

Pembuatan Strain Nonpatogenik *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* dengan Radiasi Sinar Ultraviolet

Erni Susanti, Fitri Widiyanti, Tarkus Suganda
Jurusan HPT Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran
Jatinangor, Bandung 40600

ABSTRACT

Attempt to use ultraviolet (UV) light for the making of nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (FOL) have been carried out in laboratory conditions. The suspension of FOL were exposed to UV light for duration of 15, 30, 45 and 60 minutes. The distance between suspensions and UV light source was 5 cm. Result of the research obtained 13 strains of FOL with different pathogenicity. Two strains in comparison with the wild-type of FOL demonstrated an ability to have a degradation of its pathogenicity, while 11 strains experienced loss of pathogenicity to crop, and it was suspected to mutate to be nonpathogenic strains.

Key words : *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, UV light, nonpathogenic strain

Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* (FOL) adalah jamur patogen yang dapat menginfeksi tanaman dengan kisaran inang sangat luas (Mess *et al.*, 1999). Jamur ini menyerang jaringan bagian vaskuler dan mengakibatkan kelayuan pada tanaman inangnya dengan cara menghambat aliran air pada jaringan xilem (De Cal *et al.*, 2000). Salah satu tanaman yang diserang oleh *F. oxysporum* adalah tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). pada tanaman tomat, serangan jamur FOL mempunyai arti ekonomi yang sangat penting (Alabouvette *et al.*, 1996). Adanya serangan FOL menjadi salah satu pembatas yang menyebabkan terjadinya penurunan produksi tomat.

Pengendalian penyakit layu *Fusarium* cukup sulit karena patogen bersifat *soil inhabitant*, dan dapat bertahan sangat lama di dalam tanah tanpa adanya tanaman inang, sehingga rotasi tanaman menjadi tidak efektif. Pengendalian penyakit dengan mengaplikasikan fungisida sintetik ke dalam tanah hanya dapat menekan penyakit layu *Fusarium* untuk beberapa bulan saja (Alabouvette *et al.*, 1996), selain itu penggunaan fungisida sintetik secara terus-menerus juga dapat menyebabkan munculnya populasi patogen yang lebih tahan (Freeman *et al.*, 2002) dan juga akan mencemari lingkungan.

Alternatif lain untuk mengendalikan penyakit layu *Fusarium* adalah dengan memanfaatkan mikroba agen pengendali hayati. Pengendalian dengan cara ini dilaporkan cukup efektif dan belum ada yang melaporkan timbulnya ketahanan jamur patogen terhadap agen pengendali hayati (Freeman *et al.*, 2002). Dalam usaha mengintroduksi agen pengendali hayati, banyak metode yang saat ini dapat dilakukan untuk mengisolasi strain nonpatogenik, diantaranya dengan mengisolasi dari tanah supresif terhadap penyakit layu (Alabouvette *et al.*, 1996), dari jaringan akar tanaman (Yamaguchi *et al.*, 1992), atau dari tipe liar (*wild type*) patogen itu sendiri yang dibuat menjadi mutan melalui berbagai perlakuan mutasi (Freeman *et al.*, 2002).

Penggunaan sinar ultraviolet (UV) untuk memutasi strain patogenik (liar) menjadi strain nonpatogenik sudah dipraktekkan sejak lama. Sinar UV diketahui mampu menginduksi terjadinya mutasi pada mikroba, baik pada kondisi alamiah maupun laboratories (Pelczar & Chan, 1986).

Dari beberapa penelitian diperoleh informasi bahwa mutan *P. expansum* dan *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* yang diradiasi dengan sinar UV menunjukkan penurunan patogenitasnya (Mann Sit, Day, 1974). Pengaruh radiasi sinar UV terhadap *Colletotrichum magna* dilaporkan mengubah patogen tersebut menjadi bersifat nonpatogenik. Penyinaran terhadap *F. oxysporum* f. sp. *niveum* dengan menggunakan sinar UV dapat mengubah tingkat patogenitas jamur tersebut, dan isolate mutan yang diperoleh dilaporkan dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh tipe liarnya (Freeman *et al.*, 2002).

Dalam penelitian ini pemanfaatan sinar UV telah dilakukan untuk membuat strain nonpatogenik jamur FOL dengan harapan untuk mendapatkan agen pengendali hayati layu Fusarium pada tanaman tomat.

BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Fitopatologi dan rumah kaca Jurusan Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran di Jatinangor (700 d.p.l).

