

KEBERADAAN CENDAWAN *DARK SEPTATE ENDOPHYTE* (DSE) PADA SISTEM PERAKARAN BENIH *SHOREA SELANICA*

Dezi Handayani

Jurusan Biologi FMIPA Universitas Negeri Padang,
e-mail: dzhandayani@yahoo.com

ABSTRACT

Fungi have a variety of symbiotic interactions with plant roots, ranging from antagonism to mutualism. The mycorrhizal symbiosis between plants and fungi is universal, and most plant species are dependent on this symbiosis, including many economically important forest trees and crops. The another type of symbiosis is non-mycorrhizal association including fungal root endosymbiont. Dark Septate Endophyte (DSE) is one of non-mycorrhizal association between fungal and root plant. The occurrence of DSE in root's system of family of Dipterocarpaceae, especially Shorea selanica was not known yet. So, the research was conduct to analyze the occurrence of DSE in roots system of S. selanica seedling. DSE was found in 84% of the seedling observed and colonized 7.5 - 83.3% of its root segments. Under light microscopic observation, DSE occurs in roots system as chain-like hyphae inter- and intracellularly, microsclerotia intracellularly and short brown branched hyphae on root surface. These structures may either have brown or blue colour after tryphane blue staining.

Keywords: *Root Endosymbiont, Dark Septate Endophyte, Shorea Selanica.*

PENDAHULUAN

Akar tanaman berpembuluh umumnya dikolonisasi oleh berbagai jenis kelompok cendawan. Bentuk interaksi cendawan dengan akar tanaman yang paling umum adalah mikoriza. Cendawan mikoriza merupakan cendawan non patogen yang bersimbiosis dengan sekitar 80% akar tanaman berpembuluh (Smith & Read 1997). Selain itu mikoriza, ada juga bentuk asosiasi non-mikoriza yang hidup dalam jaringan tubuh tanaman inang. Biasanya cendawan yang hidup di tubuh tanaman inang disebut dengan cendawan endofit.

Salah satu cendawan endofit adalah cendawan DSE. Jumpponen & Trappe (1998) mendefinisikan DSE sebagai cendawan Askomiset dengan ciri hifa bersekat, memiliki konidia atau steril, membentuk struktur termelanisasi (hifa interseluler, hifa intraseluler dan mikroskleria) di dalam akar tanaman inang.

Kolonisasi DSE dilaporkan terjadi pada sekitar 600 spesies tanaman meliputi 320 genus dan 114 famili dan tersebar luas mulai dari daerah tropis sampai kutub dan pegunungan. DSE merupakan kelompok cendawan heterogen yang secara ekologi dan fungsinya tumpang tindih dengan cendawan tanah, cendawan saprob akar, cendawan patogen dan mikoriza.

Kolonisasi cendawan DSE pada akar tanaman dicirikan oleh adanya pertumbuhan hifa yang umumnya septat, berwarna hialin atau gelap dan mengalami melanisasi. Lipid ditemukan pada hifa dan berfungsi sebagai sumber energi untuk mempertahankan kelangsungan simbiosis antara kedua organisme pada saat kondisi lingkungan mengalami kekeringan. Makroskleria yang berwarna gelap umum dijumpai di dalam sel-sel akar yang dikolonisasi oleh DSE. Zhang *et al* (2010) menyatakan bahwa mikroskleria yang dibentuk oleh DSE di bagian korteks akar

tanaman *Lycium barbarum* memiliki bentuk yang bervariasi.

Seerangan & Thangavelu (2014) lebih lanjut menyatakan bahwa dari 58 jenis tanaman yang diobservasi, hanya 9% yang dikolonisasi oleh cendawan DSE. Semua DSE yang berhasil diobservasi dari tanaman inang, kecuali *Marsilea polycarpa* juga dikolonisasi oleh cendawan mikoriza arbuskula.

Cendawan DSE dapat ditemukan hidup diberbagai tempat, mulai dari daerah tropis sampai daerah kutub dan pegunungan Alpen. Walaupun demikian, DSE umumnya hidup melimpah di hutan-hutan konifer. DSE merupakan kelompok cendawan heterogen yang fungsi dan ekologiannya tumpang tindih dengan cendawan tanah, cendawan saprofit, cendawan rizoplan, cendawan patogen (obligat atau fakultatif) serta cendawan mikoriza (Jumpponen & Trappe, 1998).

