

**Potensi Cendawan Endofit sebagai Agens Pengendali Hayati
Phytophthora palmivora (Butl.) Butl. Penyebab Busuk Buah Kakao**

***Potency of Endophytic Fungi as Biocontrol Agent of Cacao
Black Pod Disease Caused by Phytophthora palmivora (Butl.) Butl***

Efi Toding Tondok^{1*}, Meity Suradji Sinaga¹, Widodo¹, dan Maggy Thenawidjaja Suhartono²

¹Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University)
Jl. Kamper, Kampus IPB Dramaga, 16680, Indonesia

²Departemen Teknologi Pangan, Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor (Bogor Agricultural University)
Jl. Lingkar Akademik Kampus IPB Dramaga 16680, Bogor, Indonesia

Diterima 7 Desember 2011/Disetujui 27 Juni 2012

ABSTRACT

Black pod disease (BPD) of cacao caused by Phytophthora palmivora (Butl.) is one of the major diseases on cacao plantation worldwide. Endophytic fungi (EF), fungi that live asymptotically inside healthy plants, were examined to study their potentials as biocontrol agent of the disease. Six of EF selected from 37 species (from 2843 isolates), isolated from healthy pods of cacao from Marena in Central Sulawesi were tested for their abilities to control BPD. Pods on living trees in the field were sprayed with each EF propagules. The inoculated pods were harvested two weeks later and subsequently inoculated with P. palmivora. Scoring of disease development was performed and quantified as area under disease progress curve (AUDPC). Latent period, infection rate and effectiveness were also recorded. In vitro growth inhibition of pathogen and induced plant defense mechanisms due to EF were also investigated. Xylariaceae and Calocybe gambosa treatment generated the highest effectiveness control level, i.e. 38.8% and 33.8% respectively, followed by Resinicium friabile and Aschersonia treatment, i.e. 17.4% dan 12.7% respectively. Pestalotiopsis and Fusarium were not effective to control BPD. There was a strong connection between disease severity of BPD with the latent period of pathogen. Growth inhibition of pathogen and induced resistance of plant were partially responsible for disease suppression by Xylariaceae, C. gambosa, R. friabile and Aschersonia.

Keywords: Calocybe gambosa, induced resistance, peroxidases, salicylic acid, Xylariaceae

ABSTRAK

Penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh Phytophthora palmivora (Butl.) Butl merupakan salah satu penyakit yang sangat merugikan pada pertanaman kakao. Enam cendawan endofit (CE) dari total 37 spesies (2843 isolat) yang berhasil diisolasi dari buah kakao sehat asal Sulawesi Tengah, diuji keefektifannya sebagai agens pengendali hayati. Buah kakao di lapangan disemprot dengan propagul cendawan, setelah dua minggu buah dipanen dan diinokulasi dengan patogen P. palmivora di laboratorium. Perkembangan gejala penyakit pada buah diamati, dihitung periode laten, keparahan penyakit, laju infeksi (r), nilai AUDPC dan tingkat keefektifan penekanan penyakit busuk buah. Kemampuan CE menginduksi ketahanan tanaman dan penghambatan pertumbuhan patogen in-vitro juga dianalisis. Cendawan Xylariaceae dan Calocybe gambosa menghasilkan tingkat penekanan penyakit paling tinggi, berturut-turut sebesar 38.8% dan 33.8%, diikuti oleh Resinicium friabile dan Aschersonia masing-masing sebesar 17.4% dan 12.7%. Cendawan Pestalotiopsis dan Fusarium tidak efektif menekan penyakit busuk buah kakao. Periode laten sangat berkaitan dengan keparahan penyakit. Penghambatan pertumbuhan patogen dan induksi ketahanan tanaman berperan dalam penekanan penyakit oleh Xylariaceae, C. gambosa, R. friabile dan Aschersonia.

