dan proteinase (Kumar *et al.*, 2012). Sifat mikoparasit yang ditimbulkan oleh enzim kitinase dari *Trichoderma* sp. dapat menyebabkan degradasi dinding sel jamur patogen (Gruber *et al.*, 2011). Lebih lanjut Darmayasa *et al.* (2015) melaporkan hasil penelitiannya bahwa filtrat *T. asperillum* TKD yang diisolasi dari rizosfer tanaman jagung mengandung metabolit sekunder, yaitu : Butane, 1,1-oxybis-(CAS) n-Butyl ether; Butane, 1,1-dibutoxy; Pentansaeure, 2,2,4, 4-Tetramethyl; 1-Tetradecene; Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl-(CAS) 2,4-; 1-Hexadecane (CAS) Cetene; 1-Octadecene (CAS) alpha-Octadecene; Hexadecanoic acid, methyl ester (CAS) Methyl, n-

Tetracosano-1,4-Heptanone (CAS) GBL; 1-Dodecanol (CAS) n-Dodecanol dan Behenic alkohol.

T. asperellum sering diisolasi dari akar tanaman, serasah tanah, rizosfer dari berbagai tanaman, jaringan tanaman yang sehat, biomassa jamur dan kayu dari pohon yang sudah mati. Beberapa enzim yang dihasilkan oleh jamur patogen, misalnya enzim selulase dan pektinase yang merupakan biokatalisator dalam proses degradasi selulosa dan pektin pada dinding sel tumbuhan (León dan Montesano, 2013). Strain *T. asperellum* sebagai agensia biokontrol yang sangat efektif terhadap patogen tanaman dan dikembangkan sebagai pestisida mikroba oleh beberapa perusahaan untuk dikomersialkan (Nagayama *et al.*, 2007).

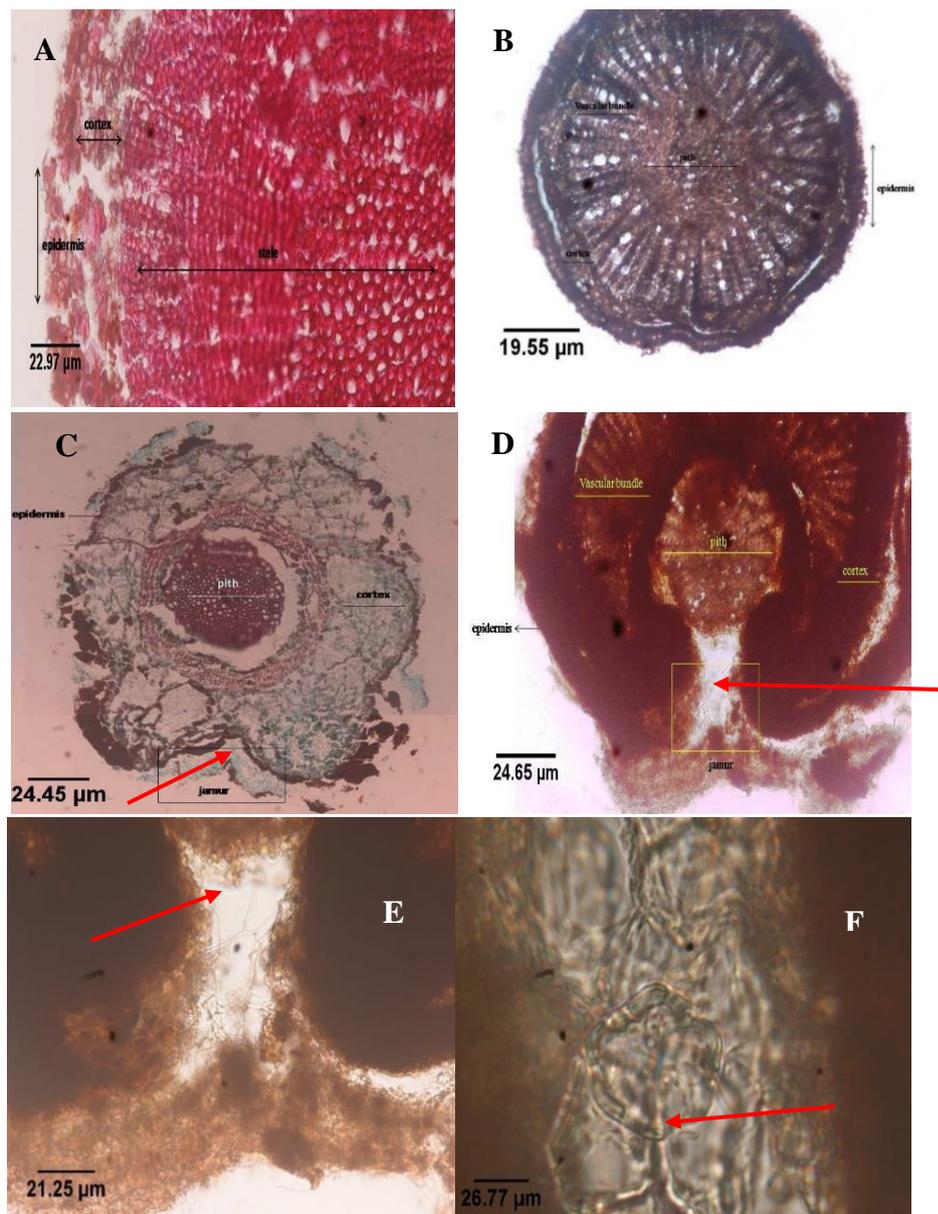
Dari hasil pengamatan histopatologi dengan metode mikroteknik dapat diketahui bahwa pada irisan melintang akar bibit cengkeh menunjukkan ada perbedaan yang tegas antara struktur jaringan akar bibit cengkeh yang sehat (tidak terinfeksi) jamur patogen *S. commune*, disajikan pada Gambar 5.25A dan Gambar 5.25B. Jaringan akar bibit cengkeh yang terinfeksi patogen *S. commune* isolat SK tanpa perlakuan *T. asperellum* isolat JB1 terlihat jaringan epidermis akar cengkeh ditumbuhi *rizomorf* jamur patogen yang berwarna putih dan jaringan kortek pada akar bibit cengkeh kelihatan berwarna coklat kehitaman, disajikan pada Gambar 5.25C dan Gambar 5.25D. Miselium jamur patogen *S. commune* isolat SK masuk melalui jaringan epidermis akar dan merusak jaringan akar bibit cengkeh, disajikan pada Gambar 5.26E dan Gambar 5.25F.

Mekanisme serangan patogen *S. commune*, diawali ketika spora jamur dari sumber infeksi menempel pada kayu atau akar tanaman, maka jamur berkecambah membentuk hifa yang kemudian bercabang-cabang membentuk

miselium yang melekat pada permukaan kayu atau akar tanaman. Hifa jamur patogen masuk melalui jaringan epidermis, kemudian menuju jaringan parenkim yang merupakan jalan paling mudah bagi hifa untuk mendegradasi kayu, karena jaringan parenkim berdinding tipis dan terdapat zat-zat yang mengandung nutrisi untuk kebutuhan hidup jamur patogen (Gambar 5.25).

Rowell (2005), juga melaporkan bahwa jaringan parenkim merupakan jalan yang mudah dilewati oleh hifa jamur patogen, karena secara alamiah jaringan parenkim juga berfungsi sebagai sintesis, penyimpanan makanan dan transport lateral bahan biokimia dan air. Bowyer *et al.* (2003) menyatakan bahwa gula dan pati terdapat dalam jaringan parenkim kayu. Kerusakan jaringan epidermis, endodermis, parenkim, *floem* dan *xylem* dapat menyebabkan sistem transfortasi air dan unsur hara pada bibit cengkeh menjadi terganggu. Terhambatnya sistem transfortasi air dan unsur hara tersebut menyebabkan terganggu sistem metabolisme, sehingga daun layu kemudian gugur sehingga tinggal ranting yang mongering dan akhirnya bibit cengkeh mati.

Hifa jamur patogen menembus masuk ke dalam sel tumbuhan yang bertujuan untuk menyerap nutrisi yang terkandung di dalam sel tersebut. Nutrisi tersebut akan digunakan oleh jamur patogen dalam proses metabolisme dalam hidupnya yang bertujuan untuk membentuk struktur tubuh serta membentuk alat reproduksi. Aktivitas dalam proses metabolisme yang dilakukan oleh jamur patogen tersebut dapat mengakibatkan kerusakan sel dan jaringan tanaman yang terinfeksi jamur patogen (Gao *et al.*, 2010)



Gambar 5.25

- Penampang melintang akar bibit cengkeh dan mekanisme serangan patogen
- A dan B = Penampang melintang akar bibit cengkeh diaplikasikan *T. asperellum* isolat JB1 dalam percobaan di rumah kaca, keadaannya sehat (epidermis dan kortek akar tidak terinfeksi jamur patogen, sehingga epidermis tidak rusak).
- C= jamur patogen menempel pada epidermis akar tetapi belum terjadi kerusakan jaringan epidermis (tanda panah)
- D= miselium jamur patogen menembus jaringan epidermis dan kortek akar, hifa patogen akan menuju jaringan empulur (*pith*) (tanda panah)
- E= miselium jamur patogen merusak epidermis dan kortek akar serta menempel di jaringan empulur (*pith*) (tanda panah)
- F= miselium jamur patogen berada di dalam jaringan kortek yang mendegradasi jaringan empulur (*pith*) akar bibit cengkeh (tanda panah)

Hifa jamur patogen menembus masuk ke dalam sel tumbuhan bertujuan untuk menyerap nutrisi yang terkandung di dalam sel. Nutrisi tersebut akan digunakan oleh jamur patogen dalam proses metabolisme yang bertujuan untuk membentuk struktur tubuhnya serta membentuk alat reproduksi. Aktivitas dalam proses metabolisme yang dilakukan oleh jamur patogen tersebut dapat mengakibatkan kerusakan jaringan tanaman yang terinfeksi jamur patogen (Gao *et al.*, 2010)