Keragaman DSE secara taksonomi tidak begitu banyak diketahui walaupun keberadaannya melimpah. Umumnya DSE tidak bersporulasi, atau bila bersporulasi, konidia yang dihasilkan sangat sedikit (Jumpponen & Trappe, 1998). Beberapa strain hanya dapat bersporulasi bila diberi stimulus temperatur rendah (Fernando & Currah, 1995).

Asosiasi DSE dengan tanaman inang berdasarkan performa dan kandungan nutrisi yang terdapat dalam jaringan tanaman inang bervariasi, yaitu interaksi negatif, positif dan netral. Bentuk asosiasi DSE dengan tanaman inang ditentukan oleh jenis DSE dan tanaman yang menjadi inangnya. Jenis DSE dan inang yang berbeda akan membentuk asosiasi yang berbeda pula. Selain itu bentuk asosiasi juga ditentukan oleh kondisi percobaan yang dilakukan (Jumpponen, 2001).

Sejauh ini belum ada laporan yang menyatakan bahwa akar *Shorea selanica* yang tergolong ke dalam famili Dipterocarpaceae dikolonisasi oleh DSE. Hal berbeda ditemukan dalam penelitian mengenai cendawan pelarut fosfat yang

melibatkan benih *S. selanica*. DSE dijumpai pada sebagian sistem perakaran *S. selanica* yang sedang diteliti. Oleh karena itu, dilakukan penelitian terpisah untuk mengetahui karakteristik DSE yang terdapat pada sistem perakaran *S. selanica* tersebut dan pengaruhnya terhadap tanaman inang.

METODE PENELITIAN

Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari sampai Maret 2011 di Laboratorium Mikologi, Departemen Biologi FMIPA IPB.

Bahan

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji *S. selanica*. Biji *S. selanica* diperoleh dari Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Bogor. Zeolit steril dipakai sebagai media tumbuh *S. selanica* dengan sumber nutrisi berupa Larutan Hoagland. Pewarna biru tripan 0.05% digunakan untuk analisis keberadaan DSE dalam akar tanaman.

Prosedur Penelitian

Penelitian dilakukan dalam beberapa tahapan sebagai berikut:

Pengumpulan dan Seleksi Biji *S. selanica*

Biji *S. selanica* diambil dari hutan koleksi Balai Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Bogor. Biji yang telah jatuh ke tanah dan tidak rusak dikumpulkan dan selanjutnya dibawa ke laboratorium Mikologi. Sebelum dilakukan analisis, biji diseleksi terlebih dahulu agar didapatkan biji yang memiliki ukuran relatif seragam, tingkat kematangan baik dan tidak cacat. Sebelum dikecambahkan, sayap biji *S. selanica* dihilangkan terlebih dahulu.

Perkecambahan dan Pemeliharaan

Perkecambahan biji *S. selanica* dilakukan pada media zeolit steril yang telah dicuci dalam wadah plastik. Sterilisasi permukaan biji dilakukan untuk menghilangkan kontaminan yang mungkin terdapat pada biji. Biji dicuci dengan air

mengalir selama kurang lebih 10 menit dan direndam dalam alkohol 70% selama 30 detik. Selanjutnya alkohol dihilangkan dengan membilas biji menggunakan air steril sebanyak 3-5 kali. Biji selanjutnya direndam dalam NaOCl 0.05% selama 5 menit dan dicuci kembali dengan air steril sebanyak 3-5 kali. Biji dikeringkan dengan tissue steril dan ditanam dalam zeolit. Untuk merangsang perkecambahan biji, permukaan wadah ditutup dengan aluminium foil selama 1 malam.

Masing-masing kecambah *S. selanica* yang telah berumur 2 minggu dipindahkan ke wadah baru untuk dipelihara selama kurang lebih 8 minggu. Jumlah kecambah yang dipelihara adalah 40 buah. Wadah pemeliharaan yang digunakan adalah gelas plastik ukuran besar (volume \pm 500 ml) dan diisi dengan zeolit steril sebagai media tumbuh. Larutan Hoagland digunakan sebagai sumber hara dan penyiraman dilakukan setiap dua hari sekali atau sesuai kebutuhan.

Analisis DSE pada Sistem Perakaran Benih *S. selanica*

Analisis DSE dilakukan dengan cara mewarnai akar *S. selanica* menggunakan larutan biru tripan 0.05%. Metode pewarnaan akar mengikuti prosedur Kormanick & McGraw (1982). Akar tanaman dipisahkan dari media dengan hati-hati agar sistem perakaran tidak rusak. Akar dicuci dengan air mengalir selama 10 menit untuk menghilangkan sisa media tanam dan setelah itu dipotong dengan ukuran 1 cm.