Kata kunci: asam salisilat, Calocybe gambosa, peroksidase, Xylariaceae

PENDAHULUAN

Penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh *P. palmivora* merupakan salah satu penyakit yang paling

merugikan pada pertanaman kakao di seluruh dunia termasuk di Indonesia. Penyakit ini dapat mengurangi produksi dunia 20-30% setiap tahun (Guest, 2007), bahkan dapat mengurangi hasil produksi sampai 90% (Bowers et al., 2001). Saat ini, pengendalian hama dan penyakit terpadu seperti sanitasi, pemangkasan, kultivar tahan,

* Penulis untuk korespondensi. e-mail: efithpt@yahoo.com

pemanfaatan agens hayati direkomendasikan untuk menekan perkembangan penyakit busuk buah kakao, namun penyakit ini tetap menjadi masalah di seluruh dunia.

Salah satu teknologi baru dalam pengendalian hayati penyakit tumbuhan yang menjanjikan adalah dengan penggunaan cendawan endofit (CE). Cendawan endofit adalah cendawan yang semua atau sebagian dari siklus hidupnya berada di dalam jaringan tanaman sehat dan tidak memperlihatkan gejala penyakit (Schulz dan Boyle, 2005). Hubungan antara tanaman dan CE umumnya dianggap sebagai simbiosis mutualistik (Faeth, 2002).

Di Indonesia, penelitian CE pada kakao belum pernah dilaporkan secara ilmiah. Penelitian CE pada kakao dimulai oleh Arnold dan Herre (2003) di Amerika Selatan dengan menilai tingkat keanekaragaman CE dari daun kakao yang tumbuh pada berbagai pola ekosistem. Beberapa CE dilaporkan berpotensi sebagai agens biokontrol beberapa penyakit tanaman kakao diantaranya *Gliocladium catenulatum*, *Trichoderma*, *Pestalotiopsis*, *Tolyocladium*, and *Fusarium* (Rubini *et al.*, 2005; Mejia *et al.*, 2008; Hanada *et al.*, 2010). Cendawan endofit ada yang memproduksi senyawa-senyawa yang dapat menghambat perkembangan beberapa patogen tanaman seperti *polyketides clavatul* dan *patulin* (Zhang *et al.*, 2008), asam salisilat (AS), asam jasmonat (AJ) dan peroksidase (Segarra *et al.*, 2007). AS, AJ dan peroksidase berperan dalam menginduksi ketahanan tanaman terhadap patogen.

Penelitian ini dilakukan untuk menguji kemampuan beberapa CE dalam menekan penyakit busuk buah kakao dan mekanisme yang mendasarinya.

BAHAN DAN METODE

Inokulasi Buah pada Tanaman Hidup dengan CE

Inokulasi buah yang masih di pohon dengan CE dilaksanakan di stasiun lapangan milik PT Perkebunan VIII Saguling, Jawa Barat dari bulan November hingga Desember 2010. Enam isolat CE dari buah kakao sehat yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Marena (terletak di lembah Kulawi, 1°29'30"-1°32'24" S dan 120°1'-120°3'30" E, berbatasan langsung dengan Taman Nasional Lore Lindu, Sulawesi Tengah). Keenam spesies CE ini (*Xylariaceae*, *Calocybe gambosa*, *Resinicium friabile*, *Aschersonia*, *Pestalotiopsis*, dan *Fusarium T47a*) sebelumnya telah dua kali diujicobakan pada daun dari bibit kakao dan terbukti tidak patogenik (Tahi *et al.*, 2006).

Cendawan endofit diperbanyak dalam labu Erlenmeyer berisi PDB yang formulasinya dibuat 50% dari resep baku dan diputar pada kecepatan 100 rpm. Setelah dua bulan, cendawan divakum, dibilas dengan akuades steril dan diblender dengan kecepatan sedang selama 10 menit. Propagul cendawan diencerkan dengan air hingga kerapatan 100 propagul mL⁻¹.

Pada saat perlakuan di lapangan, suspensi cendawan dicampur dengan 0.1% Tween 80 dan disemprotkan pada buah dengan umur dan ukuran yang relatif seragam (panjang ±10 cm). Untuk tiap-tiap cendawan, penyemprotan

dilakukan pada tiga pohon sebanyak lima buah per pohon. Campuran Tween 80 dan air steril digunakan sebagai kontrol. Setelah dua minggu, buah dipetik untuk diinokulasi dengan *P. palmivora* di laboratorium.