Tipe liar (*wild type*) jamur FOL yang digunakan, diisolasi dari tanaman tomat yang telah terserang penyakit layu Fusarium di daerah Lembang, Bandung. Untuk isolasi digunakan medium Potato Dextrose Agar (PDA), sedangkan untuk perbanyakan missal digunakan biji jagung pecah yang telah dipasteurisasi selama 2 jam.

Sebagai tanaman uji digunakan tanaman tomat varietas Ace55 yang telah disemai pada media sekam steril dan dibumbun. Tanah untuk media tanam disterilisasi dengan uap panas selama 2 jam dan dipindahkan pada pot-pot percobaan.

Pembuatan mutan FOL (mutagenesis). Biakan murni tipe liar jamur FOL dibuat suspensi konidianya dengan cara menambahkan 20 ml aquades steril ke atas permukaan biakan yang telah tumbuh memenuhi permukaan agar pada cawan petri. Suspensi konidia diperoleh dengan menggosokkan batang gelas berbentuk huruf L, dan suspensi yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring kasar. Kerapatan konidia suspensi kemudian diatur sehingga diperoleh konsentrasi 10^7 konidia/ml. Secara aseptik, 5 ml suspensi konidia jamur FOL ini dituangkan ke dalam cawan Petri kosong steril, kemudian di radiasi. Sumber sinar UV adalah lampu Philips TUV 30 W dengan panjang gelombang 245 nm. Jarak antara suspensi konidia yang diradiasi dengan lampu UV adalah 5 cm. Lama penyinaran yang diuji adalah 15, 30, 45 dan 60 menit (Cagan *et al.*, 2001). Suspensi yang telah diradiasi kemudian ditumbuhkan pada media PDA. Jamur yang tumbuh dari konidia yang telah diradiasi kemudian diuji patogenitasnya terhadap tanaman tomat.

Uji patogenitas jamur FOL. Uji patogenitas dilakukan dengan dua metode, yaitu metode pencelupan kar dan metode penuangan suspensi FOL ke dalam rizosfer tanah. Metode perendaman dilakukan dengan cara merendam akar tanaman tomat yang telah berumur 14 hari ke dalam 20 ml suspensi konidia FOL tipe liarnya dan suspensi konidia FOL yang tumbuh dari konidia FOL yang telah diradiasi (konsentrasi suspensi konidia 10^7 konidia/ml). Isolat-isolat FOL yang digunakan berasal dari biakan missal. Perendaman akar dilakukan masing-masing selama 30 menit, kemudian tanaman tomat tersebut ditumbuhkan pada gelas plastik ukuran 250 ml.

Sementara itu, metode pencampuran tanah dilakukan dengan cara mencampur media tanam dengan biakan missal. Banyaknya biakan missal FOL yang digunakan masing-masing sebanyak 6-8 g (setara dengan 10^7 konidia/gram biakan) per gelas plastic ukuran 250 ml. Pada medium tanah tersebut kemudian ditanam tanaman tomat yang telah

berumur 14 hari. Tanaman percobaan kemudian diatur dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan 14 perlakuan dan 2 ulangan.

Pengamatan patogenesitas dilakukan dengan membelah dan mengamati secara destruktif batang tanaman tomat pada saat tanaman tomat kontrol (tanaman yang diinokulasi dengan strain tipe liar FOL) sudah menampilkan gejala layu atau menjelang mati.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembuatan mutan FOL. Percobaan untuk menumbuhkan kembali suspensi yang telah diradiasi berhasil mendapatkan 13 koloni jamur FOL yang tumbuh pada media PDA setelah diradiasi sinar UV (Tabel 1.).

Tabel 1. Persentase pertumbuhan jamur FOL setelah diradiasi sinar UV

Perlakuan	Kerapatan Konidia/10 ml	Jumlah koloni yang tumbuh	% Pertumbuhan	Kematian
Sinar UV 15 menit	$6,95 \times 10^6$	10	$1,44 \times 10^{-4}$	$1,00 \times 10^2$
Sinar UV 30 menit	$6,95 \times 10^6$	0	0	$1,00 \times 10^2$
Sinar UV 45 menit	$6,95 \times 10^6$	2	$2,88 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^2$
Sinar UV 60 menit	$6,95 \times 10^6$	1	$1,44 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^2$

