

Analisis Isozim dan Patogenisitas Isolat *Cladosporium* spp. Terhadap Karat Putih Pada Krisan (*Isozyme Analysis and Pathogenicity of Cladosporium* spp. Isolate Against White Rust on Chrysanthemum)

Evi Silvia Yusuf dan I Djabatnik

Balai Penelitian Tanaman Hias, Jl. Raya Ciharang, Segunung, Pacet, Cianjur, Jawa Barat, Indonesia 43253
Email: evinugraha99@yahoo.com

Diterima: 2 April 2018; revisi: 16 Juli 2018; disetujui: 1 Agustus 2018

ABSTRAK. *Cladosporium* spp. merupakan mikoparasit potensial untuk mengendalikan beberapa jenis cendawan karat. Penelitian bertujuan untuk mengetahui patogenisitas 10 isolat *Cladosporium* spp. yang ditemukan di daerah sentra krisan (Kabupaten Cianjur dan Bandung Barat) terhadap penyakit karat putih pada krisan dan hubungan kekerabatannya antara isolat *Cladosporium* spp. Percobaan dilakukan pada bulan April hingga Agustus 2014 di Laboratorium Mikologi Balai Penelitian Tanaman Hias (Balithi) dan Laboratorium Patologi dan Silviculture, Fakultas Kehutanan, Institut Pertanian Bogor. Pada percobaan ini dilakukan uji patogenisitas 10 isolat *Cladosporium* spp. asal Kabupaten Cianjur dan Bandung Barat terhadap pustul karat pada daun krisan di laboratorium. Untuk menelusuri hubungan genetik antarisolat dilakukan analisis isozim secara elektroforesis dengan menggunakan enzim esterase (EST), acid phosphatase (ACP), dan peroksidase (PER). Hasil percobaan menunjukkan sembilan isolat *Cladosporium* spp. efektif memparasit pustul karat dengan efektivitas lebih dari 50%. Hasil analisis isozim menunjukkan terdapat dua kelompok *Cladosporium* spp. yang memiliki koefisien kemiripan 67%.

Kata kunci: *Cladosporium* spp.; Isozim; Mikoparasit; Patogenisitas

ABSTRACT. *Cladosporium* spp. is a potential mycoparasite for controlling some rust fungi. The aim of the research was to obtain the effectiveness of 10 *Cladosporium* spp. isolates was found in chrysanthemum central area (Cianjur and West Bandung District) and genetic relationship among the isolates. The research carried on April to August 2014 in Micology Laboratory Indonesian Ornamental Crop Institute and Pathology and Silviculture Laboratory, Faculty of Forestry, Bogor Agricultural University. Pathogenicity of the 10 fungus isolate was tested against rust pustules on chrysanthemum leaves and genetic relationship between isolates was analyzed by electrophoresis isozyme using EST, ACP, and PER enzyme. The results showed that nine of *Cladosporium* spp. isolates were effective parasitised rust pustule with more than 50% effectiveness. The cluster analysis based on isozyme analysis showed that *Cladosporium* spp. isolate have two distinct groups with 67% similarity coefficient.

Keywords: *Cladosporium* spp.; Isozyme; Mycoparasite; Pathogenicity

Cladosporium spp. merupakan cendawan yang umum ditemukan di banyak tempat, sporanya ditemukan di udara, tanah, dan air. Cendawan tersebut bersifat *cosmopolitan*, yaitu dapat hidup dengan menjadi parasit pada manusia dan berbagai tanaman atau pada cendawan (mikoparasit) dan serangga (entomopatogen) (Dugan & Glawe 2006; Eken & Hayat 2009; Kumar *et al.* 2009; Bensch *et al.* 2010; Bahar *et al.* 2011; Ogórek *et al.* 2012; Bensch *et al.* 2015). *Cladosporium* pertama kali ditemukan oleh Link pada tahun 1816, saat ini cendawan tersebut sudah memiliki lebih dari 700 spesies (Paul, Diby & Park 2013). Beberapa spesies *Cladosporium* diketahui mendapatkan nutrisi dengan menjadi parasit (mikoparasit) pada berbagai jenis cendawan karat seperti *Puccinia horiana*, *P. striiformis* f. sp. *tritici*, *P. recondita*, dan *Cronartium quercuum* (Zhan *et al.* 2007; Baiswar, Chandra & Kumar 2008; Dolińska, Bartkowska & Schollenberger 2011). Sebagai cendawan

endofitik, *Cladosporium* spp. ditemukan hidup di jaringan daun dan perakaran tanaman (Doolotkeldieva & Bobusheva 2014). Mikoparasit *Cladosporium* memiliki banyak spesies, di antaranya adalah *C. tenuissimum*, *C. oxysporum*, *C. cladosporioides*, *C. uredinicola*, *C. aecidicola*, *C. sphaerospermum* (Zhan *et al.* 2007; Siddiquee, Tan & Yusof 2010; Dolińska, Bartkowska & Schollenberger 2011; Paul, Diby & Park 2013). Silvia *et al.* (2014) melaporkan bahwa *Cladosporium* banyak ditemukan memparasit karat krisan di Kabupaten Cianjur dan Kabupaten Bandung Barat. Setelah dilakukan pengujian, dihasilkan 10 isolat mikoparasit *Cladosporium* yang potensial untuk mengendalikan penyakit karat pada krisan. Kesepuluh isolat tersebut memiliki parasitasi yang bervariasi dalam menekan pertumbuhan karat, yaitu berkisar antara 30-100%.