Inokulasi P. palmivora pada Buah yang Telah Dipetik

P. palmivora diisolasi dari buah kakao bergejala dari Sulawesi. Dalam semua tahapan penelitian ini, inokulum patogen berasal dari zoospora tunggal yang dimurnikan. Untuk mempermudah penghitungan propagul, *P. palmivora* dirangsang untuk memproduksi zoospora dengan metode AVRDC Mycology (AVRDC, 2000). Isolat ditumbuhkan dalam media agar V8 dengan penyinaran terus-menerus pada suhu 28 °C selama 4-5 hari. Selanjutnya isolat (dan media) dibagi menjadi empat, setiap bagian dipindahkan ke cawan petri baru dan dipotong-potong berukuran 5 mm². Potongan digenangi air selama satu jam, dibuang dan digenangi lagi serta dinkubasikan di bawah penyinaran kontinu selama 24 jam. Selanjutnya isolat dipindahkan ke ruang bersuhu 4 °C selama 2 jam dan 28 °C selama 1-2 jam. Zoospora yang berhasil dipanen diencerkan konsentrasinya hingga 5 x 10⁴ zoospora mL⁻¹. Sebelum digunakan, suspensi zoospora disimpan dalam suhu 4 °C selama tiga hari agar berkecambah.

Lingkar kertas saring steril berdiameter 10 mm ditetesi dengan 1 mL zoospora, dua kertas diletakkan secara terbalik di atas permukaan buah kakao hasil inokulasi CE. Buah yang telah diinokulasi diletakkan di dalam wadah plastik, 5 buah untuk tiap wadah. Wadah plastik dibungkus dengan plastik dan di dalam tiap plastik diletakkan kertas tissue basah. Keperahan penyakit dihitung tiap dua hari dengan skor seperti:

- 1 = $x \leq 5$
- 2 = $5 < x \leq 15$
- 3 = $15 < x \leq 25$
- 4 = $25 < x \leq 35$
- 5 = $35 < x \leq 45$
- 6 = $x > 45$
- x = kisaran gejala (%)

Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Patogen In-Vitro

Kemampuan CE menghambat pertumbuhan patogen diukur dengan menumbuhkan keduanya di dalam cawan Petri berdiameter 9 cm pada media PDA. Kedua cendawan ditumbuhkan berhadapan-hadapan dengan jarak 3 cm. Zona penghambatan pertumbuhan patogen berupa zona bening yang seharusnya ditumbuhi patogen, diukur. Pengukuran dilakukan pada umur biakan patogen 4 hari. Cendawan endofit yang pertumbuhannya lambat dibiakkan sehari lebih awal dari patogen.

Analisis Asam Salisilat dan Aktivitas Peroksidase

Benih kakao yang telah disterilisasi dengan Benlate ditanam di dalam tanah steril. Benih ini berasal dari tiga buah kakao yang dipanen dari satu pohon di Sulawesi.

Bibit kakao dipelihara di dalam rumah plastik, atap plastik ditutupi paranet dengan pencahayaan 10%, tepinya ditutup dengan kain kasa. Tanaman disiram secara langsung ke dalam media tumbuh, tiga hari sekali. Bibit dipelihara hingga memiliki 4 daun berkembang penuh.

Cendawan endofit disiapkan seperti pada penyiapan untuk inokulasi buah, disiapkan dengan konsentrasi 10^5 propagul mL^{-1} air. Satu daun terbawah dari bibit berusia 4 bulan dicelup ke dalam propagul CE, 10 bibit untuk tiap CE. Kontrol dicelup ke dalam air steril. Suspensi cendawan yang tersisa dituang ke media tumbuh bibit, 10 mL tiap tanaman. Penanganan tanaman dilakukan dengan hati-hati untuk mencegah kontak antara daun atas dengan daun bawah dan antar tanaman. Kelembaban di dalam rumah plastik dijaga tetap tinggi, sekitar 99% selama dua hari dengan meletakkan handuk basah dan air di dalam wadah di dalam rumah plastik

Setelah 9 hari, daun kedua dari tiap bibit dipanen untuk analisis asam salisilat dan peroksidase. Aktivitas peroksidase diukur dengan metode yang dikembangkan oleh Pudjihartati *et al.* (2006) (modifikasi dari Hammerschmidt *et al.*, 1982) dan total protein dihitung mengikuti metode Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Konsentrasi asam salisilat dianalisis menggunakan HPLC mengikuti metode Bevilacqua and Califano (1989). Sampel dianalisis pada Varian 450-GC *system liquid chromatography*, dengan kolom C-18 dan laju isocratic pada 1 mL menit^{-1} .