Hasil percobaan (Tabel 1.) menunjukkan bahwa persentase pertumbuhan jamur FOL setelah diradiasi sinar UV sangat kecil, hanya mencapai 0,0001%. Menurut Freeman *et al.* (2002), radiasi sinar UV ini menyebabkan tingkat mortalitas mencapai 99,99%. Pada penelitian ini radiasi sinar UV selama 15, 30, 45 dan 60 menit menghasilkan kematian konidia jamur hampir mendekati 100%. Hal ini diduga terjadi karena dosis radiasi yang terlalu tinggi (penyinaran terlalu lama). Radiasi sinar UV ini dilaporkan mempunyai energi yang sangat tinggi yang dapat menyebabkan kematian pada mikroba, dengan rata-rata kematian patogen yang bervariasi antara 90-99% (Abshire & Dunton, 1981). Akan tetapi adanya kemampuan dan ketahanan jamur FOL untuk mentoleransi pengaruh-pengaruh yang bersifat merugikan menyebabkan beberapa konidia jamur dapat tetap ditumbuhkan pada media biakan.

Pada media PDA koloni-koloni jamur yang berhasil diisolasi menunjukkan karakteristik yang berbeda (Tabel 2.), hal ini ditunjukkan dengan warna biakan jamur tersebut. Isolat 1 sampai isolat 10 baik pada turunan pertama (F1) dan kedua (F2) berwarna ungu, identik dengan warna FOL tipe liarnya (tetuanya), sementara itu isolat 12 dan isolat 13 menunjukkan perubahan warna yang berbeda dengan tetuanya pada F1 ataupun F2. Akan tetapi, pada isolat 11, hanya pada F1 biakan tersebut menunjukkan warna yang berbeda, sedangkan pada saat F2 warna biakan kembali seperti warna tetuanya. Hal ini menunjukkan bahwa pengaruh radiasi sinar UV dapat terjadi pigmen jamur FOL.

Perubahan pigmen ini ada yang bersifat genetik sehingga secara konsisten diturunkan ke keturunannya, dan ada yang bersifat sementara. Perubahan pigmen yang bersifat sementara ini mungkin hanya disebabkan oleh kerusakan pigmen karena adanya pengaruh dari radiasi sinar UV, sehingga tidak diwariskan keketurunannya. Selain itu pada isolat 11 kembalinya warna pigmen ini mungkin disebabkan jamur tersebut karena memiliki kemampuan untuk memperbaiki kerusakan yang disebabkan oleh sinar UV (Pelczar & Chan, 1984).

Tabel 2. Karakteristik jamur FOL setelah diradiasi oleh sinar UV pada berbagai waktu irradiasi.

Perlakuan	Koloni yang tumbuh	Warna koloni	
		F1	F2
Irradiasi 15 menit	Isolat 1	Ungu	Ungu
	Isolat 2	Ungu	Ungu
	Isolat 3	Ungu	Ungu
	Isolat 4	Ungu	Ungu
	Isolat 5	Ungu	Ungu
	Isolat 6	Ungu	Ungu
	Isolat 7	Ungu	Ungu
	Isolat 8	Ungu	Ungu
	Isolat 9	Ungu	Ungu
	Isolat 10	Ungu	Ungu
Irradiasi 45 menit	Isolat 11	Putih, miselium merah keunguan	Ungu
	Isolat 12	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman
Irradiasi 60 menit	Isolat 13	Putih	putih

Keterangan : F1 = keturunan pertama, F2 = keturunan kedua

Uji Patogenesitas Jamur FOL. Dari hasil pengujian di rumah kaca, isolat-isolat yang diinokulasikan pada tanaman tomat baik dengan cara perendaman akar tanaman tomat atau pencampuran pada media tanam, menunjukkan adanya perubahan tingkat patogenesitas yang berbeda (Tabel 3.). Berdasarkan hasil tersebut, hanya dua isolat yang masih tetap bersifat patogenik, sedangkan isolat-isolat lainnya mengalami kehilangan patogenesitasnya.

Dalam percobaan ini, indikasi tanaman terinfeksi atau tidaknya ditentukan oleh pengamatan destruktif terhadap pembuluh vaskuler batang. Hal ini disebabkan karena penampakan layu merupakan sindroma yang dapat disebabkan oleh berbagai penyebab. Dari Tabel 3 nampak bahwa isolat 7 dan isolat 11 tetap memiliki kemampuan untuk menginfeksi akar tanaman, akan tetapi jika dibandingkan dengan tipe liarnya, isolat-isolat tersebut membentuk ukuran gejala browning pada akar tanaman yang lebih kecil. Menurut Mann Sit Freeman *et al.* (2002), penurunan tingkat patogenesitas pada mutan FOL ini disebabkan oleh perubahan kemampuan mutan FOL untuk menghasilkan enzim ekstraselulase yang berperan dalam proses serangan jamur FOL pada akar dan jaringan pembuluh tanaman.