5.8 Pembahasan Umum

Jamur patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh yang telah diuji patogenitasnya, kemudian diidentifikasi secara morfologi maupun molekuler dan didapat bahwa patogen penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh (*Syzygium aromaticum* L.) di Kabupaten Buleleng memiliki kedekatan pada jamur *Schizophyllum commune* dengan dukungan *similaritas* 99%. *S. commune* adalah jamur yang tumbuh di berbagai pohon dan bersifat parasit, penyebab penyakit pada pohon meranti merah (*Shorea smithiana*) (Erwin *et al.*, 2008). *S. commune* juga dikenal sebagai penyebab *root rot* (busuk akar) pada beberapa jenis tanaman seperti: meranti (*Shorea smithiana*) di Kalimantan (Indonesia), pohon linden (*Tilia* sp.) atau pohon saru di Indonesia, Buna (*Fagus crenata*) (*Japan beech*) dan ceri asam (*Prunus cerosus*) (Takemoto *et al.*, 2010). *S. commune* merupakan jamur yang paling agresif menginfeksi pohon jenis berangan kuda (*Aesculus hippocastanum*) yang di tanam di pinggir jalan di Kota Lithuania. *S. commune* juga bersifat parasit pada pohon mangga (*Mangifera indica* L.) di Changa Manga Forest Pakistan (Nasreen *et al.*, 2015). Monahan

(1998), menyatakan bahwa jamur *S. commune* juga menyebabkan pembusukan (*decay*) dan pelapukan (*deterioration*) pada bambu (*Bambusa vulgaris* Schrad).

Pengujian 5 isolat kandidat jamur antagonis terhadap jamur *S. commune* sebagai patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh secara *in vitro* dan *in vivo*, sehingga mendapatkan antagonis terbaik (>80%) yaitu isolat JB1. Berdasarkan identifikasi secara morfologi bahwa isolat JB1 adalah jamur *Trichoderma* sp. kemudian dilanjutkan identifikasi molekuler, didapat *Trichoderma* sp. isolat JB1 memiliki kedekatan pada *Trichoderma asperellum* dengan dukungan *similaritas* 99%. Benitez *et al.* (2004), menyatakan bahwa jamur *Trichoderma* sp. telah banyak digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman dan 90% aplikasi yang telah dilakukan berasal dari berbagai macam strain *Trichoderma*. Penggunaan *T. asperellum* isolat JB1 sebagai agensia hayati yang dapat mengendalikan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Bali belum pernah dilaporkan.

Pengujian *T. asperellum* isolat JB1 terhadap jamur patogen *S. commune* secara *in vitro* menunjukkan bahwa *T. asperellum* isolat JB1 efektif menghambat pertumbuhan koloni patogen *S. commune* dengan daya hambat sebesar 90,11%. Semakin besar daya hambat yang ditimbulkan, maka semakin tinggi daya antagonis isolat tersebut. Hal ini sesuai dengan penelitian Herliyana *et al.* (2013) yaitu adanya penghambatan terhadap pertumbuhan diameter koloni patogen *Ganoderma* sp. diduga karena adanya enzim dan senyawa metabolit yang dihasilkan oleh jamur antagonis *Trichoderma* sp. yang mampu merusak dinding sel patogen, sehingga menyebabkan pertumbuhan diameter koloni patogen menjadi lambat. *Trichoderma* sp. tumbuh aktif menghasilkan sejumlah besar

enzim ekstraselular β -1,3-glukanase dan kitinase yang dapat melarutkan dinding sel patogen dengan cara mendegradasi polisakarida dan kitin yang ada pada dinding selnya (Lone, 2012). Beberapa *Trichoderma* sp. juga diketahui mampu bersifat sebagai mikoparasitik.

Pengujian aktivitas *T. asperellum* isolat JB1 terhadap pertumbuhan bibit cengkeh di rumah kaca dilakukan dengan pengujian *T. asperellum* isolat JB1 terhadap tinggi bibit cengkeh, jumlah daun, berat basah akar dan berat kering akar bibit cengkeh mendapatkan hasil yang sangat positif dan menunjukkan berbeda sangat nyata terhadap kontrol. Soesanto (2008) menyatakan bahwa agensia antagonis mampu hidup berkompetisi dengan patogen tanaman sehingga mempunyai kemampuan tumbuh yang lebih cepat dan dapat terjadi persaingan dalam ruang dan nutrisi. Seiring bertambahnya umur tanaman keberadaan jamur antagonis mampu menunjukkan berbagai mekanisme penghambatan patogen dan memberikan kemudahan tanaman dalam menyerap unsur hara. Hasil penelitian Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (2002) melaporkan bahwa *Trichoderma* sp. ternyata juga memberikan pengaruh positif pada pertumbuhan vegetatif dan perkembangan generatif tanaman serta hasil panen.

Intensitas serangan penyakit menjadi rendah pada perlakuan diaplikasikan *Trichoderma* spp. karena jamur antagonis ini dapat tumbuh cepat dengan berkompetisi, menghasilkan senyawa antibiotik dan dapat memparasit dengan melilit hifa jamur patogen (Umrah *et al.*, 2009). Senyawa antibiotik sebagai antijamur patogen, seperti senyawa *lytic*, viridin dan trichomidin yang dihasilkan oleh *Trichoderma* sp. dapat menghambat dan bahkan mematikan jamur patogen (Kucuk dan Kivanc, 2003). Nagayama *et al.*, (2007) juga

menyatakan bahwa *T. asperellum* banyak diuji dalam penelitian dan dikomersialkan sebagai biopestisida, karena memiliki kemampuan sebagai agensia biokontrol yang sangat efektif terhadap patogen tanaman. Lebih lanjut Aziz *et al.* (2013) melaporkan hasil penelitiannya bahwa isolat *T. asperellum* tampak relatif persisten dalam jaringan bibit kakao selama kurang lebih dua bulan dan setelah enam bulan aplikasi sejumlah buah kakao terdeteksi mengandung *T. asperellum*. Hal ini merupakan bukti bahwa *T. asperellum* dapat bertahan lama pada tanaman kakao (Hakkar *et al.*, 2014).

Mekanisme antagonis *T. asperellum* isolat JB1 terhadap jamur patogen *S. commune* adalah secara antibiosis. Mekanisme antibiosis *T. asperellum* isolat JB1 dalam menekan pertumbuhan jamur patogen *S. commune* isolat SK di media PDA diduga menghasilkan enzim yang bersifat antibiotik, sehingga koloni jamur patogen tumbuh menuju ketepi cawan Petri. Jamur patogen diduga juga memberikan respon berupa senyawa aktif sebagai bentuk pertahanan terhadap reaksi yang diberikan antagonis *T. asperellum* isolat JB1, sehingga koloni patogen menunjukkan warna gelap sampai kehitaman. Enzim yang dihasilkan oleh jamur antagonis misalnya enzim selulase dan pektinase yang merupakan biokatalisator dalam proses degradasi selulosa dan pektin pada dinding sel tumbuhan (León dan Montesano, 2013). Chet (1993) juga melaporkan bahwa *T. asperellum* mampu menghasilkan enzim yang dapat menyebabkan lisis pada hifa inangnya dan memiliki sifat mikoparasit yang dapat menghambat perkembangan patogen.

Teresa *et al.* (2002) mengemukakan bahwa β -1,3-Glukan adalah komponen dinding sel sebagian besar jamur dan β -1,3-glukanase telah diketahui

berperan dalam interaksi antara spesies beberapa *Trichoderma* yang bersifat parasit terhadap patogen. Bendahmane *et al.* (2012) menyatakan *Trichoderma* sp. yang telah masuk ke dalam sel patogen akan menggunakan bahan yang ada di dalam sitoplasma patogen. Hal ini juga didukung beberapa penelitian tentang pemanfaatan *T. asperellum* sebagai jamur antagonis pada tanaman kakao dalam menanggulangi serangan *vascular streak dieback*. *T. asperellum* dapat mengendalikan penyakit tanaman baik yang disebabkan oleh jamur maupun oleh bakteri secara langsung maupun tidak langsung. Sistem pengendalian *T. asperellum* secara tidak langsung yaitu dengan memacu ketahanan tanaman (resistensi terinduksi) terhadap serangan patogen (Hendarto, 2015).

5.9 Kebaharuan Penelitian

1. Ditemukannya jamur patogen *Schizophyllum communi* penyebab penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng.
2. Ditemukannya jamur antagonis *Trichoderma asperellum* sebagai agensia hayati untuk mengendalikan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng.

BAB VI

SIMPULAN DAN SARAN

6.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat disimpulkan hal-hal sebagai berikut:

1. Spesies dari patogen yang menyebabkan penyakit akar putih pada tanaman cengkeh di Kabupaten Buleleng adalah jamur *Schizophyllum commune*.
2. Isolat mikroba antagonis yang diisolasi dari rizosfer tanaman cengkeh dan tanaman duwet tanpa gejala penyakit akar putih dapat menghambat pertumbuhan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh dengan daya hambat > 80%. Isolat JB1 mampu menghambat pertumbuhan koloni patogen sampai 90,11% secara *in vitro* dan mampu menekan tingkat serangan patogen sebesar 98,33% pada bibit cengkeh dalam *polybag* di rumah kaca.
3. Berdasarkan identifikasi morfologi dari isolat JB1 adalah *Trichoderma* sp. dan identifikasi secara molekuler dari jamur antagonis *Trichoderma* sp. (isolat JB1) adalah *Trichoderma asperellum*.
4. Mekanisme antagonistik *T. asperellum* isolat JB1 dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Schizophyllum commune* adalah antibiosis dengan mendegradasi membran sel patogen. Senyawa pendegradasi tersebut mempengaruhi organel sel patogen sehingga tidak terorganisasi secara teratur.