Inokulasi daun ketiga dengan zoospora berkecambah dari *P. palmivora* dilakukan pada hari berikutnya. Inokulasi dilakukan dengan cara yang sama seperti untuk buah kakao. Inokulasi diulang tujuh hari kemudian dengan miselium patogen pada media V8 agar, ditempelkan pada permukaan bawah daun karena inokulasi pertama tidak bergejala. Hingga hari ke-9, tidak ada gejala yang muncul. Daun ke-4 dipanen untuk analisis peroksidase dan asam salisilat yang ke-2, hari ke-26 setelah inokulasi CE.

Pengukuran asam salisilat dan peroksidase berasal dari sampel komposit, gabungan dari ke sepuluh ulangan dalam satu perlakuan.

Analisis Data

Laju infeksi, AUDPC dan tingkat keefektifan tiap CE menekan penyakit dihitung dari keparahan penyakit pada buah kakao. Nilai AUDPC, periode laten, laju infeksi, keefektifan pengendalian dikorelasikan dengan nilai zona hambatan hasil uji ganda *in vitro*, produksi asam salisilat dan aktivitas peroksidase pada daun bibit kakao.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Inokulasi buah kakao dengan berbagai cendawan endofit (CE) di lapangan yang dilanjutkan dengan inokulasi *P. palmivora* di laboratorium menghasilkan beragam reaksi dari buah kakao. Perlakuan dengan spesies cendawan dalam famili *Xylariaceae* mampu menekan perkembangan keparahan penyakit sebesar 38.8% dan berbeda nyata dengan kontrol pada taraf nyata 5% dengan uji Fisher. Penekanan ini juga tergambar dari nilai AUDPC yang relatif lebih

rendah dan periode laten yang paling panjang dan berbeda nyata dengan kontrol (Gambar 1).

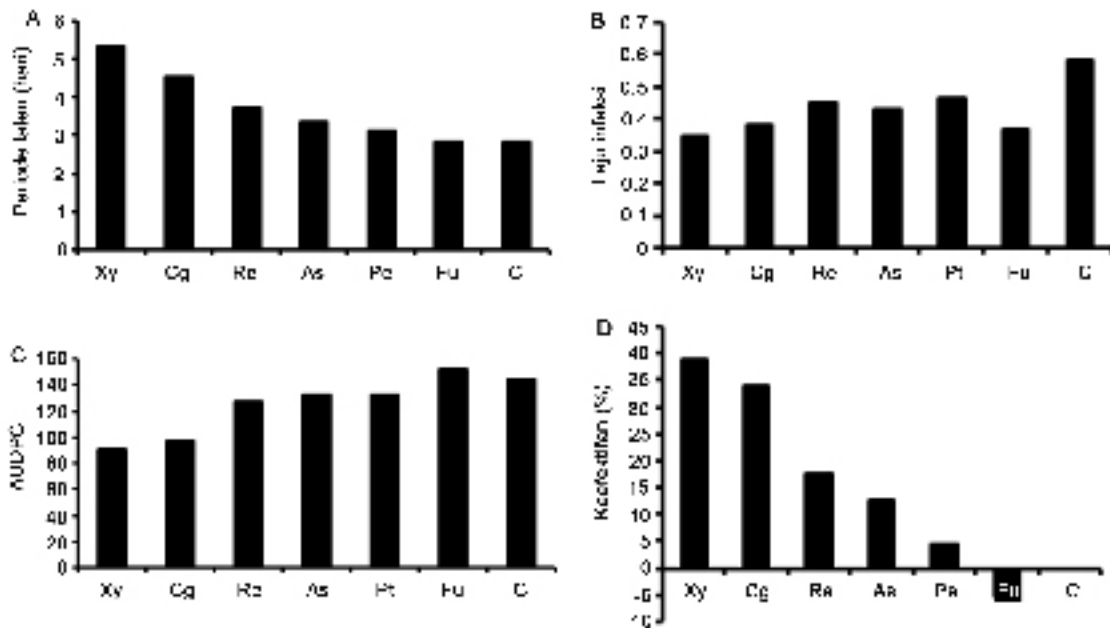
Dalam uji ganda dengan patogen, *Xylariaceae* mampu menghambat pertumbuhan miselium patogen *in vitro* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening sebagai hasil penghambatan pertumbuhan patogen (Gambar 2A). *Xylariaceae* juga mampu menginduksi peningkatan aktivitas peroksidase dan kandungan asam salisilat, walaupun tidak berbeda dengan perlakuan lainnya (Gambar 2B dan C). Demikian juga dengan laju infeksi yang relatif sama untuk semua perlakuan termasuk kontrol (Gambar 1B).

