

Biological Agent *Trichoderma asperellum* and Its in Vitro Inhibitory Activity Against Mango Fruit Rot Pathogens

Gilang Vaza Benatar^{1*}, Yeyet Nurhayati², Umi Kulsum³

¹Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi, Tasikmalaya, Indonesia;

²Magister Fitopatologi, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia;

³Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan, Subang, Indonesia;

Article History

Received : March 12th, 2023

Revised : April 20th, 2023

Accepted : May 20th, 2023

*Corresponding Author:

Gilang Vaza Benatar,

Program Studi Agroteknologi,
Fakultas Pertanian, Universitas
Siliwangi, Tasikmalaya,
Indonesia;

Email: benatargv@unsil.ac.id

Abstract: Diseases are one of the major challenges in crop production which can lead to significant economic losses. Ironically, while having multiple negative impacts, synthetic chemical pesticides are considered the main strategy in tackling plant diseases. *Trichoderma asperellum* is one of the potential fungal species that can inhibit numerous plant diseases. This study reconfirmed the morphological characteristics of *Trichoderma* isolates obtained and identified it by molecular techniques. In addition, the inhibitory activity of the isolates was tested in vitro against the mango pathogens *Colletotrichum asianum* and *Diaporthe pseudophoenicicola*. The results showed that isolate T4 was identified as *Trichoderma asperellum*. Isolate T4 was able to inhibit *C. asianum* and *D. pseudophoenicicola* by 28.19% and 15.64%, respectively. Therefore, this isolate can be used as a biological agent to control plant pathogens in an environmentally friendly, sustainable manner, and as an alternative to synthetic chemical pesticides.

Keywords: dual culture, morphology, molecular technique, plant disease.

Pendahuluan

Penyakit yang disebabkan oleh patogen menjadi masalah utama dalam budidaya tanaman. Penyakit dapat menyebabkan kerusakan pada tanaman dan mengakibatkan kerugian ekonomi yang signifikan (Liu *et al.*, 2021). Penggunaan pestisida kimia sintetis selama ini dijadikan strategi paling umum untuk mengendalikan penyakit tanaman. Namun, distribusi bahan kimia yang berlebihan dalam jangka panjang berdampak negatif bagi lingkungan dan kesehatan manusia (Tilocca *et al.*, 2020).

Penggunaan mikroorganisme sebagai agensia hayati saat ini menjadi pendekatan alternatif yang menjanjikan, ramah lingkungan, dan berkelanjutan untuk menggantikan pestisida kimia sintetis dalam pengendalian penyakit tanaman. Agensia hayati memiliki kemampuan untuk mendorong pertumbuhan tanaman dan menginduksi mekanisme resistensi pada tanaman terhadap patogen. Selain itu, agensia hayati mampu mencegah kolonisasi patogen secara

langsung (He *et al.*, 2021; Pandit *et al.*, 2022).

Cendawan adalah kelompok mikroorganisme yang digunakan sebagai agensia hayati untuk menekan patogen penyebab penyakit tanaman. Salah satu genus cendawan yang paling umum digunakan sebagai agensia hayati adalah *Trichoderma*. Mekanisme yang digunakan oleh *Trichoderma* dalam mengendalikan penyakit tanaman meliputi aktivitas mikoparasitisme, produksi antibiotik dan/atau enzim hidrolitik, persaingan nutrisi, dan ketahanan tanaman yang diinduksi (Ferreira & Musumeci, 2021; Khalid, 2017).

Trichoderma asperellum merupakan spesies cendawan potensial yang dapat menekan berbagai penyakit tanaman. Spesies ini, menurut Wang *et al.*, (2021), diketahui efektif menekan *Fusarium proliferatum* f. sp. *malus domestica*, patogen penyebab penyakit apel. Selain melalui aktivitas enzim protease, amilase, selulase, dan lakase, penghambatan terhadap patogen ini diperankan oleh zat volatil yang menyebabkan hifa patogen menyusut, membengkak, dan pecah. Penelitian Zhang *et al.*,

(2021) menunjukkan efektivitas penghambatan *T. asperellum* terhadap *Fusarium oxysporum*, patogen penyebab penyakit layu kacang tunggak. *T. asperellum* menunjukkan hiperparasitisme terhadap *F. oxysporum* dan dapat menembus serta mengelilingi hifa patogen.

Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan telah mengisolasi *Trichoderma* sp. dari rhizosfer padi. Isolat yang diperoleh memiliki kesamaan karakteristik morfologi dengan *T. asperellum*. Namun demikian, spesiesnya belum teridentifikasi secara spesifik. Karenanya, karakterisasi morfologi yang telah dilakukan perlu didukung dengan identifikasi secara molekuler. Metode tradisional identifikasi cendawan yang hanya berdasarkan karakteristik morfologi memiliki bias yang tinggi untuk menentukan spesies (Katoch & Kapoor, 2014). Teknik molekuler, seperti metode berbasis DNA, dapat digunakan sebagai pendukung karena lebih cepat, spesifik, dan akurat.

Penelitian ini mengkonfirmasi ulang karakteristik morfologi isolat *Trichoderma* yang diperoleh sekaligus mengidentifikasinya dengan teknik molekuler. Selain itu, aktivitas penghambatan isolat diuji secara *in vitro* terhadap patogen *Colletotrichum asianum* (penyebab penyakit antraknosa mangga) dan *Diaporthe pseudophoenicicola* (penyebab penyakit busuk pangkal buah mangga). Penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi alternatif pengendalian patogen penyebab penyakit mangga maupun komoditas lain dalam rangka menekan penggunaan pestisida kimia sintetis.

Bahan dan Metode

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas

Pertanian, Universitas Gadjah Mada, dan Fakultas Pertanian, Universitas Siliwangi. Penelitian dilaksanakan pada April 2021 hingga Juni 2022.

Persiapan Isolat *Trichoderma* dan patogen

Isolat agensia hayati *Trichoderma* sp. (selanjutnya disebut T4) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tumbuhan. Adapun patogen *Colletotrichum asianum* dan *Diaporthe pseudophoenicicola* merupakan koleksi Laboratorium Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, yang sebelumnya diisolasi dari buah mangga asal Indramayu. Isolat agensia hayati dan patogen kemudian diremajakan kembali pada medium agar dekstroza kentang (PDA) dan diinkubasi pada suhu 28°C untuk analisis lebih lanjut.

Karakterisasi morfologi *Trichoderma*

Karakterisasi morfologi *Trichoderma* sp. makroskopis seperti ciri koloni aerial, ciri koloni reverse, dan rerata laju pertumbuhan (pertambahan diameter koloni setiap hari) diamati dan diukur menggunakan pengamatan langsung, sedangkan morfologi mikroskopis meliputi ciri konidia, fialid, dan hifa diamati menggunakan mikroskop cahaya Olympus CKX53. Karakteristik morfologi yang diperoleh dibandingkan berdasarkan ciri-ciri genus *Trichoderma* (Nurhayati *et al.*, 2021; Siddiquee, 2017).

Ekstraksi, amplifikasi, dan sekuensing DNA *Trichoderma*

Ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan standar protokol Genomic DNA Mini Kit (plant). DNA yang diperoleh dianalisis lebih lanjut terhadap wilayah parsial ITS rDNA dengan mengamplifikasi sekuen menggunakan sepasang primer ITS1 dan ITS4 (Bruns *et al.*, 1990).