6.2. Saran

1. Perlu dilakukan identifikasi terhadap senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh jamur *T. asperellum* isolat JB1.
2. Perlu dilakukan pengujian di lapangan pada beberapa lokasi untuk mengetahui efektivitas dan konsistensi jamur *T. asperellum* isolat JB1 dalam menekan patogen penyakit akar putih pada tanaman cengkeh.
3. Perlu dilakukan pengembangan formula jamur *T. asperellum* agar dapat bertahan dan efektif dalam waktu lebih dari 6 bulan.

DAFTAR PUSTAKA

- Abadie, C., Pignolet, L., Elhadrami, A., Habas, R., Zapater, M.F., Carlier, C. 2008. Artificial Inoculation on Plants and Banana Leaf Pieces with *Mycosphaerella* Responsible for Sigatoka Leaf Spot Diseases. 63:319-323.
- Adejoye, O.D., Toyo, B.C.A., Ogunjobi, A.A. and Afolabi, O.O. 2007. Physicochemical studies on *Schizophyllum commune* (Fries) a Nigerian edible fungus. *World Applied Science Journal*; 2 (1): 73-76.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Departement of Plant Pathology University of Florida. Elsevier Academic Press, New York, 5th ed. 398-399.
- Ait-Lahsen, H., Soler, A., Rey, M., De La Cruz, J., Monte, E. and Llobell, A. 2001. An antifungal *exo- β -1,3-glucanase (AGN13.1)* from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol*; 67:5833-5839.
- Amaria, W. dan Wardiana, E. 2014. Pengaruh Waktu Aplikasi dan Jenis *Trichoderma* terhadap Penyakit Jamur Akar Putih pada Bibit Tanaman Karet. Balai Penelitian Tanaman Industri dan Penyegar. Sukabumi. *Jurnal TIDP*; 1 (2): 79-86.
- Amin, F., Razdan, V.K., Mohiddin, F.A., Bhat, K.A. and Banday, S. 2010. Potential of *Trichoderma* species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. *Journal of Phytology*; 2 (10): 38-41.
- Anggraeni, I. 2004. Identifikasi dan Patogenitas Penyakit Akar pada *Acacia mangium* Willd. *Buletin Penelitian Hutan*; 645:61-73.
- Akirotimi, O.A., Edun, O.M. and Mebe, E.D. 2013. Effects of Clove Seed as Anaesthetic Agents in Two Species of Grey Mulletts *Liza fulcipinnis* and *Liza grandisquamis*. Departement of Animal and Environmental Biology. Faculty of Science. University of Port Harcourt. Port Harcourt. Nigeria. *Journal of Aquatic Science*; 1 (1): 7-10.
- Alfizar, Marlina dan Fitri, S. 2013. Kemampuan antagonis *Trichoderma* sp. terhadap beberapa jamur patogen secara *in vitro*. *Jurnal Floratek*; 8:45-51.
- Alabouvette, C., Chantal, O., Christian, S. 2006. Biological control of plant diseases: the European situation. *European Journal of Plant Pathology*; 114:329-341.
- Alexopoulos, J., Mims, C.W. and Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*. (4 ed.). New York: th John Wiley and Sons Press, United States of America.

- Alfiani, C. 1990. Telaah *Trichoderma* sebagai agen pengendali hayati. Jakarta: Deputi PDIT BPP Teknologi.
- Arisena, G.M.K. 2009. Struktur dan Perilaku Pasar Komoditas Cengkeh di Kecamatan Busungbiu Kabupaten Buleleng. *GaneC Swara*; 3 (2): 39-46.
- Arif, A., Muin, M., Kuswinanti, T. dan Harfiani, V. 2008. Isolasi dan Identifikasi Jamur Kayu dari Hutan Pendidikan dan Latihan Tabo-Tabo Kecamatan Bungoro Kabupaten Tangkep Sulawesi Selatan. *Jurnal Perennial*; 3 (2): 49-54.
- Arya, N dan Temaja, G.R.M. 1996. Penelitian Pengendalian Biologi Penyakit Jamur Akar Putih pada Jambu Mente. Bogor: *Proseding Pengendalian Penyakit Utama Tanaman Industri secara Terpadu*. 13-14 Maret.
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S. 2013. Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. *Journal BMC Genomics*; 14:121.
- Aziz, A.I., Rosmana, A. dan Sartika, V.D. 2013. Pengendalian Penyakit Hawar Daun *Phytophthora* pada Bibit Kakao dengan *Trichoderma asperellum*. Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin, Makasar. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*; 9 (1): 15-20.
- Bae, H., Roberts, D.P., Lim, H.S., Strem, M.D., Park, S.C., Ryu, C.M., Melnick, R.L. and Bailey, B.A. 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. *Journal Mol Plant Microb*; 24:336-351.
- Bagwan, N.B. 2011. Evaluation of Biocontrol Potential of *Trichoderma* sp Against *Sclerotium rolfsii*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*. *International Journal of Plant Protection*; 4 (1): 107-111.
- Balai Pengkajian dan Pengembangan Teknologi (BPPT). 2002. "Biopestisida *Trichoderma* sp. Teknologi". Suara Merdeka. edisi 25 Maret.
- Bailey B.A, Bae, H, Strem, M.D, Crozier, J., Thomas, S.E, Samuels, G.J., Vinyard, B.T. and Holmes, K.A. 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. *Journal Biological Control*; 46:24-35.
- Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. and Codon, A.C. 2004. Biocontrol Mechanisms of *Trichoderma* Strain. *Journal Microbiology*; 7:249-260

- Bendahmane, B.S., Mahiout, D. Benzohra, I.E. and Benkada, M.Y. 2012. Antagonism of three *Trichoderma* species against *Botrytis fabae* and *B. cinerea*, the causal agents of chocolate spot of faba bean (*Vicia faba*L.) in Algeria. *Journal World Appl. Sci*; 17 (3): 278-283.
- Benny, Lubis, L., Oemry, S. dan Fairuzah, Z. 2013. Uji Dosis dan Cara Aplikasi Biofungisida *Bacillus* sp. terhadap Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) pada Tanaman Karet di Pembibitan. *Jurnal Online Agroekoteknologi*; 1 (2): 2-8.
- Berlian, I., Setyawan, B. dan Hananto, H. 2013. Mekanisme antagonisme *Trichoderma* spp. terhadap beberapa patogen tular tanah. Balai Penelitian Getas. Salatiga. *Jurnal Warta Perkaratan*; 32 (2): 74-82.
- Binod, P., Sandhya, C., Suma, P., Szakacs, G. and Pandey, A. 2007. Fungal biosynthesis of endochitinase and chitobiase in solid state fermentation and their application for the production of *N*-acetyl-D-glucosamin from colloidal chitin. *Journal Bioresource Technology*; 98:2742-2748.
- Bowyer, J.L., Shmulsky, R. and Haygreen, J.G. 2003. Forest Products and Wood Science. An Introduction. Ed ke-4. Iowa: Blackwell Publishing Company.
- Bryla, D.R. and Koide, R.T. 1998. Mycorrhizal response of two tomato genotypes relates to their ability to acquire and utilize phosphorus. *Journal Annals Bot*; 82:857-894.
- Brimer, T.A. and G.J. Boland. 2003. A Review of the non target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Journal Agriculture Ecosystems and Environment*; 100:3-16.
- Butterfield, B. 2006. The Structure of Wood. Form and Function. dalam: Walker J.C.F. editor. Primary Wood Processing. Principles and Practice. Dordrecht: Springer.
- Bruner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C. P. and Mach, R.L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Journal Appl. Environ. Microbiol*; 71:3959-3965.
- Buzina, W., Lang-Loidolt, D., Braun, H., Freudenschuss, K. and Stammberger, H. 2001. Development of molecular methods for identification of *Schizophyllum commune* from clinical samples. *Journal Clin Microbiol*; 39:2391-1396.

- Catharina, T.S. 2012. Strategi Pengelolaan untuk Memperkecil Serangan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus*) pada Perkebunan Jambu Mente. *Jurnal Ganec Swara*; 6 (1): 26-31.
- Castro, Ortiz, R.H.A., Cornejo, C.L., Rodriguez. M. and Bucio, J.L. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Journal Plant signaling & Behavior*; 4 (8): 701-712.
- Calvet, C., Pera, J. and Barea, J.M. 1990. Interactions of *Trichoderma* sp. with *Glomus mosseae* and two wilt pathogenic fungi. *Journal Agriculture, Ecosystems and Environment*; 29 (14): 59-65.
- Chaube, H.S., Mishra, D.S., Varshney, S. and Singh, U.S. 2003. Biocontrol of plant pathogens by fungal antagonists: historical background, present status and future prospects. *Journal Annual Review of Phytopathology*; 2:1-42.
- Chet, I., Benhamou, N. and Haran, S. 2005. Mycoparasitism and lytic enzymes. In Harman, G. E. and C. P. Kubicek (Eds), *Trichoderma and Gliocladium enzymes biological control and commercial applications Volume 2*. Taylor and Francis. London.
- Chet, I. 1993. Biotechnology in plant disease control. Departemen of plant pathology and microbiology. The Hebrew University of Jerusalem. Faculty of Agriculture. Rehovot. Israel. Wiley-Liss Inc.
- Chernin, L.Z., Ismailov, Haran, S. and Chet, I. 1995 Chitinolytic *Enterobacter* agglomerans antagonistic to Fungal Plant Patogens. *Journal Appl Environ Microbiol*; 61:1720-1726.
- Clausen, C.A. and Kartal, S.N. 2003. Accelerated detection of brown-rot decay: Comparison of soil block test, chemical analysis, mechanical properties and immunodetection. *Journal Forest Products*; 53 (12): 90-94.
- Clay, K. 1996. Interactions among fungal endophytes, grasses and herbivores. *Journal Researches on Populations Ecology*; 38 (2): 191-201.
- Cornejo, C.H.A., Rodrigues, L.M., Penagos, C.C. and Bucio, J.L. 2009. *Trichoderma virens*, a Plant Beneficial Fungus, Enhances Biomass Production and Promotes Lateral Root Growth Through an Auxin, Dependent Mechanism in *Arabidopsis*. *Journal Plant Physiol*; 149 (3): 1579-1592.
- Cook, R.J. and Baker, K.F. 1989. The Nature on Practice of Biological Control of Plant Pathogens. Minesota: ABS press, The American Phytopathological Society, St. Paul, 539 p.