Hubungan genetik isolat-isolat *Cladosporium* spp. yang ditemukan di sentra produksi krisan di Jawa

Barat belum pernah dilaporkan. Salah satu metode untuk menelusuri hubungan genetik antarisolat adalah analisis isozim secara elektroforesis dengan media *starch gel* (Micales, Bonde & Peterson 1986) atau *polyacrylamide gel* (Chin, Kim & Park 1993). Teknik isozim merupakan metode analisis penanda molekuler yang potensial untuk menganalisis keragaman genetik suatu mikroorganisme. Teknik tersebut telah banyak digunakan pada spesies tumbuhan dan mikroorganisme karena hasilnya cepat dan biayanya relatif murah (Szekeres *et al.* 2006; Achmad, Herliyana & Agustian 2009). Teknik tersebut pernah digunakan untuk membedakan beberapa isolat *Trichoderma*, *Ganoderma*, *Fusarium*, *Phytophthora*, dan *Rhizoctonia* (Miller *et al.* 1995; Szekeres *et al.* 2006; Veld, Govers & Meijer 2007; Siddiquee, Tan & Yusof 2010; Pawar & Mane 2014; Silvia *et al.* 2016; Mahmoud, Gaffar & Mubarak 2017). Isozim ialah enzim yang berada dalam suatu organisme yang mengkatalis reaksi yang sama tetapi berbeda dalam sifat fisika dan kimianya. Isozim dapat dipisahkan dengan menggunakan metode elektroforesis. Hasilnya berupa zimogram pola pita bercorak khas yang dapat digunakan sebagai ciri pembeda genetik. Hubungan kekerabatan dengan metode tersebut diekspresikan dalam bentuk dendrogram (Achmad, Herliyana & Agustian 2009). Pada percobaan ini dilakukan uji patogenisitas 10 isolat *Cladosporium* spp. dari beberapa tempat di daerah di Kabupaten Cianjur dan Kabupaten Bandung Barat terhadap karat putih pada krisan dan analisis isozim secara elektroforesis dengan media *starch gel* untuk mengetahui hubungan genetik antarisolat.

Penelitian bertujuan mengetahui (1) patogenisitas 10 isolat *Cladosporium* spp. yang ditemukan di beberapa daerah sentra krisan (Kabupaten Cianjur dan

Bandung Barat) terhadap penyakit karat putih pada krisan cv. Sakuntala asal Balithi dan (2) hubungan kekerabatan antara isolat *Cladosporium* spp. Hipotesis yang diajukan adalah terdapat beberapa isolat *Cladosporium* spp. yang memiliki patogenisitas yang tinggi dan diketahuinya hubungan kekerabatan di antara 10 isolat *Cladosporium* spp. yang ditemukan.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Percobaan dilaksanakan pada bulan April hingga Agustus 2014 di Laboratorium Patologi dan Silvikultur, Fakultas Kehutanan Institut Pertanian Bogor dan Laboratorium Mikologi Balai Penelitian Tanaman Hias.

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan adalah isolat cendawan *Cladosporium* spp. koleksi Laboratorium Biokontrol Balithi seperti pada Tabel 1, tanaman krisan, pati kentang, bufer pengekstrak, *buffer gel*, *buffer* elektroda, pewarna esterase (EST), *acid phosphatase* (ACP) dan peroksoidase (PER). Alat yang digunakan pada percobaan ini antara lain, inkubator plastik, elektroforesis model horizontal, *high voltase power supply*, penangas air, lemari pendingin, alat pemotong gel dan nampan tempat pewarnaan.

Uji Patogenisitas

Tahap pertama dilakukan penanaman krisan cv. Sakuntala dalam 50 polibag Φ 20 cm di rumah kaca. Setiap polibag ditanami dua tanaman. Benih

Tabel 1. Isolat yang digunakan untuk uji patogenisitas dan analisis isozim (*Isolates used for pathogenicity and isozyme analysis*)

Deskripsi cendawan hasil identifikasi morfologi (<i>Description of fungi resulted morphology identification</i>)	Kode isolat (<i>Isolate code</i>)	Sumber (<i>Source</i>)	Asal daerah (<i>Origin</i>)
<i>Cladosporium</i> sp.	DEC	Karat krisan	Lembang, Kab. Bandung Barat
<i>Cladosporium</i> sp.	EC	Karat krisan	Lembang, Kab. Bandung Barat
<i>Cladosporium</i> sp.	DC	Karat krisan	Sukaresmi, Kab. Cianjur
<i>Cladosporium</i> sp.	YEC	Karat krisan	Lembang, Kab. Bandung Barat
<i>Cladosporium</i> sp.	UC	Karat krisan	Lembang, Kab. Bandung Barat
<i>C. cladosporioides</i>	SG	Karat krisan	Segunung, Kab. Cianjur
<i>C. cladosporioides</i>	SG1	Karat krisan	Segunung, Kab. Cianjur
<i>Cladosporium</i> sp.	L1C	Karat krisan	Cugenang, Kab. Cianjur
<i>Cladosporium</i> sp.	Y4	Karat krisan	Sukaresmi, Kab. Cianjur
<i>Cladosporium</i> sp.	HNC	Karat krisan	Sukaresmi, Kab. Cianjur

yang digunakan berasal dari Unit Produksi Benih Sumber (UPBS) Balithi. Tanaman dipelihara dengan penambahan hari panjang dengan menambahkan pencahayaan selama 4 jam pada malam hari (dari jam 22.00 s/d jam 2.00 dini hari). Sumber cahaya tambahan berasal dari lampu pijar 75 watt yang ditempatkan 1,5 m di atas tanaman. Tanaman dipelihara hingga daun terinfeksi penyakit karat. Untuk mengendalikan hama, tanaman disemprot dengan insektisida sesuai anjuran dengan interval 1 minggu satu kali.