Calocybe gambosa juga mampu menekan keparahan penyakit sebesar 33.8% dengan periode laten yang panjang dan nilai AUDPC yang berbeda nyata dengan kontrol (Gambar 1). Namun demikian laju infeksi, zona hambatan, peroksidase dan asam salisilat tidak berbeda dengan perlakuan lainnya (Gambar 2). Penekanan keparahan penyakit oleh perlakuan *R. friabile*, *Aschersonia*, dan *Pestalotiopsis* tidak berbeda dengan kontrol masing-masing sebesar 17.36%, 12.74% dan 4.2%. Periode laten dan nilai AUDPC dari ketiga cendawan tersebut tidak berbeda nyata. Uji *in vitro* menunjukkan hal yang berbeda dengan bioassay pada buah. Aktivitas antifungal yang ditunjukkan oleh zona hambatan paling tinggi didapatkan pada perlakuan dengan *R. friabile*, disusul *Aschersonia*. Pada analisis kimia, *Aschersonia* menghasilkan asam salisilat yang paling tinggi pada pengujian kedua, *Pestalotiopsis* menghasilkan aktivitas peroksidase yang konstan tetap tinggi pada kedua pengamatan. *Pestalotiopsis* tidak menghasilkan zona hambatan namun mampu menghambat pertumbuhan patogen *in vitro*.

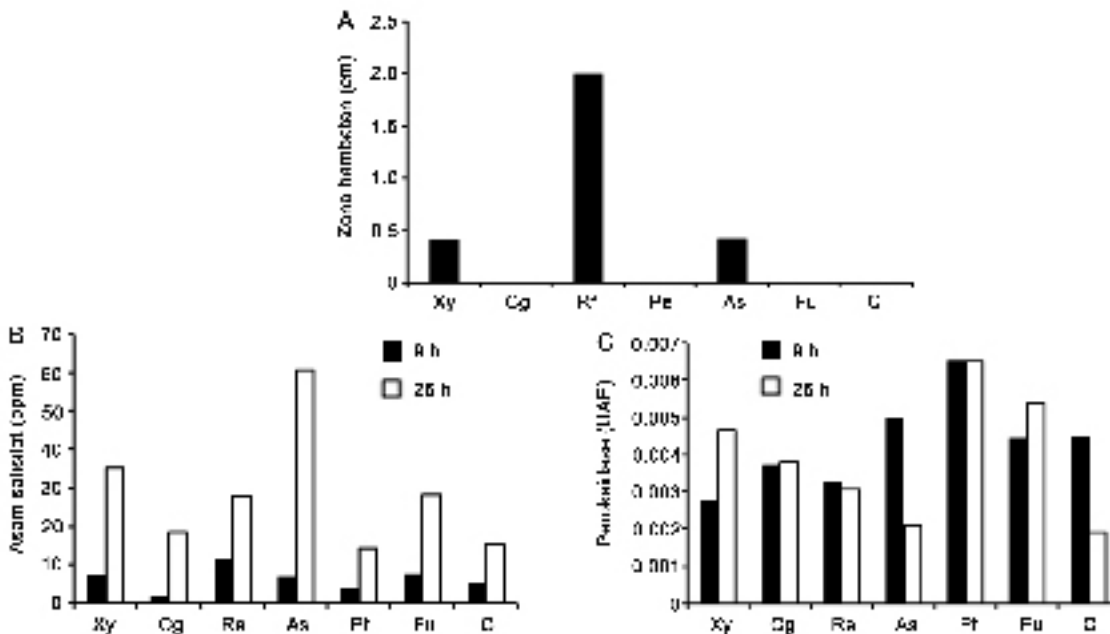
Di lain pihak, perlakuan dengan *Fusarium* tidak menunjukkan kemampuan untuk menekan perkembangan penyakit tetapi justru meningkatkan keparahan sebesar 5.95% lebih besar daripada kontrol (Gambar 1D). Periode laten dari perlakuan ini cukup singkat, 2.82 hari dengan nilai AUDPC yang tinggi, tidak berbeda nyata dengan kontrol (Gambar 1B dan C). Hal ini menunjukkan *Fusarium* berpengaruh sinergis dengan patogen mengakibatkan keparahan penyakit yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan tanpa CE. Cendawan ini juga tidak mampu menghambat pertumbuhan patogen secara *in vitro*.