- Darmayasa, I.B.G., Sentana, P., Sujaya, I.N. and Sukrama, I.D.M. 2015. "Potensi *Trichoderma asperellum* TKD dalam Menghambat Pertumbuhan *Aspergillus flavus* FNCC6109 sebagai upaya Mengurangi Cemaran Aflatoksin B₁ pada Pakan Konsentrat". (Disertasi). Denpasar: Program Pascasarjana Universitas Udayana.
- Dharmayanti, N.LP.I. 2011. Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Journal Wartazoa*; 21(1): 1-9.
- Dai, Y.C. 2005. First Report of Sapwood Rot of Peach Caused by *Schizophyllum commune* in China. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, China. *Journal Plant Disease*; 89 (7): 778 pp.
- Degenkolb, T., Von-Dohren, H., Nielsen, K. F., Samuels, G. J. and Bruckner, H. 2008. Recent advances and future prospects in peptaibiotics, hydrophobin, and mycotoxin research, and their importance for chemotaxonomy of *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Journal Chem. Biodivers*; 5:671-680.
- Deacon, J.W. 1997. Modern Micology. Blackwell Science. New York. 303 pp.
- Dinas Perkebunan Provinsi Bali. 2014. *Statistik Perkebunan Bali*. Dinas Perkebunan Pemerintah Provinsi Bali.
- Dinas Perkebunan Provinsi Bali. 2013. *Statistik Perkebunan Bali*. Dinas Perkebunan Pemerintah Provinsi Bali.
- Dinas Perkebunan Provinsi Bali. 2012. *Statistik Perkebunan Bali*. Dinas Perkebunan Pemerintah Provinsi Bali.
- Dinas Perkebunan Provinsi Bali. 2011. *Statistik Perkebunan Bali*. Dinas Perkebunan Pemerintah Provinsi Bali.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2012. Peningkatan Produksi, Produktivitas dan Mutu Tanaman Rempah dan Penyegar. Pedoman Teknis Rehabilitasi Tanaman Cengkeh. Jakarta: Kementerian Pertanian. 43p.
- Direktorat Jenderal Perkebunan. 2007. Pengendalian Penyakit Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) pada Tanaman Karet di Sentra Pengembangan Karet (Provinsi Sumatera Selatan dan Kalimantan Barat). Jakarta: Direktorat Jenderal Perkebunan RI.
- Djafaruddin. 2000. Dasar-Dasar Perlindungan Penyakit Tanaman. Jakarta: Budi Aksara.
- Druzhinina, I.S., Kopchinskiy, A.G., Komori, M., Bissett, J., Szakacs, G. and Kubicek, C.P. 2005. Oligonucleotide barcode for species identification in

- Trichoderma* sp. and *Hypocrea* sp. *Fungal Genetics and Biology*; 42 (10): 813-828
- Druzhinina, I.R., Kopchinskiy, A.G., Druzhinina, I.S. 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Journal Mycoscience*; 47:55-64.
- Duclohier, H. 2007. Peptaibiotics and peptaibols: an alternative to classical antibiotics. *Journal Chem. Biodiv*; 4:1023-1026.
- Elsalam, K.A. 2010. Minireview Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. 2:91-95.
- Elad, Y. and Freeman, S. 2002. Biological control of fungal plant pathogens. In: Kempken F (ed) *The Mycota, A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research. XI. Agricultural Applications*. Springer, Heidelberg, Germany, pp. 93-109.
- Emberger, G. 2006. Key to Shapes. Messiah College. <http://www.messiah.edu/Oakes/fungi-on-wood/shapekey.htm> (7 Mei 2010).
- Erwin, Takemoto, S., Hwang, W.J., Takeuchi, M., Itoh, T. and Imamura, Y. 2008. Anatomical characterization of decayed wood in standing light red meranti and identification of the fungi isolated from the decayed area. *Journal Wood Science*; 54:233-241.
- Eziashi, E.I., Omamor, I.B and Odigie, E.E. 2007. Antagonism of *Trichoderma viride* and effects of extracted water soluble compounds from *Trichoderma* species and benlate solution on *Ceratocystis paradoxa*. *African Journal of Biotechnology*; 6:388-392.
- Fitriyani, I. 2010. "Pengujian Ketahanan Alami Kayu Karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) dan Sugi (*Cryptomeria japonica* (L.f) D. Don) terhadap Jamur Pelapuk Kayu *Schizophyllum commune* Fr". [Skripsi]. Bogor: Departemen Hasil Hutan. Fakultas Kehutanan IPB.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Journal Evolution*; 39 (4): 783-791.
- Gaigole, A.H., Wagh, G.N. and Khadse, A.C. 2011. Antifungal activity of *Trichoderma* species against soil borne pathogen. *International Asiatic Journal of Biotechnology Reseures*; 2 (4): 461-465.
- Gao, F., Dai, C. dan Liu, X. 2010. Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research* 4 (13): 1346-1351.

- Geiser, D.M. 2004. A Higher Level Phylogenetic Clasification of the Fungi. *Journal Mycological research*; 111:509-547.
- Gomez, K.A and Gomez, A.A. 2007. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*. Edisi kedua. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press).
- Gomez, E.A, Kasaya, M.C., deBarros, E.G., Borgs, A.C. and Araujo, E.F. 2002. Polymorphism in the Internal Transcribed Spacer (ITS) of the Ribosomal DNA of 26 Isolates of Ectomycorrhizal Fungi. *Journal Genet Mol Biol*; 25 (4): 477-483.
- Ghildival A. and Pandev, A. 2008. Isolation of Cold Tolerant Antifungal Strains of *Trichoderma* sp. from Glacial Sites of Indian Himalayan Region. *International Research Journal of Microbiology*; 3:559-564.
- Gruber, S., Kubicek, C. P. and Seidl-Seiboth, V. 2011. Differential regulation of orthologous chitinase genes in mycoparasitic *Trichoderma* species. *Applied and environmental microbiology*; 77 (20): 7217-7226.
- Gusnawaty, H.S., Taufik, M., Triana, L. dan Asniah. 2014. Karakterisasi Morfologis *Trichoderma* spp. Indegenus Sulawesi Tenggara. Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Halu Oleo Kendari. *Jurnal Agroteknos*; 4 (2): 87-93.
- Guttel, R.R., Larsen, N. and Woese, C.R. 1994. Lesson from Evoluting rRNA, 16S rRNA and 23S rRNA Strutsfores from a Comparative Perpective Mikrobos. 58:10-26.
- Hakkar, A.A., Rosmana, A. and Danial, M.R. 2014. Control of *Phytophthora* Pod Rot Disease on Cacao using Endophytic Fungi *Trichoderma asperellum*. Hasanuddin University, Makassar. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*; 10 (5): 139-144.
- Ha, T.N. 2010. Using *Trichoderma* sp. for Biological of Plant Pathogens in Vietnam. *Journal ISSAAS*; 16 (I): 17-21.
- Harni, R. dan Amaria, W. 2011. Penyakit Jamur Akar Putih dan Coklat pada Jambu Mete dan Strategi Pengendaliannya. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Aneka Tanaman Industri Sukabumi.
- Hajieghrari, B., Torabi-Giglou, M., Mohammadi, M.R. and Davari, M. 2008. Biological potential of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*; 7 (8): 967-972.
- Harman G.E., Bjorkman, T., Ondik, K. and Shores, M. 2008. *Trichoderma* sp. for Biocontrol. Changing paradigms on the mode of action and uses of

- Trichoderma* sp. for biocontrol. Research Information. Cornell University. USA.
- Harman, G.E. 2006. *Trichoderma* sp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum*, and Other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system)
<http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>.
12 May 2007.
- Harman, G.E., Charles, R.H., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Rev.* 2:43-54.
- Harman, G.E. and Kubicek C.P. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*, (eds) (2): Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis, Ltd., London
- Habazar, T. dan Yaherwandi. 2006. Pengendalian Hayati Hama dan Penyakit Tumbuhan. Andalas University Press. Padang.
- Hanson, L.E. and Howell, C.R. 2004. Elicitors of plant defense responses from biocontrol strains of *Trichoderma virens*. *Journal Phytopathology*; 94:171-176.
- Handayanto, E. 1998. Pengelolaan Kesuburan Tanah secara Biologi untuk Menuju Sistem Pertanian Sustainable. *Jurnal Habitat*; 10 (104): 1-7.
- Harrison, M.J and Van Buuren, M.L. 1995. A phosphate transporter from *Trichoderma fungus versiforme*. *Journal Nature*; 378:626-629.
- Hendarto. 2015. Efektivitas *Trichoderma Asperellum* pada Entris untuk Pengendalian Penyakit *Vascular Streak Dieback* pada Kakao di Kabupaten Bantaeng. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin Makasar.
- Herliyana, E.N., Jamilah, R., Taniwiryono, D. dan Firmansyah, M.A. 2013. Uji In-vitro Pengendalian Hayati oleh *Trichoderma* spp. terhadap Ganoderma yang Menyerang Sengon. Departemen Silviculture Fakultas Kehutanan, IPB. *Jurnal Silviculture Tropika*; 4 (3): 190-193.
- Herliyana, E.N. 1994. Bioekologi Jamur Pelapuk *Schizophyllum commune* Fr. dan Siklus Pelapukannya. Bogor: Jurusan Manajemen Hutan. Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor. *Jurnal Silviculture Tropika*; 4(3): 190-195.
- Hermosa, M.R. 2010. Molecular Characterization and Identification of Biocontrol Isolates of *Trichoderma* spp. *Journal Applied and Environmental Microbiology*; 66 (5): 21-27.

- Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Journal Plant Disease*; 87 (1): 4-10.
- Hutagaol, J.A. dan Melin, A. 2005. Pengendalian Jamur Akar Putih (JAP) pada Tanaman Karet Rakyat Menggunakan *Trichoderma koningii* OUD. Jambi: Balai Pengkajian Teknologi Pertanian (BPTP).
- Hutcheson, S.W. 1998. Current Concepts of Active Defense in Plants. *Journal Ann. Rev. Phytopathol*; 36:59-90.
- Jackson, A.M., Whipps, J.M., Lynch, J.M. and Bazin, M.J. 1991. Effects of some Carbon and Nitrogen sources on spore germination, Production of biomass and antifungal metabolit by species of *Trichoderma* and *Gliocladium virens* antagonistic to *Sclerotium cepivorum*. *International Journal Biocontrol Science and Technology*; 43-45.
- Jayasuriya, K.E. and Thenakoon, B.I. 2007. Biological control of *Rigidoporus microporus*, the cause of white rot disease in rubber. *Ey. J. Sci. (Bio.Ci.)*; 36 (1): 9-16.
- Jamil, I. 2005. *Analisis Sekuen Daerah ITS DNA ribosom (rDNA) dan Desain Primer untuk Mendeteksi Phytophthora palmivora Butl pada Kakao. (Tesis)*. Bogor, Institut Pertanian Bogor.
- James, S.A., Collins, M.D., Roberts, I.N. 1996. Use of an rRNA Internal Transcribed Spacer of the genera *Zygosaccharomyces* and *Torulaspora*. *International journal of systematic bacteriology*; 46 (1): 189-194.
- Jeger, M.J, Jeffries P, Elad, Y. and Xu, X.M. 2009. A generic theoretical model for biological control of foliar plant diseases. *Journal Theor Biol*; 256:201-214.
- Johnston, A. 1989. Disease and Pest. dalam Webster, C.C. and Bulkwill, W.J. (Ed). Rubber. Tropical Agriculture Series. Longman Singapore Pub. (Pte.) Ltd. Singapore: 415-458.
- Kowalska, J., Starosta, D.R., Seidler-Łożykowska, K. and Bocianowski, J. 2014. *Trichoderma asperellum* (T1) Stimulate Growth of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) In Different Systems of Cultivation. Institute of Plant Protection, National Research Institute in Poznań. *Journal Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*; 13 (1): 91-102.
- Kaewchai, S and K Soyong. 2010. Application of biofungicides against *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees. *Journal of Agricultural Technology*; 6 (2): 349-363.

- Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, E.M. and Lifshitz, R. 1999. Plant root bacterial interaction in biological control of soil borne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Journal Austral Plant Pathol*; 70: 44-49.
- Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, A., Kevei, F. and Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Journal Food Tech Biotech* 41 (1): 37-42.
- Krebs, C.J. 1999. *Ecological Methodology*. Benjamins Cummings. New York.
- Kumar, K., Amaresan, N., Bhagat, S., Madhuri, K. and Srivastava, R.C. 2012. Isolation and Characterization of *Trichoderma* sp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian Journal Microbiology*; 52 (2): 137-144.
- Kucuk, C. and Kivanc, M. 2003. Isolation of *Trichoderma* spp. and determination their antifungal and biochemical, physiological features. *Turk. Journal Biol*; 27:247-253.
- Kuc, J. and Strobel, N.E. 1992. Induce resistance using patogent and non patogens. In E.S. Tjamos (ed). *Biological Control of Plant Diseases*. Plemum Press. New York. Pp. 293-303.
- Kuo, M. 2003. *Schizophyllum commune*. Mushroom Expert. http://www.mushroomexpert.com/schizophyllum_commune.html (11 Januari 2010).
- Lagousi, H.K. 2002. *Mengenal Tanaman Cengkeh*. Makasar: CV. Telaga Zamzam. p. 81.
- León, I.P. and Montesano, M. 2013. Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 14:3178-3200.
- Lewis, J.A., Larkin, R.P. and Rogers, D.L. 1998. A formulation of *Trichoderma* and *Gliocladium* to reduce damping-off by *Rhizoctonia solani* and saprophytic growth of the pathogen in soil less mix. *J. Pl. Dis*; 82: 501-506.
- Lone, M.A., Mohd. R.W. and Subzar, A.S. 2012. Antagonistic Potentiality of *Trichoderma harzianum* Against *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus niger* and *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*; 2 (8): 51-54.
- Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Geraldine, A.M., Brand-AO, R.S., and Monteiro, V.N. 2012. Biochemical and Metabolic Profiles of Brazilian Cerrado and Potential Antagonis Againt *Sclerotiorum*. *Journal Fungal Biology*; 116:815-824.

- Lorito, M., V. Farkas, S. Rebuffat, B. Bodo, and C.P. Kubicek. 1996. Cell Wall Synthesis is A Major Target of Mycoparasitic Antagonism By *Trichoderma harzianum*. *Journal Bacteriology*; 178:6382–6385.
- Lorito, M., Hayes, C.K., Zoina, A., Scala, F., Del Sorbo, G., Woo, S.L. and Harman, G.E. 1994. Potential of genes and geneproducts from *Trichoderma* sp. and *Gliocladium* sp. for the development of biological pesticides. *Journal Molecular Biotechnology*; 2:209-217.
- Lorito, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Broadway, R.M., Tronsmo, A., Woo, S.L. and Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma*. *Phytopathology*; 83:302-307.
- Lunge, A.G. and Patil, A.S. 2012. Characterization of Efficient Chitinolytic Enzyme Producing *Trichoderma* sp: A Tool for Better Antagonistic Approach. *Int. Journal Science, Environment and Technology*; 1 (5): 377-385.
- Lynch, J.M. 1990. Introduction: Some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. Pp. 1-10.
- Martins, L.F., Kolling, D., Camassola, M., Dillon, A.J.P. and Ramos. L.P. 2008. Comparison of *Penicillium echinulatum* and *Trichoderma reesei* Cellulases in Relation to Their Activity Against Various Cellulosic Substrates. *Journal Bioresource Technol*; 99:1417-1424.
- Manurung, L., Lubis, L., Marheni dan Dalimunthe, C.I. 2015. Pengujian Berbagai Jenis Bahan Aktif terhadap Penyakit Jamur Akar Putih (JAP) (*Rigidoporus microporus* (Swartz: Fr.)) di Areal Tanpa Olah Tanah (TOT). Program studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, USU, Medan. *Jurnal Online Agroekoteknologi*; 3 (1): 168-178.
- Matroudi, S., Zamani, M.R. and Motallebi, M. 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. Department of Plant Biotechnology, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB). *Teheran Egyptian Journal of Biology*; 11:37-44.
- Monahan, C. 1998. Diseases of Bamboos in Asia an Illustrated Manual. INBAL Technical Report. Kerala Forest Reseach Institut. *Pcechi, Kerala, India*: 10.
- Munarni dan Widjajanti, H. 2011. Skrining Bakteri Kitinolitik Antagonis terhadap Pertumbuhan Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) dari Rizosfir Tanaman Karet. Sumatera Selatan: FMIPA Universitas Sriwijaya. *Jurnal Penelitian Sains*; 14 (1D): 51-56.
- Muljana, W. 2007. *Bercocok Tanam Cengkeh*. Yogyakarta: Aneka Ilmu.

- Muzzarelli, R. A., Guerrieri, M., Goteri, G., Muzzarelli, C., Armeni, T., Ghiselli, R., Cornelissen, M. 2005. The biocompatibility of dibutryl chitin in the context of wound dressings. *Journal Biomaterials*; 26:5844-5854.
- Nasreen, Z., Khan, S.J., Yasmeen, A., Shafique, M., Usman, S. and Sakhawat, A. 2015. Optimization of Sub-Merged Culture Conditions for Biomass Production in *Schizophyllum commune*, a Medicinal Mushroom. Pakistan Counsel of Scientific and Industrial Research, Lahore, Pakistan. *Journal of Current Microbiology Applied Sciences*; 4 (2): 258-266.
- Nagayama, K., Watanabe, S., Kumakura, K., Ichikava, T. and Makino, T. 2007. Development and commercialization of *Trichoderma asperellum* SKT-1 (Ecohope), a microbial pesticide. *Journal Pestic. Sci*; 32 (2): 141-142.
- Nagy, V., Seidl, V., Szakacs, G., Komon-Zelazowska, M., Kubicek, C. P. and Druzhinina, I. S. 2007. Application of DNA bar codes for screening of industrially important fungi: the haplotype of *Trichoderma harzianum* sensu stricto indicates superior chitinase formation. *Journal Appl. Environ. Microbiol*; 73:7048-7058.
- Nerda, I.K. 2016. *Daftar Perkembangan Harga Komoditi Perkebunan dan Kehutanan*. Dinas Perkebunan dan Kehutanan Kabupaten Buleleng.
- Neliyati, Gusniwati, Lizawati dan Kartika, E. 2015. Penerapan Teknologi Pengendalian Terpadu Penyakit Jamur Akar Putih Pada Tanaman Karet di Desa Giriwinangun Kecamatan Rimbo Ilir, Kabupaten Tebo. Fakultas Pertanian Universitas Jambi. *Jurnal Pengabdian pada Masyarakat*; 30 (2): 1-8.
- Nester, E. W., D. G. Aderson, C. E. Robert, Jr, and M. Nester. 2007. *Microbiology*. Fifth Edition. Published by McGraw-Hill. Americas, New York.
- Nishizawa, T., Zhaorigetu, M., Komatsuzaki, Y., Sato, N., Kaneko and Ohta, H. 2010. Molecular characterization of fungal communities in non-tilled cover-cropped upland rice field soils. *Journal of Microbes and Environment*; 25 (3): 204-210.
- Noguchi, A., Inohara-Ochiai, M., Ishibashi, N., Fukami, H., Nakayama, T. and Nakao, M. 2008. A novel glucosylation enzyme: molecular cloning, expression, and characterization of *Trichoderma viride* JCM22452 enzyme amylase and enzymatic synthesis of some flavonoid monoglucosides and oligoglucosides. *J. Agric. Food Chem*; 56:12016-12024.
- Noveriza, R.W.. Yulneriwani dan Damely. 1999. *Penuntun Praktikum Mikrobiologi*. Jakarta: Fakultas Biologi Universitas Nasional.