Tabel 1. Isolat *ex-type* yang digunakan untuk konstruksi filogenetik

Spesies <i>ex-type</i>	Isolat	Sumber Isolat	Negara Asal	Nomor Aksesi
<i>T. asperellum</i>	Tasum66	Tanah	China	MT102403
<i>T. asperellum</i>	Tasp5	Tanah	Meksiko	MN639282
<i>T. asperellum</i>	Soil	Tanah	India	MG786721
<i>T. asperellum</i>	T2	Tanah	India	MK210562
<i>T. asperellum</i>	TR4	Tanah	India	MH383523
<i>T. koningii</i>	FSpS04	Tanah	India	OP810882
<i>T. koningii</i>	134	Unknown	India	MH588231

<i>T. harzianum</i>	kt3	Unknown	India	OP477040
<i>Rizhoctonia solani</i>	RTN-2	Barnyard millet	India	ON974839

DNA diamplifikasi menggunakan mesin *thermal cycler* Biorad dengan komposisi total campuran PCR 25 μ l (terdiri dari 1 μ l primer, 1 μ l templat DNA, 12,5 μ l My Taq HS Red Mix, dan 9,5 μ l milli Q water. Reaksi polimerasi berantai (PCR) yang dilakukan mengikuti standar protokol MyTaq HS Red Mix di mana temperatur *annealing* yang diaplikasikan adalah 55°C. Produk PCR kemudian dikonfirmasi melalui elektroforesis gel agarosa 1% (w/v) pada tegangan 100 volt selama 25 menit dan divisualisasi di bawah UV transilluminator. Produk PCR yang terkonfirmasi kemudian disekuensing di LPPT UGM dengan metode Sanger. Sekuen DNA yang diperoleh dibandingkan dengan sekuen *ex-type* dari basis data GenBank pada situs www.ncbi.nlm.nih.gov, lalu analisis dan dekonstruksi filogenetiknya (menggunakan metode ClustalW, Maximum Likelihood, dan 1000 kali bootstrap) menggunakan software MEGA-XI. Sekuen *Rizhoctonia solani* RTN-2 digunakan sebagai *outgroup*. Sekuen isolat *Trichoderma* sp. diunggah ke GenBank untuk memperoleh nomor akses.

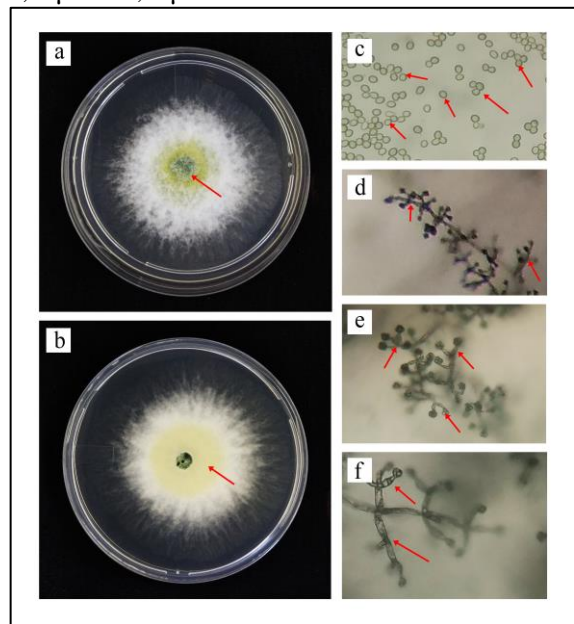
Uji daya hambat secara *in vitro*

Uji daya hambat secara *in vitro* dilakukan dengan metode kultur ganda. Isolat *Trichoderma* dikultur secara berlawanan dengan masing-masing patogen busuk buah mangga (*C. asianum* dan *D. pseudophoenicicola*) dengan diameter cakram kultur 5 mm dan umur kultur 5 hari pada medium PDA. Masing-masing isolat ditempatkan pada jarak 2 cm dari ujung cawan Petri. Cakram PDA dengan hanya berisi kultur patogen digunakan sebagai kontrol. Setiap percobaan diulang sebanyak empat kali dan diinkubasi pada 28°C selama 4 hari (Nurhayati *et al.*, 2021). Persentase penghambatan *Trichoderma* dihitung menggunakan formula $PP = [(R1 - R2)/R1] \times 100\%$ (PP: persentase penghambatan; R1: diameter koloni patogen kontrol di hari ke empat; R2: diameter koloni patogen yang diberi perlakuan di hari ke empat).