Uji patogenisitas isolat-isolat *Cladosporium* terhadap karat pada krisan dilakukan di Laboratorium Mikologi Balithi. Daun-daun krisan yang terinfeksi karat yang dihasilkan pada tahap pertama diinkubasikan di dalam inkubator plastik yang dimodifikasi agar lingkungan percobaan di dalam inkubator tetap lembap (Gambar 1). Permukaan bawah daun-daun sakit kemudian disemprot suspensi spora *Cladosporium* dengan kepadatan 10^6 spora/ml menggunakan *hand sprayer* hingga basah (10 ml/5 daun). Sebagai kontrol, daun sakit disemprot dengan air bersih. Pada karat yang terinfeksi tampak ditumbuhi *Cladosporium* yang berwarna abu tua hingga hitam (Gambar 3). Isolat dikatakan efektif apabila mampu menginfeksi >50% karat dibanding kontrol (tanpa disemprot dengan mikoparasit) berdasarkan jumlah pustul yang terparasit. Tiap isolat diuji efektivitasnya terhadap karat menggunakan lima daun tanaman krisan per inkubator.

Parameter yang diamati adalah persentase parasitasi dengan rumus sebagai berikut (Dirjen Prasarana dan Sarana Pertanian 2013):

$$P = a/b \times 100\%$$

a = jumlah pustul terparasit

b = jumlah pustul terperiksa

Rancangan percobaan yang digunakan adalah acak lengkap dengan 11 perlakuan dan lima ulangan, perlakuan tersebut adalah *Cladosporium* spp. dengan kode isolat seperti pada Tabel 1 ditambah kontrol (daun sakit disemprot dengan air bersih).

Data yang didapat dianalisis menggunakan program SAS 9.1

Analisis Isozim

Metode analisis isozim yang digunakan adalah elektroforesis gel pati model horisontal dengan tiga sistem enzim, yaitu peroxidase (PER), esterase (EST), dan *acid phosphatase* (ACP). Data hasil penelitian berupa zimogram atau pita-pita isozim yang dibuat dalam nilai jarak migrasi (Rf), dilanjutkan pada analisis dendrogram. Urutan pekerjaan sesuai dengan yang dilakukan Hartana (2003).



Gambar 1. Inkubator plastik (*Plastick incubator*)

Ekstraksi sampel

Isolat *Cladosporium* spp. ditumbuhkan di dalam cawan petri yang berisi media *potato dextrose agar* (PDA) secara *single spore*, diinkubasikan selama 1 minggu. Koloni isolat dicetak dengan *cook borer* berukuran 8 mm kemudian dimasukkan ke dalam botol *erlenmeyer* 250 ml yang berisi 100 ml media *potato dextrose broth* (PDB) sebanyak 10 potongan, lalu diinkubasi di suhu ruang selama 7 hari sambil digoyang. Miselium yang tumbuh disaring menggunakan kertas saring No. 1 (Whatman, Maidstone, UK), kemudian dihisap dengan *vacuum*. Miselium yang dihasilkan (0,2 g) digerus hingga halus dalam mortar yang bersuhu rendah (4°C) lalu ditambahkan 500 µl *buffer* pengekstark (100 mM L-asam askorbat, 40 mM L-sitein, 0.12 ml Triton-X-100, 0.02 g PVP-40, 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7) (30). Hasil gerusan dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* dan kemudian dilakukan sentrifuse dengan kecepatan 2.000 rpm selama 20 menit. Supernatan dipisahkan dari endapan, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung *Eppendorf* baru dan disimpan dalam lemari pendingin (*Freezer*) dengan suhu sekitar -70°C untuk digunakan pada proses selanjutnya.

Pembuatan gel pati

Disiapkan cetakan gel yang berukuran 20 cm x 16 cm x 1 cm yang sudah diolesi paraffin cair dan lubang pada kaki cetakan ditutup dengan selotip. Gel pati dibuat dari pati kentang khusus untuk keperluan elektroforesis dengan konsentrasi 10%. Pati dicampur dengan *buffer gel* (5 mM L-histidin monohidrat 1.048 g/l) pH diatur dengan tris sampai mencapai pH 6,1 di dalam labu *erlenmeyer* 1.000 ml (Wendel & Weeden 1990). Kemudian dipanaskan dalam penangas air dengan suhu lebih kurang 80°C selama 25 menit dengan cara memutar labu sambil dikocok hingga mengental dan membentuk gel yang bening, lalu divakum untuk menghilangkan gelembung udara. Selanjutnya gel dituang pada cetakan hingga rata dan biarkan mengeras pada suhu kamar. Setelah dingin gel ditutup dengan plastik yang sudah diolesi paraffin cair.