Akar direndam dalam larutan KOH 10% pada suhu 90°C selama 10-15 menit untuk menghilangkan isi sel. Apabila selama proses tersebut warna akar masih gelap, maka perendaman dapat diperpanjang sampai diperoleh akar yang transparan. KOH dibuang dan sisanya dihilangkan dengan membilas akar dengan akuades sebanyak 3-5 kali. Akar direndam dalam larutan HCL 1N selama 1 malam, selanjutnya diwarnai dengan pewarna biru tripan 0.05% selama 20-30 menit. Akar

yang telah diwarnai disimpan dalam larutan gliserol 50% dan diamati menggunakan mikroskop cahaya. Parameter yang diamati adalah jumlah benih yang mengandung DSE, persen kolonisasi dan morfologi DSE dalam sistem perakaran *S. selanica*.

Isolasi DSE dari Sistem Perakaran Benih *S. selanica*

Dark Septate Endophyte yang ditemukan pada akar *S. selanica* diisolasi menggunakan media *Malt Extract Agar* (MEA) dengan komposisi setengah dosis (50%). Akar yang diduga mengandung DSE dibersihkan dari sisa media tanam dengan cara dicuci menggunakan air mengalir selama kurang lebih 10 menit. Selanjutnya akar dipotong dengan ukuran kurang lebih 1 cm dan direndam dalam EtOH 70% selama dua menit. EtOH dibuang dan dilanjutkan dengan perendaman dalam larutan Chlorine 1% selama 2 menit. Akar dibilas sebanyak 2-3 kali dengan akuades steril, lalu dikeringkan dengan tissue steril selama 3-4 jam. Akar yang sudah steril dan kering ditanam di media MEA 50% dan diinkubasi pada suhu 30°C. Koloni cendawan yang lambat pertumbuhannya diduga sebagai DSE dan dimurnikan menggunakan media yang sama. Koloni DSE diamati secara mikroskopik menggunakan mikroskop cahaya.

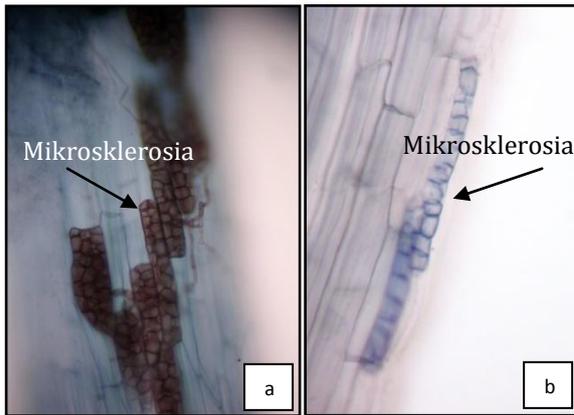
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Penelitian

Jumlah sel akar *S. selanica* yang mengandung DSE dalam setiap potongnya paling banyak 15 sel dan penyebarannya tidak merata. Persentase DSE dalam setiap benih adalah sebesar 85% (35 dari 40 buah benih membawa DSE). Kolonisasi DSE pada setiap benih bervariasi mulai dari 7.5-83.3% dengan rata-rata 28.2%.

Benih *S. selanica* yang membawa DSE dalam sistem perakarannya tidak memperlihatkan gejala sakit. Benih *S. selanica* tumbuh dengan baik dan bugur

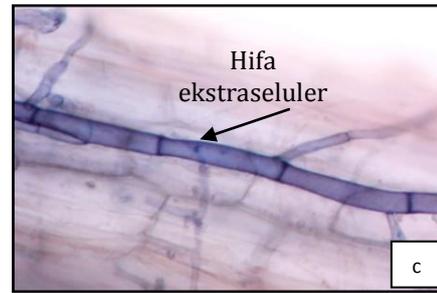
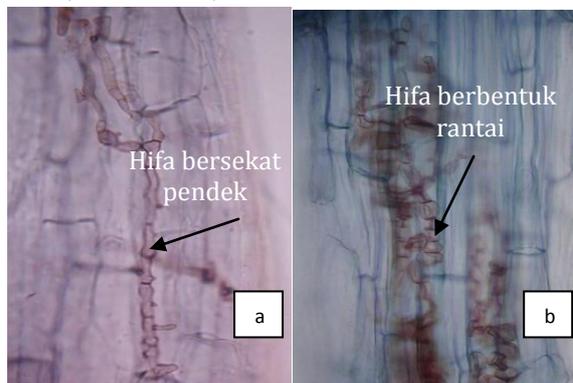
tanpa adanya kerusakan yang terlihat baik pada akar, batang dan daun benih.