Ketika nilai AUDPC, tingkat penekanan atau keefektifan, periode laten dan laju infeksi dikorelasikan dengan nilai zona hambatan, aktivitas peroksidase dan kandungan asam salisilat, tidak didapatkan korelasi yang nyata di antara peubah yang diuji (Tabel 1). Dengan uji yang sama didapatkan nilai korelasi yang nyata antara AUDPC atau tingkat keefektifan dengan periode laten masing-masing sebesar -0.973 dan 0.972, namun tidak nyata ketika AUDPC atau tingkat keefektifan dikorelasikan dengan laju infeksi (Tabel 1). Hal ini menunjukkan bahwa periode laten sangat menentukan tingkat keefektifan CE yang diuji. Ketika patogen sudah mampu mengatasi masa inkubasi dan menginfeksi inang, maka laju infeksi pada tiap perlakuan CE tidak berbeda nyata dengan perlakuan kontrol.

Herre *et al.* (2007) mengemukakan bahwa dua mekanisme CE yang berpotensi berperan dalam melindungi inangnya adalah dengan menginduksi ketahanan tanaman



Gambar 1. Periode laten (A), laju infeksi (B), nilai AUDPC (C), dan keefektifan (D) inokulasi CE kemudian *Phytophthora palmivora* pada buah kakao (Xy = *Xylariaceae*, Cg = *Calocybe gambosa*, Re = *Resinicium friabile*, As = *Aschersonia*, Pt = *Pestalotiopsis*, Fu = *Fusarium*, C= kontrol; huruf mutu yang sama di atas bar dalam satu grafik tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$ dengan uji Fisher)



Gambar 2. Zona hambatan (A) pada uji koloni ganda, produksi asam salisilat (ppm; B) dan aktivitas peroksidase (UAE; C) bibit kakao dari daun kedua 9 hari setelah inokulasi daun pertama dengan CE dan 26 hari dari daun ke-4 setelah inokulasi daun ke-3 dengan *Phytophthora palmivora* (UAE = Unit Aktivitas Enzim, Xy = *Xylariaceae*, Cg = *Calocybe gambosa*, Re = *Resinicium friabile*, As = *Aschersonia*, Pt = *Pestalotia*, Fu = *Fusarium*, C= kontrol; huruf mutu yang sama di atas bar dalam satu grafik tidak berbeda nyata pada taraf $\alpha = 5\%$ dengan uji Fisher)

atau dengan mekanisme pertahanan luar seperti antibiosis. Zona hambatan pada uji koloni ganda dapat terbentuk karena CE memproduksi senyawa antifungal yang menghambat pertumbuhan patogen. Senyawa antifungal akan bekerja menghambat perkembangan patogen bila ada kontak

langsung dengan patogennya, yang merupakan salah satu kelemahan dari mekanisme ini, selain mudahnya terurai oleh sinar matahari atau karena panas dan kekeringan. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengidentifikasi senyawa antifungal yang diproduksi CE dan potensi pemanfaatannya.