Peletakan contoh uji

Ekstrak enzim yang akan diuji dikeluarkan dari freezer, kemudian biarkan mencair. Celupkan kertas saring berukuran 6 mm x 15 mm ke dalam ekstrak enzim yang sudah mencair. Belah gel pada bagian tengah menggunakan pisau kemudian renggangkan lalu sisipkan kertas saring yang telah diberi enzim dengan posisi tegak lurus. Jarak antara celah 1-1,5 mm.

Elektroforesis

Gel yang telah berisi enzim diletakkan secara horizontal di atas tray yang kedua sisinya berisi larutan penyangga elektroda, antarl larutan penyangga elektroda dengan gel diberi jembatan berupa spons. Proses elektroforesis dijalankan dengan memberi daya listrik pada gel. Awalnya elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada 100 volt selanjutnya pada 150 volt selama 3 jam. Proses tersebut dilakukan di dalam lemari pendingin dengan suhu 5-10°C untuk menghindari naiknya suhu oleh arus listrik yang dapat mengakibatkan degradasi enzim. Untuk mengontrol jarak migrasi, pada salah satu sisi gel diberi penanda *bromophenol blue*.

Pewarnaan gel

Pewarnaan gel dilakukan setelah elektroforesis selesai, kertas saring dikeluarkan dari gel. Kemudian gel tempat migrasi enzim dibelah menjadi beberapa lembar menggunakan gergaji yang berkawat tipis. setiap lembaran gel dimasukkan ke dalam nampan lalu diberi pewarna. Pada percobaan ini digunakan tiga pewarna, yaitu EST, ACP, dan PER. Selanjutnya nampan ditutup dengan aluminium foil dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam sampai muncul pita-pita yang jelas pada gel. Gel dicuci dengan air mengalir selanjutnya difiksasi dengan 50% glycerol: 50% etanol. Komposisi pewarna sesuai dengan metode yang dilakukan oleh (Wendel & Weeden 1990).

Pengamatan terhadap variasi genetik cendawan dilakukan dengan melihat bentuk pola pita isoenzim yang dihasilkan melalui elektroforesis. Dilanjutkan dengan analisis *cluster* dengan program NTSYS berdasarkan ada tidaknya pita.

HASIL DAN PEMBAHASAN

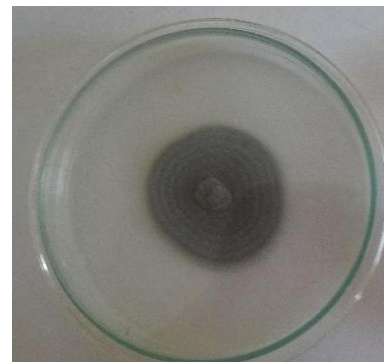
Patogenisitas *Cladosporium* spp.

Isolat *Cladosporium* spp. berasal dari beberapa daerah yang berbeda memiliki morfologi yang sama pada media PDA, permukaan koloni berwarna abu-abu cokelat tua kehitaman dan sebaliknya berwarna cokelat tua hingga hitam (Gambar 2). Dari kesepuluh

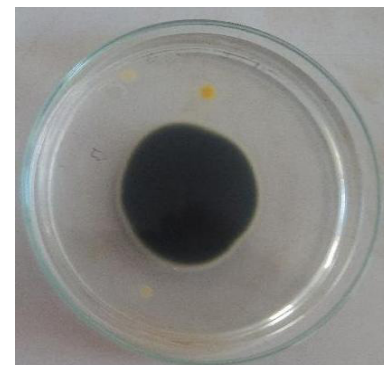
isolat yang diuji, *Cladosporium* SG dan SG1 (asal Kebun Percobaan Balithi) telah teridentifikasi sebagai *C. cladosporioides* (Silvia *et al.* 2016). Sementara *Cladosporium* dari daerah lain spesiesnya belum teridentifikasi.

Hasil uji laboratorium pada pengamatan parasitasi dilakukan 24 jam setelah inokulasi dengan menggunakan mikroskop. Hasil pengamatan secara visual inokulasi isolat *Cladosporium* spp. tidak menimbulkan kerusakan pada daun. Parasitasi *Cladosporium* spp. pada karat krisan yang disebabkan oleh *P. horiana* mulai tampak pada 72 jam setelah inokulasi, sedangkan pada daun krisan tanpa perlakuan tampak pada hari ke-5. Diduga karat pada kontrol terkontaminasi secara pasif pada saat pengamatan. Konidia *Cladosporium* berukuran sangat kecil hingga mudah berpindah. Pengamatan dihentikan setelah pustul karat tertutup total oleh *Cladosporium*. Tingkat parasitasi *Cladosporium* terhadap pustul karat berkisar antara 32-100%. Seluruh isolat *Cladosporium* spp. kecuali isolat dengan kode EC memiliki efektivitas yang tinggi terhadap *P. horiana*. Hasil uji statistik menunjukkan seluruh perlakuan kecuali isolat EC berbeda nyata dengan kontrol (Tabel 2).