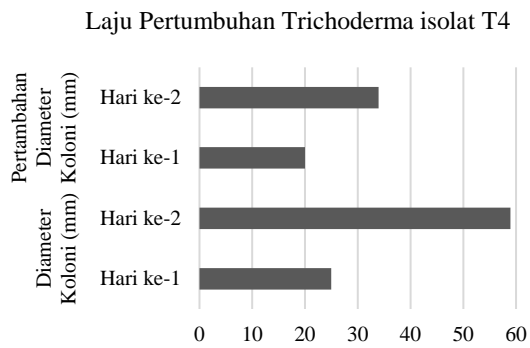
Hasil dan Pembahasan

Karakteristik Morfologi

Pengamatan morfologi menunjukkan karakteristik makroskopis isolat T4 yaitu koloni putih kehijauan yang berubah menjadi hijau gelap seiring umur koloni (Gambar 1a), dan laju pertumbuhan koloni 19,97 hingga 33,98 mm per hari (Gambar 2). Adapun karakteristik mikroskopis isolat ini berupa hifa bersepta (Gambar 1f), percabangan teratur seperti piramida yang terbentuk oleh struktur konidiofor dan fialid (Gambar 1d-f), serta konidia kehijauan berbentuk bulat atau *globose* (Gambar 1c). Karakteristik morfologi ini sesuai dengan ciri *T. asperellum* menurut Nurhayati *et al.*, (2021) di mana koloni hijau tua mendekati usia tua, rerata pertumbuhan koloni 34,43 mm/hari, hifa bersepta, konidiofor piramidal dengan fialid bercabang, dan konidia bulat. Hal ini juga sesuai menurut Thavaprakasapandian *et al.* (2016) bahwa *T. asperellum* memiliki percabangan teratur yang terbentuk antara konidiofor dan fialid tegak lurus, serta konidia *globose* hingga sub-*globose* berukuran 2,91 μ m x 2,37 μ m.



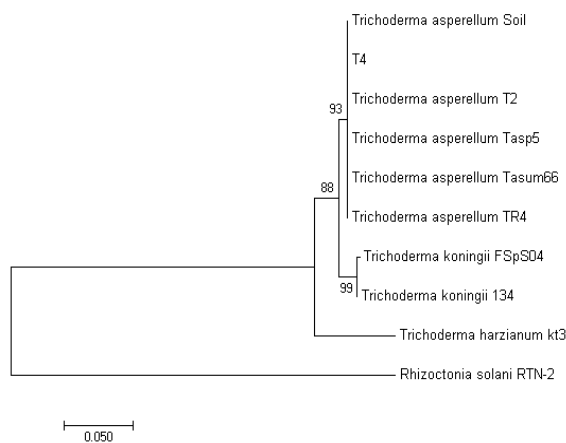
Gambar 1. Karakteristik morfologi *Trichoderma* isolat T4: a) koloni *aerial*; b) koloni *reverse*; c) konidia (perbesaran 400x); d-f) konidiofor dan fialid (berturut-turut pada perbesaran mikroskop 100x, 400x, dan 600x).



Gambar 2. Laju pertumbuhan *Trichoderma* isolat T4 berdasarkan pertambahan diameter koloni harian.

Identifikasi molekuler

Identifikasi molekuler berdasarkan sekuen parsial rDNA wilayah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagaimana yang ditunjukkan pada Gambar 3. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat T4 berkerabat dekat dengan *T. asperellum* isolat Soil, T2, Tasp5, Tasum66, dan TR4, yang diisolasi dari tanah. Sekuen isolat T4 yang terkonfirmasi sebagai *T. asperellum* dideposit pada GenBank dengan nomor aksesori OQ165110.