Tabel 1. Nilai korelasi antara periode laten, laju infeksi, tingkat keefektifan dan nilai AUDPC pada buah kakao dengan perlakuan CE dan kontrol, zona penghambatan uji koloni ganda, dan produksi asam salisilat dan aktivitas peroksidase pada bibit kakao

Korelasi	Laju infeksi	Tingkat keefektifan	AUDPC	Zona hambatan	Peroxidase		Asam salisilat	
					9 hari	26 hari	9 hari	26 hari
AUDPC				-0.078	0.568	-0.064	0.229	-0.032
Periode laten	-0.602	0.972	-0.973	0.151	-0.638	0.172	-0.05	0.121
Laju infeksi		-0.523	0.519	0.001	0.298	-0.66	-0.079	-0.334
Tingkat keefektifan			-0.984	0.205	-0.541	0.151	-0.103	0.155

Berdasarkan penelitian ini, dengan hanya melihat asam salisilatnya, belum dapat disimpulkan apakah mekanisme *Systemic Acquired Resistance* (SAR) atau *Induced Systemic Resistance* (ISR) yang menjadi mekanisme tiap CE yang diuji. Mekanisme lain yang mungkin berperan tetapi tidak diukur dalam penelitian ini misalnya lisis, kompetisi situs kolonisasi, induksi produksi *jasmonic acid* dan etilen.

Asam salisilat dikenal sebagai molekul sinyal pada ketahanan lokal dan sistemik (SAR; Shah, 2003). SAR berperan dalam ketahanan tanaman sebagai molekul sinyal yang memicu ekspresi gen PR (*Pathogen-Related genes*; Vlot *et al.*, 2008). Asam salisilat dilaporkan menginduksi produksi protein PR-1 pada tanaman tembakau (Malamy *et al.*, 1990), menginduksi kitinase pada daun dan umbi bawang putih (Van Damme *et al.*, 1993), mengaktifkan reaksi hipersensitif (HR-) pada kedelai (Shirasu *et al.*, 1997), dan menginduksi *programmed cell death* (PCD; Brodersen *et al.*, 2005). Peningkatan konsentrasi asam salisilat di dalam tanaman mengindikasikan terjadinya peningkatan resistensi terhadap patogen, meskipun asam salisilat dalam konsentrasi rendah dapat dimanfaatkan oleh beberapa tanaman (Yu *et al.*, 1997).

Peroksidase merupakan enzim yang mengkatalisis produksi H₂O₂ (hidrogen peroksida), molekul yang secara langsung bersifat toksik terhadap sel hidup atau secara tidak langsung dengan memproduksi antimikroba seperti *reactive free radicals* (Do *et al.*, 2003; Peng dan Kuc, 1992). Selain H₂O₂, peroksidase juga berperan dalam menginduksi produksi lignin, suberin, dan *programmed cell death* (Quiroga *et al.*, 2000; Do *et al.*, 2003; Ghosh, 2006).

Aktivitas peroksidase yang tinggi pada dua kali pengamatan dengan perlakuan *Pestalotiopsis* mengindikasikan bahwa cendawan ini berpotensi menjadi patogen. Tanaman diinduksi untuk menghasilkan peroksidase yang tinggi untuk menekan perkembangan *Pestalotiopsis* itu sendiri agar tetap inaktif atau dalam bentuk laten. Mekanisme *Fusarium* yang memperparah penyakit juga menarik untuk diteliti lebih lanjut. Kedua cendawan ini, pada saat uji patogenitas pada daun bibit kakao tidak menunjukkan gejala nekrotik. Berdasarkan alasan tersebut, tidak direkomendasikan untuk mengembangkan kedua isolat ini sebagai agens hayati.

Walaupun tidak berkorelasi nyata, keempat isolat cendawan yang diuji memiliki mekanisme yang berbeda-beda dalam menekan perkembangan penyakit seperti yang