Gambar 1. Struktur DSE pada Akar *S. selanica*, a) Mikrosklerosis Berwarna Coklat, b) Mikrosklerosis Berwarna Biru.

Pengamatan DSE secara mikroskopik memperlihatkan bahwa kebanyakan DSE dalam akar berbentuk mikrosklerosis yang memenuhi sel epidermis dan korteks akar. Mikrosklerosis yang ditemui ada dua jenis, yaitu mikrosklerosis berwarna coklat yang tidak menyerap pewarna biru tripan (Gambar 1a) dan mikrosklerosis berwarna biru yang menyerap pewarna biru tripan (Gambar 1b).

Variasi bentuk lain DSE dalam akar berupa hifa dengan sel-sel bersekat pendek dan bercabang (Gambar 2a) atau menyerupai rantai yang tumbuh secara interseluler, intra seluler ataupun di permukaan akar (Gambar 2b). Selain itu juga ditemui hifa dengan ukuran besar yang tumbuh menjalar di permukaan akar dengan percabangan masuk ke dalam sel akar (Gambar 2c).

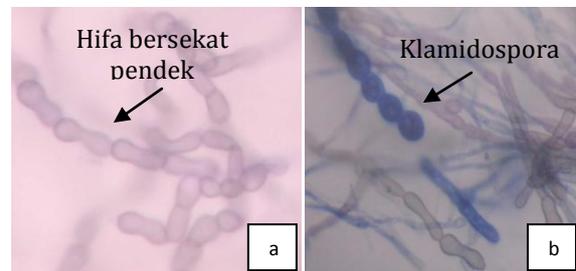


Gambar 2. Struktur hifa DSE pada Akar *S. Selanica*, a) Hifa Bersekat Pendek, b) Hifa Berbentuk Rantai, c) Hifa Berukuran Besar, Bercabang dan Menjalar Di Permukaan Akar.

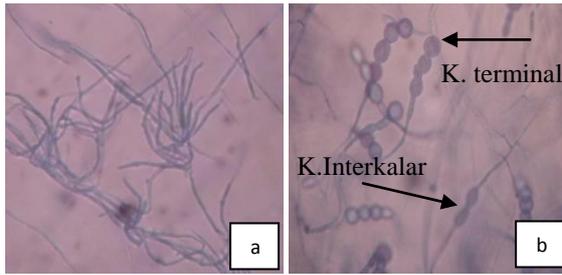


Gambar 3. Hasil isolasi DSE berumur 7 hari hasil isolasi dari akar *S. selanica* pada media *Malt Extract Agar* (MEA).

Dua jenis koloni DSE (putih dan hitam) berhasil diisolasi dari sistem perakaran benih *S. selanica* (Gambar 3). Pertumbuhan miselium DSE dengan warna koloni hitam jauh lebih lambat bila dibandingkan dengan DSE dengan warna koloni putih. Miselium DSE koloni warna hitam tidak selebat DSE warna putih.



Gambar 4. Pengamatan Mikroskopis DSE dengan Koloni Berwarna Hitam. a) Hifa Bersekat Pendek dan b) Klamidospora Inter Kalar.



Gambar 5. Pengamatan Mikroskopis DSE Dengan Koloni Berwarna Putih. a) Hifa Bercabang Banyak dan b) Klamidospora Interkalar dan Terminal. K=Klamidospora.

Pengamatan mikroskopik terhadap koloni DSE berwarna hitam memperlihatkan DSE memiliki hifa bersekat pendek menyerupai rantai dan bercabang. Beberapa klamidospora interkalar ditemukan pada koloni tersebut (Gambar 4a, b). Koloni berwarna putih memperlihatkan bahwa DSE tersebut memiliki hifa halus bercabang banyak. Klamidospora terminal dan interkalar dijumpai pada koloni yang sudah tua (Gambar 5a, b).