Cladosporium cladosporioides dan *C. pseudocladosporioides* merupakan agens pengendali



Koloni bagian atas (*Upper colony*)



Koloni bagian bawah (*Bottom colony*)

Gambar 2. Penampakan koloni *Cladosporium* spp. (*Cladosporium* spp. colony performance)



Gambar 3. Pustul karat terparasit *Cladosporium* spp. (*Rust pustule parasitized Cladosporium* spp.)

hayati potensial untuk *P. horiana* (Torres *et al.* 2017). Kedua cendawan itu menutup pustul karat dalam waktu 96 jam setelah inokulasi. Teliospora pustul dikolonisasi *C. cladosporioides* dan *C. pseudocladosporioides*. Aktivitas itu membuat sitoplasma terganggu, struktur dinding sel rusak dan menyebabkan deformasi teliospora.

Invasi lebih lanjut menyebabkan kerusakan pada sel sporogenous *P. horiana*. Selain itu *Cladosporium* spp. menghasilkan metabolit dengan sifat antibiotik dan anti cendawan yang dapat menghambat pertumbuhan patogen *Bacillus subtilis* dan *Escherchia coli* serta menghambat perkecambahannya spora tujuh dari 12 strain *Aspergillus* dan *Penicilium* (Almatar & Makky 2016; Scott & van Walbeek 1971).

Analisis Isozim

Hasil analisis isozim menunjukkan dari tiga enzim yang diuji hanya EST dan ACP yang menghasilkan aktivitas enzim sementara enzim PER tampaknya tidak bekerja dengan baik sehingga sama sekali tidak menampilkan pita. Hasil percobaan Mahmoud, Gaffar & Mubarak (2017) mengungkapkan hal yang sama, dari empat isozim (EST, GOT, CAT, dan PER) yang digunakan untuk menguji kekerabatan *Rhizoctonia solani* asal Nile Delta, enzim CAT tidak menampilkan pita. Ada banyak faktor yang dapat memengaruhi kinerja enzim di antaranya adalah substrat, suhu, keasaman, kofaktor, dan inhibitor. Suhu atau pH yang tidak sesuai sangat berpengaruh pada kinerja enzim karena strukturnya mengalami kerusakan (Wendel & Weeden 1990). Kemungkinan salah satu faktor yang disebutkan di muka menjadi penyebab enzim PER kehilangan fungsinya sehingga pola pita tidak muncul.

Enzim EST pada tanaman merupakan enzim hidrolitik yang berfungsi melakukan pemotongan ester sederhana pada asam organik, asam anorganik alkohol, dan fenol serta mempunyai berat molekul rendah dan mudah larut (Nurmiyati, Sugiyarto & Sajidan 2009). Enzim EST pada delapan isolat *Cladosporium* spp. menghasilkan dua pita elektroporetik dengan salah satu pita yang lebih tebal dari pita lainnya. Dua isolat lainnya (isolat SG dan SG1) hanya memiliki satu pita. Seluruh isolat menunjukkan pita terletak pada tempat yang sama. Perbedaan ketebalan pita pada

Tabel 2. Patogenisitas dan efektivitas mikoparasit di laboratorium (*Pathogenicity and effectiveness of Cladosporium* spp. in laboratory)

Kode / no. isolat (Code/no. isolate)	Deskripsi cendawan hasil identifikasi morfologi (<i>Description of fungi resulted morphology identification</i>)	% parasitasi ** (% paracitiation) 10 HSI (DAI)	Efektivitas vs kontrol*** (<i>Effectivity vs control</i>), %
SG1	7 <i>C. cladosporioides</i>	99,52 a*	64,22
SG	6 <i>C. cladosporioides</i>	96,64 ab	61,34
L1C	8 <i>Cladosporium</i> spp.	95,00 bc	59,3
DEC	1 <i>Cladosporium</i> spp.	93,20 bcd	57,6
UC	5 <i>Cladosporium</i> spp.	93,00 cd	57,7
HNC	10 <i>Cladosporium</i> spp.	90,00 de	54,7
Y4	9 <i>Cladosporium</i> spp.	89,60 def	54,3
DC	3 <i>Cladosporium</i> spp.	88,80 ef	53,5
YEC	4 <i>Cladosporium</i> spp.	86,30 f	51,0
EC	2 <i>Cladosporium</i> spp.	32,40 g	-2,9
Kontrol (<i>Control</i>)		35,30 g	
KK (CV), %		3,20	

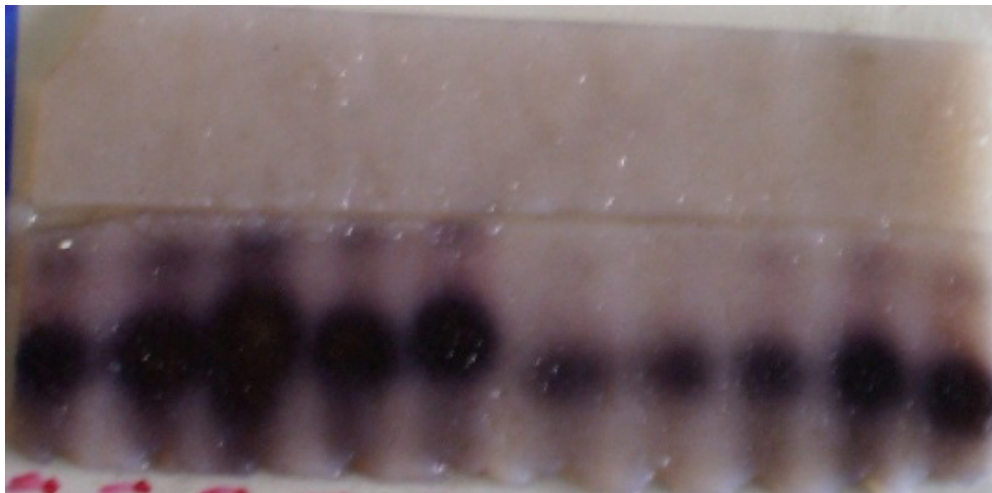
Keterangan (*Remark*)* Angka rerata yang diikuti huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata menurut uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5% (*Mean followed by same letter in rows are not significantly according to DMRT at 5% level*), ** HSI =hari setelah inokulasi , DAI =day after inoculation , ***Parasitasi perlakuan dikurangi parasitasi kontrol