Kesebelas isolat lain yang diuji, tidak membentuk gejala browning pada akar tanaman, isolat-isolat ini diduga mengalami kehilangan patogenesitasnya. Pengaruh radiasi sinar UV ini pada proses mutagenesis disebabkan oleh kemampuan sinar UV dalam menginduksi perubahan secara genetik pada patogen, sehingga dapat mengubah patogen menjadi nonpatogenik (Freeman *et al.*, 2002). Mekanisme yang menyebabkan patoge berubah menjadi nonpatogenik ini, disebabkan oleh adanya perubahan biokimia pada strain nonpatogenik tersebut, yaitu berkurangnya produksi enzim pectik lyase ekstraseluler, menurunnya aktifitas polygalacturonase, dan terjadinya defisiensi sekresi enzim ekstraseluler (Yamaguchi *et al.*, 1992).

Tabel 3. Persentase serangan FOL pada tanaman tomat diukur berdasarkan gejala *browning* pada pembuluh vaskuler.

Perlakuan	Persentase Tanaman Terserang	
	Pencelupan Akar	Pencampuran Tanah
Isolat 1	0,00	0,00
Isolat 2	0,00	0,00
Isolat 3	0,00	0,00
Isolat 4	0,00	0,00
Isolat 5	0,00	0,00
Isolat 6	0,00	0,00
Isolat 7	30,00	50,00
Isolat 8	0,00	0,00
Isolat 9	0,00	0,00
Isolat 10	80,00	60,00
Isolat 11	0,00	0,00
Isolat 12	0,00	0,00
Isolat 13	100,00	100,00

Keterangan: Persentase serangan ini ditunjukkan dengan terbentuk atau tidaknya gejala *browning* pada tanaman sampel.

Berdasarkan uraian di atas, dapat diduga bahwa mutan FOL strain nonpatogenik yang berhasil diisolasi dalam percobaan ini terbentuk karena adanya mekanisme perubahan biokimia yang bersifat genetik, yang menyebabkan kehilangan kemampuannya untuk dapat menimbulkan penyakit pada tanaman tomat.

KESIMPULAN

Radiasi sinar UV dapat mempengaruhi tingkat patogenesitas jamur FOL. Beberapa mutan strain nonpatogenik yang berhasil diisolasi menunjukkan kehilangan kemampuannya untuk menginfeksi tanaman.

DAFTAR PUSTAKA

- Abshire R L & Dunton H. 1981. Resistance of selected strains of *Pseudomonas aeruginosa* to low intensity ultraviolet radiation. Appl. Envir. Microb. 41(6): 1419-1423.
- Alabouvette R, Lemanceau P & Steinberg C. 1996. Biological Control of Fusarium Wilts: Opportunities for Developing A Commercial Product. P 193-211.
- Cagan L & Svrcel M. 2001. The influence ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European Corn Borrrer, *Ostrinia nubilalis* Hbn (Lepidoptera: Crambidae). JCEA. Vol 2. No. 3-4.
- Day P R. 1974. Genetic of Host-Parasites Interaction. San Fransisco. W. H. Freeman and Company.
- De Cal A, Garcia-Lepe R & Melgarejo P. 2000. Induced resistance by *Penicillium oxalicum* against *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*: Histological studies of infected and induced tomato stem. Phytopathology 90: 260-268.
- Freeman S, Zveibel A, Vintal H & Maymon M. 2002. Isolation of nonpathogenic mutants of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* for biological control of Fusarium wilts in cucurbits. Phytopathology 92:164-168.

- Mess J J, Wit R, Testerink C S, de Groot F, Haring M A & Cornelissen B J B. 1999. Loss of avirulent and reduced pathogenicity of a gamma-irradiated mutant of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Phytopathology* 89: 1131-1137.
- Pelczar M J & Chan E C S. 1986. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Yamaguchi K, Kida, Arita M & Takahashi M. 1992. Induction of systemic resistance by *Fusarium oxysporum* MT0062 in solanaceous crops. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 58: 16-22.