Pembahasan

Akar tanaman merupakan salah satu habitat alami berbagai mikroorganisme termasuk cendawan. Hubungan yang terbentuk antara tanaman dan cendawan dapat berupa interaksi positif, negatif atau netral (Atlas & Barta, 1998). Bentuk interaksi cendawan dengan tanaman inang dapat diketahui melalui pengamatan respon tanaman uji terhadap kolonisasi cendawan. Cendawan yang berinteraksi positif dengan tanaman inang biasanya disebut dengan cendawan mutualistik akar.

Cendawan mutualistik akar dapat dikategorikan dalam kelompok cendawan mikoriza dan non mikoriza. Cendawan mikoriza merupakan cendawan non patogen paling umum yang bersimbiosis dengan sekitar 80% akar tanaman berpembuluh (Smith & Read, 1997). Berbagai jenis cendawan lain termasuk cendawan endofit dapat berasosiasi dengan sistem perakaran tanaman membentuk

simbiosis mutualisme. Cendawan endofit dapat membantu tanaman inang dalam berbagai hal, diantaranya yaitu adaptasi di habitat yang kurang menguntungkan, perlindungan terhadap stress lingkungan baik biotik maupun abiotik, peningkatan pertumbuhan dan penyerapan nutrisi (Maciá-Vicente *et al.*, 2009). Salah satu cendawan endofit akar adalah cendawan DSE.

Morfologi dan karakteristik cendawan endofit yang ditemukan pada sistem perakaran *S. selanica* umumnya berupa mikrosklerosia yang tumbuh memenuhi sel-sel epidermis dan korteks akar. Selain itu, ditemukan juga hifa bersekat pendek atau menyerupai rantai termelanisasi yang tumbuh secara intraseluler, interseluler ataupun di permukaan akar. Karakteristik yang demikian sesuai dengan ciri-ciri cendawan DSE seperti yang dikemukakan oleh Jumpponen & Trappe (1998).

Dark Septate Endophyte ditemukan pada sebagian besar kecambah *S. selanica* yang diteliti (85% dari total kecambah membawa DSE), namun hanya sedikit sel akar yang terkolonisasi DSE pada setiap potongan akar yang diamati.

DSE yang terdapat pada sistem perakaran *S. selanica* tidak memperlihatkan pengaruh negatif. Hal ini dapat dilihat dari kebugaran dan pertumbuhan benih *S. selanica*. Selama 8 minggu pemeliharaan, benih *S. selanica* tidak menunjukkan tanda-tanda sakit atau adanya kerusakan jaringan. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa DSE merupakan cendawan non-patogen terhadap *S. selanica*. Hal ini sesuai dengan laporan Narisawa *et al.* (2000) yang menyatakan bahwa DSE yang diresintesis secara *in vitro* dapat hidup sebagai endofit dalam 19 jenis tanaman inang tanpa menyebabkan gangguan terhadap pertumbuhan tanaman inang.

Walaupun peranan DSE dalam akar tanaman *S. selanica* belum diketahui, tetapi kemungkinan besar cendawan ini dapat membantu pertumbuhan tanaman inang. Hal ini dimungkinkan karena DSE tidak

menyebabkan gejala sakit dan kerusakan tanaman *S. selanica*. Jumpponen *et al.* (1998) menyatakan bahwa DSE diduga berfungsi sebagai cendawan mutualistik yang berperan dalam pengambilan nutrisi dan air terutama dalam kondisi lingkungan tidak menguntungkan. Kolonisasi DSE bersamaan dengan cendawan mikoriza pada suatu tanaman inang diduga membuat DSE bertindak sebagai suatu sistem *back up* pada saat pertumbuhan cendawan mikoriza terhambat oleh kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan.

Penjelasan lain dikemukakan oleh Scervino *et al.* (2009) yang menyatakan bahwa eksudat DSE (*Dreschlera* sp.) dapat meningkatkan percabangan dan panjang hifa cendawan mikoriza *Gigaspora rosea*. Jumpponen *et al.* (1998) menumbuhkan benih *Pinus contorta* di tanah *glasier* dengan kondisi kandungan nitrogen (N) rendah. Mereka menyatakan bahwa inokulasi DSE *Phialocephala fortinii* dapat meningkatkan konsentrasi P pada daun dan apabila inokulasi DSE dikombinasikan dengan penambahan N, maka biomassa *P. contorta* meningkat sebesar 50%.