hasil isozim menurut Cahyarini, Yunus & Purwanto (2004) dan Achmad, Herliyana & Agustian (2009) disebabkan oleh perbedaan jumlah molekul yang termigrasi, molekul tidak dapat terpisah dengan baik sehingga membentuk pita yang tebal. Molekul yang mempunyai kekuatan ionik besar akan termigrasi lebih jauh daripada yang berkekuatan lebih rendah. Enzim ACP menghasilkan pola pita yang tipis dengan tiga pita pada isolat 1, 2, 3, 4, 5, 9, dan 10 pada isolat asal Segunung (isolat 6,7) dan Cugenang (isolat 8) tidak nampak ada pita (Gambar 1). Kehadiran pita pada jarak migrasi tertentu dapat dipengaruhi oleh *buffer* ekstrak yang digunakan. Pola pita adalah susunan genetik dari suatu individu dan enzim merupakan produk langsung dari gen sehingga tidak setiap enzim cocok untuk suatu jaringan (Nurmiyati, Sugiyarto & Sajidan 2009).

Dari kedua enzim yang diuji hanya EST yang dapat dianalisis dengan program NTSYS VS 2,10. Enzim ACP menghasilkan pola pita yang monomorfik sehingga tidak dimasukkan dalam analisis. Hasil dendrogram (Gambar 7) dapat diinterpretasikan bahwa terdapat dua kelompok isolat yang berbeda. Kelompok pertama terdiri atas isolat 1 (R1), 2 (R2), 3 (R3), 4 (R4), 5 (R5), 8 (R8), 9 (R9), dan 10 (R10).

Hal tersebut menunjukkan kedelapan isolat memiliki pola pita yang sama yang menunjukkan hubungan kekerabatan yang sangat dekat. Kelompok 2 terdiri atas isolat 6 (R6) dan 7 (R7). Antara kelompok 1 dan 2 memiliki koefisien kemiripan 67%. Semakin kecil nilai kemiripannya pada hasil analisis semakin jauh hubungan kekerabatannya. Hasil analisis menunjukkan bahwa meskipun *Cladosporium* spp. yang diuji terbagi ke dalam dua kelompok akan tetapi kedua kelompok *Cladosporium* spp. itu memiliki kemiripan yang tinggi. Dua kelompok dikatakan mirip bila koefisien kemiripannya kurang dari 0,60 (60%) (Cahyarini, Yunus & Purwanto 2004).

Efektivitas isolat asal Segunung (7 dan 6) menempati urutan teratas, yaitu 64,9% dan 61,6% (Tabel 2). Kemampuan memparasit kedua isolat itu tidak menunjukkan adanya perbedaan. Virulensi kedua isolat itu berbeda sangat nyata dibandingkan dengan tujuh isolat lainnya. Sementara isolat 8 (asal Cugenang) memiliki kemampuan yang sama dengan isolat 6. Hasil uji elektroforesis dengan enzim EST, isolat 7 dan 6 memiliki pola dan jumlah pita yang sama. Demikian juga menurut hubungan koefisien kemiripan, kedua isolat itu menempati kelompok



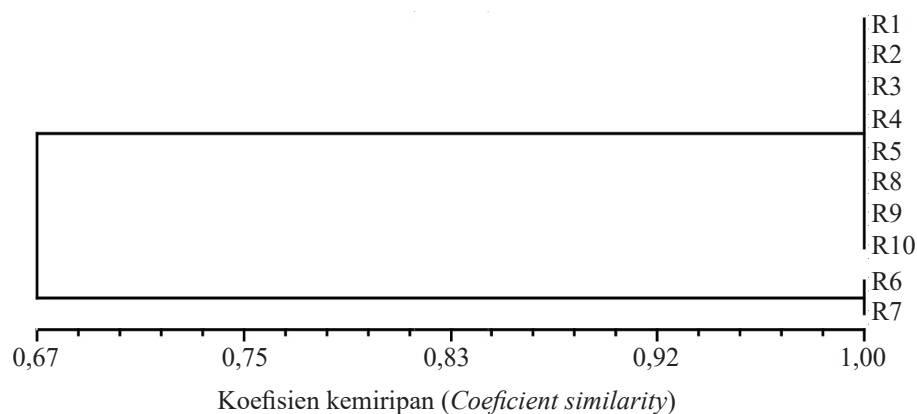
Gambar 4 Pola pita isozim EST (*Banding pattern of EST isozyme*)