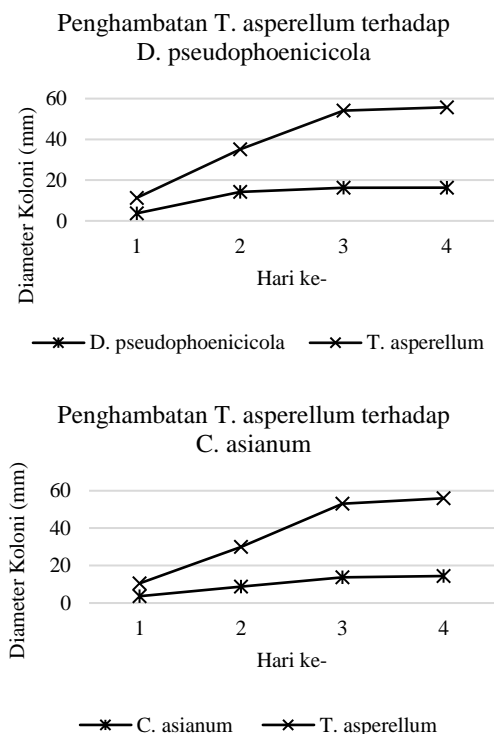
Gambar 3. Pohon filogenetik berdasarkan ITS rDNA. Nilai bootstrap lebih dari 90% dengan *Maximum Likelihood* dan bootstrap 1000 kali ditunjukkan pada *node* sampel T4. *Rhizoctonia solani* merupakan *outgroup*. Skala bar merupakan substitusi setiap posisi nukleotida.

Studi validasi yang melibatkan 74 isolat jamur penanda ITS menunjukkan akurasi yang tinggi, dengan kesesuaian 100% pada identifikasi tingkat genus dan kesesuaian 89,2% pada tingkat spesies (Salem-Bango *et al.*, 2023). Hasil kajian yang dilakukan oleh Ismaiel *et al.*, (2022), identifikasi molekuler berbasis penanda wilayah

ITS (*Internal Transcribed Spacer*) rDNA telah membedakan antara isolat *Trichoderma* yang memiliki identitas 98,6% hingga 100% dengan dua spesies *Trichoderma*: *T. asperellum* dan *T. longibrachiatum*.

Uji daya hambat *in vitro*

Penghambatan *T. asperellum* isolat T4 pada uji *in vitro* kultur ganda ditunjukkan oleh pertambahan diameter koloni yang lebih cepat dibandingkan dengan koloni patogen (Gambar 4). Pertumbuhan koloni isolat T4 nampak lebih cepat menginvasi medium PDA sehingga pertumbuhan koloni patogen terhambat (Gambar 5). Berdasarkan pengukuran yang diperoleh sebagaimana yang tertera pada Tabel 2, isolat T4 mampu menghambat pertumbuhan *C. asianum* sebesar 28,19%, sedangkan pertumbuhan *D. pseudophoenicicola* terhambat sebesar 15,64%. Ini membuktikan bahwa *T. asperellum* berpotensi digunakan sebagai agensia hayati pengendali penyakit antraknosa dan busuk pangkal buah mangga yang disebabkan oleh *C. asianum* dan *D. pseudophoenicicola*.



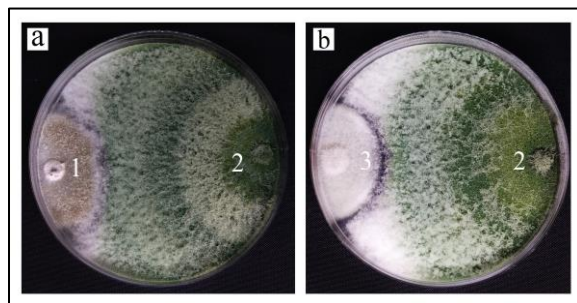
Gambar 4. Penghambatan *T. asperellum* isolat T4 terhadap *C. asianum* dan *D. pseudophoenicicola* berdasarkan pertambahan diameter koloni pada uji kultur ganda