Haselwandter & Read (1982) juga menyatakan bahwa inokulasi dua jenis DSE dapat meningkatkan kandungan P pada daun benih *Carex firma* dan *C. sempervirens*. Inokulasi kedua jenis DSE tersebut hanya dapat merangsang pertumbuhan *C. firma*. Usuki & Narisawa (2007) menyatakan bahwa DSE dapat bertindak sebagai cendawan mikoriza melalui transfer nutrisi dua arah secara *in vitro*.

DSE yang ditemukan pada benih *S. selanica* kemungkinan besar berasal dari cendawan tular benih (*seed borne fungi*) atau cendawan kontaminan yang masuk ke dalam biji pada saat biji jatuh ke tanah. Hal ini dapat dimungkinkan karena biji yang diambil adalah biji yang sudah jatuh ke tanah, bukan biji yang masih menempel pada pohonnya. Walaupun keberadaan DSE dalam sistem perakaran benih *S. selanica* tidak menimbulkan gejala sakit selama delapan minggu pemeliharaan,

namun bagaimana simbiosis tersebut berjalan dan apa peranan DSE terhadap tanaman inang perlu dikaji secara lebih mendalam.

KESIMPULAN

Karakteristik DSE yang ditemukan pada sistem perakaran *S. selanica* berupa mikrosklerosia yang tumbuh memenuhi sel-sel epidermis dan korteks akar. Selain itu ditemukan juga hifa interseluler, hifa intraseluler ataupun hifa ekstraseluler yang mengalami melanisasi. DSE tidak menyebabkan gejala sakit pada benih *S. selanica* sehingga kemungkinan besar DSE ini merupakan cendawan mutualistik akar.

DAFTAR PUSTAKA

- Atlas RM & Bartha R. 1998. **Mycrobial Ecology Fundamental and Application**. Fourth Edition. New York: Benjamin Cumming.
- Fernando AA, Currah RS. 1995. **Leptodontidium orchidicola: (Myceli-um Radicis Atrovirens complex): aspects of its conidiogenesis and ecology**. *Mycotaxon* 54:287-294.
- Haselwandter K, Read DJ. 1982. **The significance of root fungus association in two Carex species of high-alpine plant communities**. *Oecologia* 53:352-354.
- Jumpponen A, Mattson KG, Trappe JM. 1998. **Mycorrhizal Functioning of Phialocephala Fortinii : Interactions With Soil Nitrogen and Organic Matter**. *Mycorrhiza* 7: 261-265.
- Jumpponen A, Trappe JM. 1998. **Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root colonizing fungi**. *New Phytol* 140:295-310.
- Jumpponen A. 2001. **Dark septate endophytes – are they mycorrhizal**. *Mycorrhiza* 11:207-211.
- Kormanick PP, McGraw AC. 1982. **Quantification of Vesicular-**
- Dezi Handayani

- Arbuscular Mycorrhiza in Plant Roots.** St Paulus: The American Phytopathology Society.
- Maciá-Vicente JG, Hans-Börje J, Lopez-Llorca LV. 2009. **Assesing Fungal Root Colonization For Plant Improvement.** *Plant Signal Behav* 4(5):445-447.
- Narisawa K, Ohki T, Hashiba T. 2000. **Suppression of clubroot and Verticillium yellows in Chinese cabbage in the field by the root endophytic fungus, Heteroconium chaetospira.** *Plant Pathol.* 49:141–146.
- Scervino JM, Gottlieb A, Silvani VA, Pégola M, Fernández L, Godeas AM. 2009. **Exudates of dark septate endophyte (DSE) modulate the development of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) *Gigaspora rosea*.** Komunikasi singkat. *Soil Bio Biochem* 41:1753-1756.
- Seerangan K & Thangavelu M. 2014. **Arbuscular mycorrhizal and dark septate endophyte fungal associations in South Indian Aquatic and Wetland macrophytes.** *J. Botany.* 2014. Hindawi Publishing Corporation
- Smith SE & Read DJ. 1997. **Mycorrhizal symbiosis.** San Diego, CA, USA: Academic Press.
- Usuki F, Narisawa K. 2007. **A mutualistic symbiosis between a dark septate endophytic fungus, Heteroconium chaetospira, and a nonmycorrhizal plant, Chinese cabbage.** *Mycologia* 99(2):175-184.
- Zhang H, Tang M, Chen H, Wang Y and Ban Y. 2010. **Arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes colonization status in medicinal plant *Lycium barbarum* L. in arid Northwestern China.** *African Journal of Microbiology Research* 4(18): 1914-1920.