Gambar 5. Pola pita isozim ACP (*Banding pattern of ACP isozyme*)

Table 3. Matriks koefisien kemiripan 10 isolat *Cladosporium* spp. (Matrix coefficient similarity of 10 *Cladosporium* spp. isolates)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
R1	1,0									
R2	1,0	1,0								
R3	1,0	1,0	1,0							
R4	1,0	1,0	1,0	1,0						
R5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0					
R6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	1,0				
R7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	1,0	1,0			
R8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0		
R9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0	1,0	
R10	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,7	0,7	1,0	1,0	1,0



Gambar 7. Dendrogram dari 10 isolat *Cladosporium* spp. yang diuji berdasarkan pola pita EST (Dendrogram of 10 *Cladosporium* spp. isolat based on EST banding patterns)

yang berbeda dengan isolat lainnya (Gambar 7 dan Tabel 7). Bila dilihat dari hasil uji patogenisitas dan analisis isozim isolat asal Segunung berbeda dengan isolat dari daerah lain. Efektivitas mikoparasit isolat 6 dan 7 lebih baik dari isolat 1, 2, 3, 4, 5, 9, dan 10. Perbedaan kemampuan dalam memparasit pustul karat kemungkinan disebabkan karena perbedaan virulensi yang dimiliki mikoparasit. Virulensi di antaranya dipengaruhi oleh faktor gen atau asal isolat yang diperoleh dari lokasi yang berbeda (Xiang, Tian & He 1990).

KESIMPULAN DAN SARAN

Sembilan isolat *Cladosporium* spp. efektif memparasit pustul karat dengan efektivitas lebih dari 50%.

Ditemukan hubungan kekerabatan antara isolat *Cladosporium* spp. meskipun terdapat dua kelompok *Cladosporium* spp. yang berbeda, yaitu kelompok pertama terdiri atas isolat nomor 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, dan 10. Kelompok 2 terdiri atas isolat 6 dan 7. Namun, keduanya memiliki koefisien kemiripan yang cukup dekat (67%).

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih yang tidak terhingga disampaikan kepada Saepuloh S.P, Muhidin, Ade Sulaeman, Asep Samsudin, dan R. Daelani yang telah membantu percobaan ini hingga dapat diselesaikan dengan baik. Terima kasih kepada Dr. Suskandari Kartikaningrum dan Dr. Erniawati Diningsih yang telah berkenan menelaah tulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Achmad, Herliyana, EN & Agustian, FR 2009, 'Hubungan kekerabatan jamur pelapuk putih *Pleurotus* spp. dengan analisis isoenzim', *Jurnal AgroBiogen*, vol. 5, no. 2, pp. 78-83.
2. Almatar, M& & Makky, E 2016, '*Cladosporium cladosporioides* from the perspectives of medical and biotechnological approaches', *Biotech*, vol. 6, no. 4, pp. 1-8.
3. Bahar, MH, Backhouse, DCP, Gregg, PC & Mensah, R 2011, 'Efficacy of a *Cladosporium* sp. fungus against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), other insect pests and beneficial insects of cotton', *Biocontrol Science and Technology*, vol. 21, no. 12, pp. 1387-1397.
4. Baiswar, P, Chandra, S & Kumar, R 2008, 'First report of rust caused by *Coleosporium plumeriae* on *Plumeria alba* in India', *Plant Pathol*, vol. 57, no. 4, p. 787.