- Nurhayati. 2011. Penggunaan Jamur dan Bakteri dalam Pengendalian Penyakit Tanaman secara Hayati yang Ramah Lingkungan. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Sriwijaya. Prosiding Semirata Bidang Ilmu-ilmu Pertanian BKS-PTN Wilayah Barat.
- Nugroho, T.T., Ali, M., Ginting, C., Wahyuningsih, Dahliaty, A., Devi, S. dan Sukmarisa, Y. 2003. Isolasi dan Karakterisasi sebagian Kitinase *Trichoderma viride* TNJ63. *Jurnal Natur Indonesia*; 5 (2): 101-106.
- Omorusi, V. I., Omo-Ikerodah, E.E. and Mokwunye, M.U.B. 2011. Evaluation of effect of antagonistic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on incidences of some disease of *Hevea brasiliensis* (Muell. Arg). *Journal Nature and Science*; 9 (12): 151-154.
- O'Brien, H.E., Parrent, J.L., Jackson, J.A., Moncalvo, J.M. and Vilgalys, R. 2005. Fungal Communities' Analysis by Large-Scale Sequencing of Environmental Samples. *Journal Environ Microbiol*; 71:5544-5550.
- Ozbay, N., Newman, S.E. and Brown, W.M. 2004. The Effect of the *Trichoderma harzianum* strains on the growth of tomato seedling. In A. Vanachter (Ed.). *Proc. XXVI IHC-Managing. Journal Soil-Borne Pathogens Acha Host*; 635:131-135.
- Patil, A.S. 2012. Strain Improvement of *Trichoderma harzianum* by UV Mutagenesis for Enhancing its Biocontrol Potential Against Aflatoxigenic *Aspergillus* sp. *Research Article, The Experiment*; 4 (2): 228-242.
- Pandey, A. and Singh, P. 2011. Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (Clove) with metal ion effect against food borne pathogens. Lucknow India: *Asian Journal of Plant Science and Research*; 1 (2): 69-80.
- Perazzolli, M. Roatti, B., Bozza, E. and Pertot, I. 2011. *Trichoderma harzianum* T39 induces resistance against downy mildew by priming for defense without costs for grapevine. *Journal Biological Control*; 58:74-82.
- Pal, K.K. and Gardener, B.M. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor.
- Paulitz, T.C. and Belanger, R.R. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Journal Rev. Phytopathol*; 39:103-133.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Geocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. *Journal Annual Review of Phytopathology*; 23:23-54.
- Partayasa, N. 2011. "Petani di Desa Unggahan Perlu Pembasmi Penyakit Cengkeh". *Bisnis Bali*, 26 September 2011.

<http://www.bisnisbali.com/2011/09/26/news/potensi/b.html> Diakses, 20 April 2013.

- Pitt, J.I. and A. D. Hocking. 1997. *Fungi and Food Spoilage*. Second Edition. Printed in Great Britain at the University Press, Cambridge.
- Puthut, E.A., Rahman, A.M., Hermansyah, D.A., Aladjai, E., Imran, M., Alimuddin, M.R. Arizona, N. dan Halim, R. 2013. *Ekspedisi Cengkeh*. Makasar; *Imnawa*: 2-7.
- Radji, M., Puspaningrum, A. dan Sumiati, A. 2010. Deteksi cepat bakteri *Escherichia coli* dalam sampel air dengan metode Polymerase Chain Reaction menggunakan primer 16E1 dan 16E2. *Jurnal Makara Sains*; 14 (1): 39-43.
- Rahman, A., Begum, M.F., Rahman, M.M., Bari, M.A., Ilias, G.N.M. and Alam, M.F. 2011. Isolation and identification of *Trichoderma* species from different habitats and their use for bioconversion of solid waste. *Turk Journal Bio*; 35:183-194.
- Rahayu, F., Saryono dan Titania T.N. 2015. Isolasi DNA dan Amplifikasi PCR Daerah ITS rDNA Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau. *JOM FMIPA*; 2 (1): 100-106.
- Rawat, R. and Tewari, L. 2010. Transmission electron microscopic study of the cytological changes in *Sclerotium rolfsii* parasitized by a biocontrol fungus *Trichoderma* sp. *Mycology: An International Journal on Fungal Biology*; 1 (4): 237-241.
- Rosa, D.R. and Herrera, C.J.L. 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. *Journal Biological Control*; 51 (1): 66-71.
- Rowell, R.M. 2005. *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites*. Florida: CRC Press.
- Ruhnayat, A. dan Wahyudi, A. 2012. *Petunjuk Pembenihan Tanaman Cengkeh*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat. Jakarta: Kementerian Pertanian RI.
- Samingan. 2014. Antagonistic Ability of *Trichoderma* sp. against *Ganoderma* sp. on Litter Medium of *Acacia mangium*. Program Studi Pendidikan Biologi FKIP Unsyiah Darussalam Banda Aceh. *Jurnal Natural*; 14 (2): 36-44
- Samingan, Susana dan Hasanuddin. 2012. Isolasi Fungi Tanah dari Perkebunan Kopi Rakyat di Kabupaten Bener Meriah Aceh dan Kajian Potensinya.

FKIP Unsyiah Banda Aceh. *Prosiding Seminar Nasional XXI Perhimpunan Biologi Indonesia Cabang Aceh*. P. 51-53.

- Said, S.D. 2007. Spore production by biocontrol agent *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation: Effect of agitation and aeration. Departement of Chemical Engineering Faculty. Syiah Kula University. Darussalam-Banda Aceh. *Jurnal Rekayasa Kimia dan Lingkungan*; 6 (2): 71-76.
- Samuels, G.J., Suarez, C., Solis, K., Holmes, K.A., Thomas, S.E., Ismaiel, A. and Evans, H.C., 2006. *Trichoderma theobromicola* and *T. paucisporum*: two new species from South America. *Journal Mycol Res*; 3:381-392.
- Samuels, G.J. 2002. *Trichoderma* Online [Online]. Available at: <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [Accessed: 16 February 2013].
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning*. Book New York: Cold Spring Harbor.
- Sanz, L., Montero, M., Redondo, J., Llobell, A. and Monte, E. 2005. Expression of an β -1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *Journal FEBS*; 272:493-499.
- Sashiwa, H., Fugishima, S., Yamono, N., Nakayama, A., Muraki, E., Hiraga, K., Oda, K., Aiba, S. 2003. Production of *N*-acetyl-D-glucosamine from alpha-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330. *Journal Carbohydr. Res*; 337:761-763.
- Schubert M., Siegfried, F. dan Francis W.M.R. Schwarze. 2008. In Vitro Screening Of An Antagonistic *Trichoderma* Strains Against Wood Decay Fungi. *Journal Arboricultural*; 31:227-248.
- Schmidt, O. 2006. *Wood and Tree Fungi. Biology, Damage, Protection, and Use*. Berlin: Springer.
- Serussiaux, E., Goffinet, B., Miadlikowska, J. and Vitikainen, O. 2009. Taxonomy, Phylogeny, & Biogeography of The Lichen Genus *Peltigera* in Papua New Guinea. *Journal Fungal Diversity*; (38):185-244.
- Semangun, H. 2008. *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Semangun, H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.
- Semangun, H. 2000. *Penyakit-Penyakit Karet Perkebunan di Indonesia*. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

- Semangun, H. 1996. *Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Shoresh, M., Yedidia, I. and Chet, I. 2005. Involvement of Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Pathway in the Systemic Resistance Induced in Cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. Department of Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. *Journal Biological Control*; 95 (1): 76-84.
- Singh, A., Shahid, M. and Srivastava, M. 2014. Phylogenetic relationship of *Trichoderma asperellum* Tasp using Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences. Department of Plant Pathology, C.S.A. University of Agriculture & Technology. India. *International Journal of Advanced Research*; 2 (3): 979-986
- Siregar, H dan Suhendi. 2006. Usaha Tani Cengkeh, Industri Rokok dan Kebijakan Kenaikkan Harga Jual Eceran Rokok. *Makalah yang Disampaikan pada Semiloka Nasional Penanganan Permasalahan Percengkehahan di Indonesia*. Jakarta. 9 Februari.
- Sigler, L, De-La Maza, L.M., Tan, G., Egger, K.N and Sherburne, R.K. 1995. Diagnostic difficulties caused by a nonclamped *Schizophyllum commune* isolate in a case of fungus ball of the lung. *Journal Clin Microbiol*; 33:1979-83.
- Simanungkalit R.D.M. 1993. Efficiency of vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi-soybean symbiosis at various levels of fertilizer. *Proceedings of Second Asian Conference on Mycorrhiza*. Biotrop. Special Publication No. 42. M. Syam and BH Siwi (Eds.). SEAMEO Biotrop, Bogor. Indonesia.
- Shivas, R. and Beasley, D. 2005. Management of Plant Pathogen Collections. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Canberra: Commonwealth of Australia.
- Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E.L. 1998. Secondary Metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E., Kubicek, C.P. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium*. Journal Taylor and Francis Ltd. London; 1:139-191.
- Shivanna. E., M. Bar-Eyal, I. Chet, A. Herrera-Estrella. O. Kteifeld and Y. Spiegel. 1995. Mechanism of induced systemic resistance of cucumber to anthracnose by plant growth promotion fungi. *Journal International Annal. Phytopatol. Soc. Japan*; 61: 267
- Soesanto, L. 2013. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.