Trichoderma memiliki berbagai mekanisme untuk menghambat pertumbuhan patogen tanaman seperti mikoparasitisme, produksi antibiotik dan/atau enzim hidrolitik, persaingan nutrisi, dan induksi ketahanan tanaman. *Trichoderma* juga dapat menghasilkan metabolit antifungi yang secara langsung menghambat pertumbuhan beberapa patogen tanaman. Strain *Trichoderma* tertentu mampu mengenali keberadaan senyawa volatil patogen dan meningkatkan jumlah atau aktivitas metabolit antijamur yang disekresikan sebagai respons kesiapan untuk menyerang patogen. Selain itu, *Trichoderma* memproduksi metabolit yang mudah menguap dan filtrat kultur yang bersifat antifungi (Anees *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Mukhopadhyay & Kumar, 2020). *T. asperellum* diketahui mampu menekan *Rizhoctonia solani* penyebab penyakit busuk pelepah padi 64,23% pada uji kultur ganda (Nurhayati *et al.*, 2021). Studi *in vitro* lainnya menunjukkan bahwa *T. asperellum* mampu menghambat pertumbuhan miselium patogen *Ralstonia solanacearum* penyebab layu bakteri terung dalam uji kultur ganda (Islam *et al.*, 2021).

Tabel 2. Persentase penghambatan *T. asperellum* terhadap *C. asianum* dan *D. pseudophoenicicola*

<i>C. asianum</i>		
R1 (mm)	R2 (mm)	PP (%)
22,7	16,3	28,19
<i>D. pseudophoenicicola</i>		
R1 (mm)	R2 (mm)	PP (%)
17,1	14,425	15,64

Keterangan: PP = persentase penghambatan; R1 = diameter koloni patogen kontrol di hari ke empat; R2 = diameter koloni patogen yang diberi perlakuan di hari ke empat.



Gambar 5. Penghambatan *T. asperellum* isolat T4 terhadap dan *D. pseudophoenicicola* (a) dan *C. asianum* (b). Keterangan: 1) *D. pseudophoenicicola*; 2) *T. asperellum* isolat T4; dan 3) *C. asianum*.

Kesimpulan

Isolat T4 dalam penelitian ini teridentifikasi sebagai *Trichoderma asperellum* berdasarkan karakteristik morfologi makroskopis dan mikroskopis, serta identifikasi molekuler dengan penanda ITS rDNA. Secara *in vitro*, isolat T4 mampu menghambat *Colletotrichum asianum* penyebab antraknosa mangga dan *Diaporthe pseudophoenicicola* penyebab busuk pangkal buah mangga berturut-turut sebesar 28,19% dan 15,64%. Isolat T4 dapat digunakan sebagai agensia hayati pengendali patogen tanaman yang ramah lingkungan, berkelanjutan, dan menjadi alternatif pengganti pestisida kimia sintesis.

Ucapan Terima Kasih

Penulis menghaturkan banyak terimakasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan (LPDP) Republik Indonesia yang telah memfasilitasi penelitian ini melalui Beasiswa Afiriasi Prestasi Nasional-Internasional.

Referensi

- Anees, M., Azim, R., Ur Rehman, S., Jamil, M., El Hendawy, S. E., & Al-Suhaiban, N. A. (2018). Antifungal potential of *Trichoderma* strains originated from north western regions of Pakistan against the plant pathogens. *Pakistan Journal of Botany*, 50(5), 2031–2040.
- Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. May 2014.
- Ferreira, F. V., & Musumeci, M. A. (2021). *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7>
- He, D. C., He, M. H., Amalin, D. M., Liu, W., Alwindia, D. G., & Zhan, J. (2021). Biological control of plant diseases: An evolutionary and eco-economic consideration. *Pathogens*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/pathogens1010131>