5. Bensaci, OA, Daoud, H, Lombarkia, N, Rouaba, Berk, K & Curtis, MA 2015, 'Formulation of the endophytic fungus *Cladosporium oxysporum*, isolated from *Euphorbiabupleuroides* sub sp. *luteola*, as a new biocontrol tool against the black bean aphid (*Aphis fabae* Scop)', *Journal of Plant Protection Research*, vol. 55, no. 1, pp. 80–87.
6. Bensch, K, Groenewald, JZ, Dijksterhuis, J, Starink-Willemse, MA, Summerell, BBA, Shin, HD, M, DF, Schroers, HJ, Braun, U & Crous, PW 2010, 'Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales)', *Studies in Mycology*, vol. 67, pp. 1–94.
7. Cahyarini, RD, Yunus, A & Purwanto, E 2004, 'Identifikasi keragaman genetik beberapa varietas lokal kedelai di Jawa berdasarkan analisis isozim', *Agrosains*, vol. 6, no. 2, pp. 79–83.
8. Chin, MS, Kim, SH & Park, WM 1993, 'Virulence and isozyme patterns of *Diapotha phaseolorum* var. *Sojae* isolates from different geographic areas, RDA', *J. Agri. Sci*, vol. 35, no. 1, pp. 324–331.
9. Dolińska, TM, Bartkowska, A & Schollenberger, M 2011, 'Light and scanning microscope observations of *Cladosporium uredinicola* growth on rust fungi', *Phytopathologia*, vol. 61, pp. 37–44.
10. Doolotkeldieva, T & Bobusheva, S 2014, 'Endophytic fungi diversity of wild terrestrial plants in Kyrgyzstan', *Journal of Microbiology*, vol. 3, no. 9, pp. 163–176.
11. Dugan, FM & Glawe, DA 2006, '*Phyllactinia gutatta* is host for *Cladosporium uredinicola* in Washington State', *Pac. Northwest Fungi*, vol. 1, no. 1, pp. 1–5.
12. Eken, C & Hayat, R 2009, 'Preliminary evaluation of *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) de Vries in laboratory conditions, as a potential candidate for biocontrol of *Tetranychus urticae* Koch', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 25, p. 489.
13. Hartana, A 2003, 'Elektroforesis sebagai alat pelacak marka molekuler biologi', Materi pelatihan singkat teknik analisis dengan metode dan peralatan mutakhir di bidang hayati dan kimia, kerja sama antara Pusat Studi Ilmu Hayati Lembaga Penelitian IPB dengan Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Departemen Pendidikan Nasional, Bogor, 21-25 Oktober 2013, pp. 25-31.
14. Kumar, A, Verma, VC, Gond, SK, Kumar, V & Kharwar, RN 2009, 'Bio-control potential of *Cladosporium* sp. (MCPL-461), against a noxious weed *Parthenium hysterophorus* L', *J. Environ. Biol*, vol. 30, no. 2, pp. 307–12.
15. Mahmoud, YAG, Gaffar, RM & Mubarak, HM 2017, 'Genetik diversity among Nile Delta isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn based on pathogenicity, compatibility, isozym analysis and total protein pattern', *Turk J. Bot*, vol. 31, pp. 19–29.
16. Micales, JA, Bonde, MR & Peterson, GL 1986, 'The use of isozyme analysis in fungal taxonomy and genetics', *Mycotaxon*, vol. XXVII, pp. 405 – 449.
17. Miller, RNG, Holderness, M, Bridge, PD, Paterson, RM, Hussin, Z & Meo, S 1995, 'Isozyme analysis for characterization of *Ganoderma* strains from South-East Asia', *Bulletin EPPO*, vol. 24, no. 1, pp. 81–87.
18. Nurmiyati, Sugiyarto & Sajidan 2009, 'Kimpul (*Xanthosoma* spp.) characterization based on morphological characteristic and isozymic analysis', *Nusantara Bioscience*, vol. 1, pp. 138–145.
19. Ogórek, R, Lejman, A, Pusz, W, Miłuch, A & Miodyńska, P 2012, 'Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi', *Mikologia Lekarska*, vol. 19, no. 2, pp. 80–85.
20. Paul, Diby & Park, KS 2013, 'Identification of volatiles produced by *Cladosporium cladosporioides* CL-1, a fungal biocontrol agent that promotes plant growth', *Sensors*, vol. 13, pp. 13969–13977.
21. Pawar, NB & Mane, SS 2014, 'Protein and isozyme patterns of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* isolates causing chickpea wilt', *Phytopath*, vol. 67, no. 3, pp. 234–239.
22. Scott, PM & van Walbeek, W 1971, 'Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*', *J. of Antibiotik*, vol. XXIV, no. 11, pp. 747–755.
23. Siddiquee, S, Tan, SG & Yusof, UK 2010, 'Isozyme analysis and relationships among three species *Trichoderma* isolates in Malaysian', *J. Microbiol Biotech*, vol. 20, no. 9, pp. 1266–75.
24. Silvia, Yusuf, E, Djatnika, I & Suhardi 2014, 'Koleksi dan karakterisasi mikoparasit asal karat putih pada krisan', *J. Hort*, vol. 24, no. 1, pp. 56–64.
25. Silvia, Yusuf, E, Nuryani, W & Hanudin 2016, 'Isolasi dan identifikasi mikoparasit utama pada karat krisan', *J. Hort*, vol. 26, no. 2, pp. 217–222.
26. Szekeres, A, La' day, M, Kredics, L, Varga, J, Antal, Z, Hatvani, L, Manczinger, L, Va' gvo' lgyi & Nagy, E 2006, 'Rapid identification of clinical *Trichoderma longibrachiatum* isolates by cellulose-acetate electrophoresis-mediated isoenzyme analysis', *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, no. 4, pp. 369–375.
27. Torres, DE, Rojas-Martí' nez, RI ZavaletaMeji' a, E, Guevara-Fefer, P, Ma' rquez-Guzma' n, GJ & Pe' rez-Martí' nez, C 2017, '*Cladosporium cladosporioides* and *Cladosporium pseudocladosporioides* as potential new fungal antagonists of *Puccinia horiana* Henn., the causal agent of *Chrysanthemum* white rust', *Plos One*, vol. 12, no. 1, pp. 82–170.
28. Veld, Wami, Govers, F & Meijer, HJ 2007, 'Correlation of isozyme profiles with genomic sequences of *Phytophthora ramorum* and *P. sojae* orthologues', *Curr Genet*, vol. 52, no. 5–6, pp. 5–247.
29. Wendel, JF & Weeden, NF 1990, '*Visualixation and interpretation of plant isoxymen in isozyme*' in '*Plant Biology*' Eds Soltis, DE & PF, Soltis.
30. Xiang, Z, Tian, Y & He, Y 1990, 'A pathogen host interaction data integration and analysis system', *Genom Biol*, vol. 8, pp. 8–7.
31. Zhan, G, Tian, Y, Wang, F, Chen, X, Guo, J, Jiao, M, Huang, L & Kang, Z 2007, 'A novel fungal hyperparasite of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, the causal agent of wheat stripe rust', *Plos One*, vol. 9, no. 11, pp. 8–7.