- Soesanto, L. 2009. Pengendalian Hayati Patogen Tanaman: Peluang dan Tantangan dalam Menunjang Ketahanan Pangan Berkelanjutan. *Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman*. Purwokerto: 28 Februari.
- Soesanto, L. 2008. *Pengantar Pengendalian Hayati Penyakit Tanaman*, Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Soesanto, L., Soedarmono, N. Prihatiningsih, A. Manan, E. Iriani dan J. Pramono. 2004. Kajian Geofitopatologis Penyakit Rimpang Jahe di Wilayah Jawa Tengah. Laporan Hasil Penelitian. Lembaga Penelitian Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto dan BPTP Jawa Tengah. Ungaran. 50 hal (Tidak dipublikasikan).
- Struck, C. 2006. Infection Strategies of Plant Parasitic Fungi. *Journal The Epidemiology of Plant Diseases*, 2nd edition: 117-137.
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ed. ke-3. California: Ten Speed Press.
- Steyaert, J.M., Ridgway, H.J., Elad, Y. and Stewart, A. 2003. Genetic basic of mycoparasitism: a mechanism of biological control by species of *Trichoderma*. *International New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*; 31:281-291.
- Suanda, I.W., Sudana, I.M., Temaja, I.G.R.M., Ristiati, N.P. and Susanta, I.G.N.A.W. 2016. Molecular Identification of Mushroom Causing Wilt Disease in Clove Plants (*Syzygium aromaticum* L.). Doctoral Student at Study Program of Agricultural Sciences Bali, Indonesia: Udayana University. *International Journal Pure Applied Bioscience*; 4 (2): 78-84.
- Suanda, I. W. 2016. Karakterisasi Morfologis *Trichoderma* sp. Isolat JB1 dan Antagonisme terhadap Patogen Penyebab Penyakit Rebah Kecambah (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) pada Tanaman Tomat. *Prosiding Seminar Nasional FMIPA Universitas Pendidikan Ganesha*. Singaraja 30 Juli.
- Suanda, I.W. dan Ratnadi, N.W. 2015. Daya Antagonisme *Trichoderma* sp. Lokal terhadap Jamur Patogen Penyebab Penyakit Rebah Kecambah (*Sclerotium rolfsii* Sacc.) pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill). Prodi Pendidikan Biologi FPMIPA IKIP PGRI Bali. *Jurnal Emasains*; IV (2): 155-162.
- Subash, N., Viji, J., Sasikumar, C. and Menakshisudaram, M. 2013. Isolation, Media Optimization and Formulation of *Trichoderma harzianum* in Agricultural Soil. *Journal Microbiol. Biotech*; 3 (1): 61-64.

- Suprianto. 2013. Penyakit Jamur Akar Putih dan Solusi Produknya dengan *Trichoderma*. <http://supriantoskomks.blogspot.com/2013/06/penyakit-jamur-akar-putih-pada-tanaman.html>. diakses tanggal 19 Desember 2013.
- Sudirja, P. 2011. Pengendalian Jamur Akar Putih (*Rigidoporus lignosus*) pada Tanaman Jambu Mete secara Terpadu. Disbun PSP. Provinsi NTB.
- Suhaeni, N. 2007. *Petunjuk Praktis Menanam Cengkeh*. Bandung: Penerbit Nuansa. P. 55.
- Sun, M. and Liu, X. 2006. Carbon requirements of some nematophagous, entomopathogenic and mycoparasitic hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Journal Mycopathologia*; 161:295-305.
- Sumarsih, S. 2003. *Mikrobiologi Dasar*. Fakultas Pertanian. Yogyakarta: UNP Veteran.
- Takemoto, S., Nakamura, H., Erwin, Imamura, I. and Shimane, T. 2010. *Schizophyllum commune* as a Ubiquitous Plant Parasite. Plant Pathology Research Team, National Institute of Fruit Tree Science, National Agriculture and Food Research Organization (Tsukuba, Ibaraki 305–8605, Japan) *JARQ*; 44 (4): 357-364.
- Temaja, G.R.M. 1994. “Pengaruh Residu Tanaman pada Antagonisme *Trichoderma Koningii* terhadap Pertumbuhan Etotrofik Jamur Akar Putih Tanaman Karet”. (Tesis). Yogyakarta: Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada.
- Tombe, M. 2008. Pemanfaatan Pestisida Nabati dan Agensia Hayati untuk Pengendalian Penyakit Busuk Jamur Akar Putih pada Jambu Mete. Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik. *Bul. Litro*; XIX (1): 68-77.
- Teresa, M.F., Adilson, L.L. and Cirano, J. 2002. Purification and characterization of an exo- β -1.3-glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *Journal FEMS Microbiology Letters*; 219:81-85.
- Tjitrosoepomo, G. 2000. *Taksonomi Tumbuhan (Spermatophyta) cetakan 6*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The clustal X windows interfase: flexible strategis for multiple sequence alignment aided by quality analysis tool. *Journal Nucleic Acids Research*; 25 (24): 4876-4884.
- Turner, J. 2004. *Spice: The History of a Temptation*. Vintage Books.
- Umrah, Anggraeni, T., Esyanti, R.R. and Aryantha, I.N.P. 2009. The Antagonisticity and Effectiveness of *Trichoderma* sp. in Controlling

- Phytophthora palmivora* Development on Cocoa Pod. Department of Plant Pests & Diseases Faculty of Agriculture, Tadulako University. *Journal Agroland*; 16 (1): 9-16.
- UniProt Consortium. 2010. Species *Schizophyllum commune* (bracket fungus). <http://www.uniprot.org/taxonomy/5334> (11 Januari 2010).
- Villalobos, S.S., Guzman-Ortiz, D.A., Gomez-Lim, M.A., Delano-Frier, J.P., de-Folter, S., Sanchez-Garcia, P. and Pena-Cabriaes, J.J. 2013. Potential Use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechefeld et Nirenberg) T8a as A Biological Control Agen Against Anthracnose In Manggo (*Mangifera indica* L.). *Journal Biological Control*; 64:37-44.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K. Ghisalberti, E.L. Marra, R. Woo, S. L. and Lorito. M. 2008. *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Journal Soil biology and Biochemistry*; 40:1-10.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E.L., Lorito, M. and Sivasithamparam, K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Journal Letters in Applied Microbiology*; 43:143-148.
- Viterbo, A, Shores, M., Harel, M. 2004. Enhancement of Plant Disease Resistance ByThe Biocontrol Agent *T. asperellum*. Department of Biological Chemistry www.weizmann.ac.il/Biological_Chemistry/scientist/Chet/Chet.html (21 Desember 2006).
- Wells, H.D. 1998. *Trichoderma* as A Biocontrol Agent. dalam Biocontrol of Plant Disease., Mukerji KG, Garg KL (ed.). CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1:72-79.
- Widiantini, F., Purnama, A., Yulia, E. dan Formanda, D. 2016. Keefektifan Oligochitosan dalam Menekan Pertumbuhan Jamur Patogen *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki Penyebab Penyakit Jamur Akar Putih pada Tanaman Cengkeh secara *in vitro*. Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Padjadjaran. *Jurnal Agrikultura*; 27 (1): 59-64
- Widyastuti, S.M. 2006. The biological control of *Ganoderma* root rot by *Trichoderma*. *ACIAR Proceedings* No. 124.
- Widyastuti, S.M., Sumardi, dan Sumantoro, P. 2001. Efektivitas *Trichoderma* spp. sebagai pengendali hayati terhadap tiga patogen tular tanah pada beberapa jenis tanaman kehutanan. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*; 7 (2): 98-107.

- Wipf, P. and Kerekes, A.D. 2003. Structure reassignment of the fungal metabolite TAEMC161 as the phytotoxin viridiol. *J. Nat. Prod*; 66:716--718.
- White, T., Bruns, J., Lee, T. and Taylor, S.J. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A Innis, D.H Gelfand, J.J Sninsky; T. J. White, (eds). *PCR Protocols: a Guide To Methods and Applications*. Pp. 315-322. Academic Press, San Diego, CA.
- Yuliani, S. dan Satuhu, S. 2012. *Panduan Lengkap Minyak Atsiri*. Jakarta: Penebar Swadaya. P 75-80.