- 1
- Islam, S., Siddique, S., Chowdhury, M., & Mishu, N. (2021). Inhibitory Effect of *Trichoderma asperellum* Isolate against *Ralstonia solanacearum* Causing Brinjal Wilt. *Annals of Bangladesh Agriculture*, 24(2), 107–120. <https://doi.org/10.3329/aba.v24i2.55788>
- Ismaiel, M. H., El Zanaty, A. M., & Abdel-Lateif, K. S. (2022). Molecular and Morphological Identification of *Trichoderma* Isolates From Egyptian Agriculture Wastes-Rich Soil. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 54(3), 598–607. <https://doi.org/10.54910/sabrao2022.54.3.12>
- Katoch, A., & Kapoor, P. (2014). Recent Concepts in Fungal Taxonomy: A Review. *Research & Reviews: Journal of Agriculture and Allied Sciences*, 3(2), 23–35. <http://www.rroj.com/open-access/recent-concepts-in-fungal-taxonomy-a-review.php?aid=33856>
- Khalid, S. A. (2017). *Trichoderma* as biological control weapon against soil borne plant pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 16(50), 2299–2306. <https://doi.org/10.5897/ajb2017.16270>
- Li, N., Alfiky, A., Wang, W., & Nourollahi, K. (2018). *Volatile Compound-Mediated Recognition and Inhibition Between Trichoderma Biocontrol Agents and Fusarium oxysporum*. 9(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02614>
- Liu, X., Min, W., Mei, S., Wang, L., & Jiang, S. (2021). Plant Disease Recognition: A Large-Scale Benchmark Dataset and a Visual Region and Loss Reweighting Approach. *IEEE Transactions on Image Processing*, 30, 2003–2015. <https://doi.org/10.1109/TIP.2021.3049334>
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00333-x>
- Nurhayati, Y., Suryanti, S., & Wibowo, A. (2021). In Vitro Evaluation of *Trichoderma asperellum* Isolate UGM-LHAF against *Rhizoctonia solani* Causing Sheath Blight Disease of Rice. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 25(1), 64. <https://doi.org/10.22146/jpti.65290>
- Pandit, M. A., Kumar, J., Gulati, S., Bhandari, N., Mehta, P., Katyial, R., Rawat, C. D., Mishra, V., & Kaur, J. (2022). Major Biological Control Strategies for Plant Pathogens. *Pathogens*, 11(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020273>
- Salem-Bango, Z., Price, T. K., Chan, J. L., Chandrasekaran, S., Garner, O. B., & Yang, S. (2023). Fungal Whole-Genome Sequencing for Species Identification: From Test Development to Clinical Utilization. *Journal of Fungi*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/jof9020183>
- Siddiquee, S. (2017). *Practical Handbook of the Biology and Molecular Diversity of Trichoderma Species from Tropical Regions*, *Fungal Biology*.
- Thavaprakasapandian, R., Raja, M., Kumar, A., & Sharma, P. (2016). Morphological and molecular characterization of *Trichoderma asperellum* strain Ta13. *Indian Phytopathology*, 69(3), 298–303.
- Tilocca, B., Cao, A., & Migheli, Q. (2020). Scent of a Killer: Microbial Volatilome and Its Role in the Biological Control of Plant Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(February). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00041>
- Wang, H., Zhang, R., Duan, Y., Jiang, W., Chen, X., Shen, X., Yin, C., & Mao, Z. (2021). The endophytic strain *trichoderma asperellum* 6s-2: An efficient biocontrol agent against apple replant disease in china and a potential plant-growth-promoting fungus. *Journal of Fungi*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/jof7121050>
- Zhang, C., Wang, W., Xue, M., Liu, Z., Zhang, Q., Hou, J., Xing, M., Wang, R., & Liu, T. (2021). The combination of a biocontrol agent *trichoderma asperellum* sc012 and hymexazol reduces the effective fungicide dose to control *fusarium* wilt in cowpea. *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/jof7090685>