LAMPIRAN

1. Intensitas penyakit akar putih pada penelitian bibit cengkeh di rumah kaca

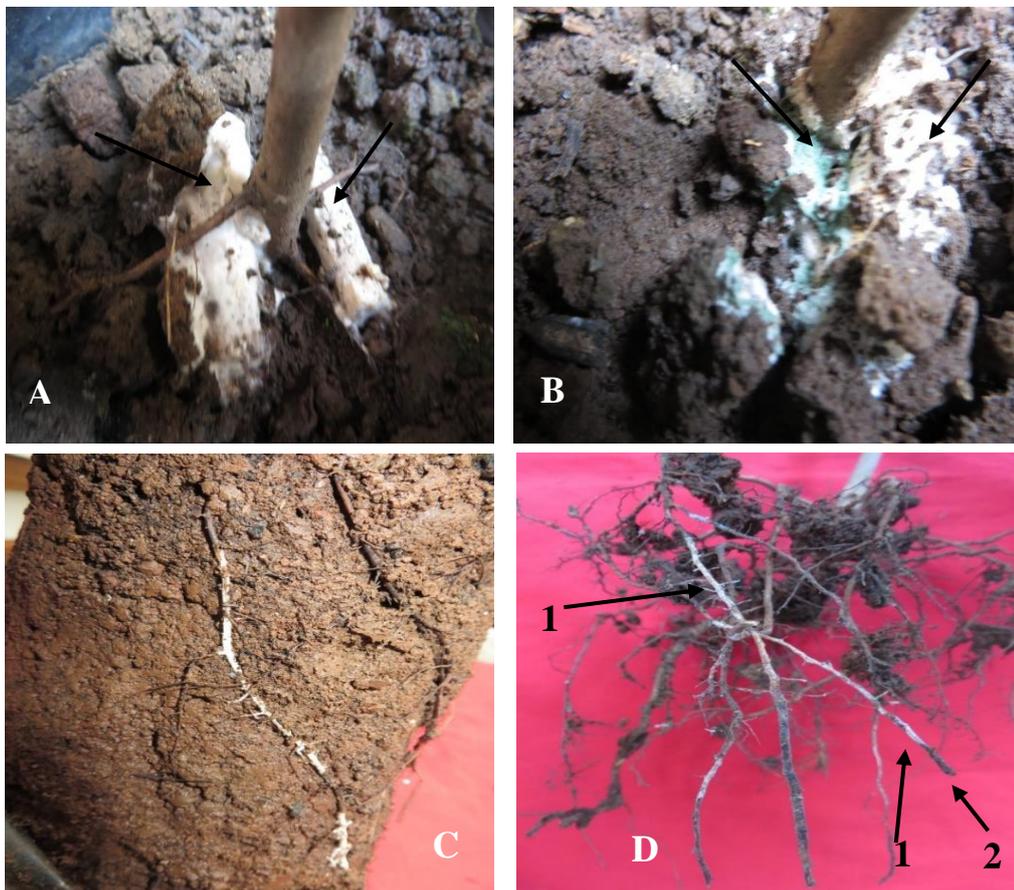


A

B

A= bibit cengkeh diberi patogen tanpa perlakuan antagonis *Trichoderma* sp. (kontrol)
 B= bibit cengkeh diberi perlakuan patogen dan *Trichoderma* isolat JB1

2. Miselia jamur patogen di akar bibit cengkeh pada penelitian di rumah kaca

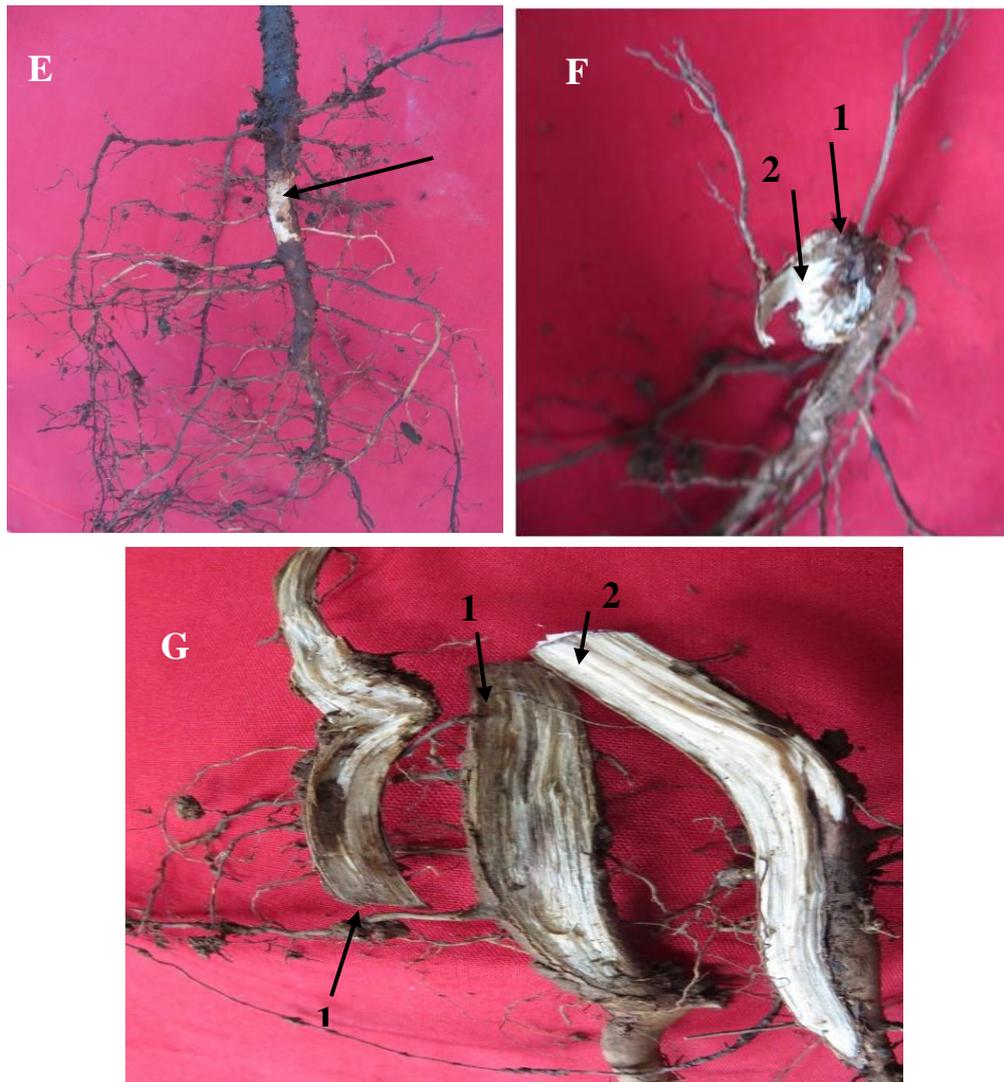


A

B

C

D



Gambar Miselia Jamur Patogen

- A= batang ketela pohon yang diisolasi jamur patogen isolat SK diinfeksi pada pangkal akar bibit cengkeh (tanda panah)
- B= miselium jamur patogen (warna putih) dan antagonis *Trichoderma* sp. (warna hijau) mengkoloni akar bibit cengkeh di *polybag* (tanda panah)
- C= rizomorf jamur patogen berwarna putih menempel pada akar bibit cengkeh di *polybag* (tanda panah)
- D= akar bibit cengkeh yang diinfeksi jamur patogen (kontrol) dicabut dan kelihatan *rizomorf* jamur patogen menempel di akar (tanda panah 1), sebagian akar yang terinfeksi patogen menyebabkan akar lunak dan berwarna hitam (tanda panah 2)
- E= miselium jamur patogen menempel pada pangkal akar bibit cengkeh
- F= pangkal akar bibit cengkeh yang dipotong (1= berwarna hitam diduga jaringan akar mengalami kematian karena patogen); (2= akar berwarna putih dan jaringan akar belum terinfeksi patogen)
- G= pangkal akar bibit cengkeh yang dibelah: 1= akar terinfeksi patogen berwarna hitam (tanda panah) dan 2= akar bibit cengkeh diberi perlakuan *Trichoderma* sp. isolat JB1 berwarna putih (tanda panah)

3. Hasil BLAST-N *Complete sequence Jamur Patogen Isolat SK*

TGATTTGAGGTCAGTCAAAGTTAGCGCACAAAGTCGCTAGTCTCGGTCAAGAGACGG
 TTAGAAGCAGAATCCTATTGAAACTGACTAGGTCAGTCCCGAGATGGTCAACGACG
 TAGAAATTATCACATCGGAGACGCGATCCCGCAAGGGAAATCCGCTAATACATTTA
 AGAGGAGCTGGCTCCGTTAGGCTCCAGCAGACCTCCACTTCCAAGCCACTCTCGAG
 ACCGAAGTCAAAGAGGGTTGATGGTATTTAATGACACTCAAACAGGCATGCCCCT
 CGGAATACCAAAGGGCGCAAGGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTG
 CAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCGAGAGCCAAGAG
 ATCCGTTGTGCGAAAGTTGTATTAACTTTTAGGGTCTGTCAAGACCATGATTACATT
 CGTTAACATACTTTAAGGTGTGAGGTAGACGTAGTCAACCGCCGCCCGTGAAGGCT
 TTGGGACTACATAAGGTGCACAGGATCAGAACAAGATGAACTTGTTTGATTGTTA
 ATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAACCTTGTTACACTTTTTACTCCA

4. Hasil BLAST-N *Complete sequence Antagonis Trichoderma sp. Isolat JB1*

ACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCAATGTGAACGTTACCAAACCTGTTGCCTC
 GGCGGGGTCACGCCCCGGGTGCGTCGCAGCCCCGGAACCAGGCGCCCCGCCGGAGGA
 ACCAACCAAACCTCTTTCTGTAGTCCCCTCGCGGACGTATTTCTTACAGCTCTGAGCA
 AAAATTCAAATGAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
 AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
 AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCG
 TCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGATCGGCGTTGGGGATCGGGACCCCTCAC
 ACGGGTGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCTGCGCTGTA
 GTTTGCACAACCTCGCACCCGGGAGCGCGGGCGCGT

5. Pengujian Antagonis Penyakit Layu pada Bibit Cengkeh di Rumah Kaca



A= Bibit cengkeh pada pengujian di rumah kaca

B= Pengamatan pada pengujian di rumah kaca

C= Perlakuan JAP yang ditumbuhkan di batang singkong (*food base*) diinfeksi pada akar bibit cengkeh (tanda panah)

D= Miselia JAP tumbuh di akar bibit cengkeh yang diinfeksi JAP (tanda panah)

E= (1) Miselia JAP dan (2) miselia *Trichoderma* sp. sebagai Antagonis (tanda panah)

F= Pengamatan Bibit cengkeh yang diinfeksi JAP (tanda panah)

G= Miselia JAP merambat pada akar bibit cengkeh (tanda panah)