dikemukakan oleh Herre *et al.* (2007). *Xylariaceae* dengan sedikit senyawa antifungal, asam salisilat dan peroksidase yang meningkat, *C. gambosa* yang tidak memproduksi senyawa antifungal dengan sedikit asam salisilat dan peroksidase, *R. friabile* dengan senyawa antifungal yang cukup tinggi dengan asam salisilat dan peroksidase rendah, dan *Aschersonia* dengan asam salisilat yang paling tinggi, sedikit senyawa antifungal dan peroksidase. Dengan mekanisme kerja yang berbeda-beda, kombinasi pemanfaatan beberapa CE secara bersama-sama berpeluang untuk dilakukan. Pengalaman penulis menunjukkan bahwa secara alami, CE tidak pernah ditemukan hanya satu spesies dari ± 5 mm² kulit buah kakao matang, rata-rata ada empat spesies. Namun demikian, Xu *et al.* (2011) mengingatkan agar berhati-hati dalam mengkombinasikan beberapa spesies agens hayati, perlu diketahui interaksi antar spesies tersebut, apakah independen, sinergis atau malah saling bersifat antagonis.

Inokulasi buah kakao yang telah dipetik dengan patogen *P. palmivora* memunculkan pertanyaan apakah induksi resistensi, terutama yang terjadi secara sistemik masih akan bekerja atau bekerja tetapi berkurang keefektifannya. Selain itu, belum diketahui berapa lama masa inkubasi yang dibutuhkan CE sebelum mampu menginduksi ketahanan tanaman. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut akan metode-metode *screening* yang juga mengakomodir induksi resistensi.

Inokulasi daun bibit kakao yang dipetik untuk uji resistensi terhadap *P. palmivora* telah banyak dilakukan (Iwano *et al.*, 1997; Tahi *et al.*, 2006). Gejala nekrotik ataupun hawar tidak muncul dalam penelitian ini diduga karena daun yang diinokulasi dengan *P. palmivora* tidak rentan. Bailey *et al.* (2005) melaporkan bahwa tiap stadia dari daun bibit kakao (*unexpanded*, *young red*, *immature green* dan *mature green leaf*) memiliki ekspresi gen berbeda sebagai respon terhadap stress, termasuk patogen. Perlu diuji stadia daun yang rentan bila ingin melakukan pengujian yang sama di masa mendatang.

KESIMPULAN

Xylariaceae dan *C. gambosa* mampu menekan keparahan penyakit busuk buah masing-masing sebesar 38.8 dan 33.8%, diikuti oleh *R. friabile* dan *Aschersonia* sebesar 17.4 dan 12.7% namun tidak berbeda nyata dengan kontrol.

Isolat *Pestalotiopsis* dan *Fusarium* tidak efektif menekan keparahan penyakit. Tidak ada hubungan yang nyata antara produksi asam salisilat dan peroksidase dengan keparahan penyakit. Periode laten dari patogen sangat berkaitan dengan perkembangan keparahan penyakit busuk buah, setelah mampu melewati masa inkubasi maka laju infeksi tidak berbeda nyata antar perlakuan dan kontrol.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terimakasih disampaikan kepada PT Perkebunan VIII Saguling, Jawa Barat. Isolat yang digunakan merupakan hasil penelitian yang didanai STORMA-PROJECT (IPB-Goettingen-UNTAD), analisis kimia didanai oleh Prof. Dr. Meity Suradji Sinaga dan PT WISH Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, A.E., E.A. Herre. 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95:388-398.
- [AVRDC] Asian Vegetable Research Development Center. 2000. Phytophthora Blight. AVRDC Mycology.
- Bailey, B.A., H. Bae, M.D. Strem, D.P. Roberts, S.E. Thomas, J. Crozier, G.J. Samuels, I.Y. Choi, K.A. Holmes. 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. *Planta* 224:1449-1464.
- Bevilacqua, A.E., A.N. Califano. 1989. Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* 54:1076-1077, 1079.
- Bowers, J.H., B.A. Bailey, P.K. Hebbbar, S. Sanogo, R.D. Lumsden. 2001. The impact of plant diseases on world chocolate production. *Plant Health Progress*. <http://naldc.nal.usda.gov/download/11853/PDF> [February 20, 2011].
- Brodersen, P., F.G. Malinovsky, K. Hématy, M.A. Newman, J. Mundy. 2005. The role of salicylic acid in the induction of cell death in *Arabidopsis acd11*. *Plant Physiol.* 138:1037-1045.
- Do, H.M., J.K. Hong, H.W. Jung, S.H. Kim, J.H. Ham, B.K. Hwang. 2003. Expression of peroxidase-like genes, H₂O₂ production, and peroxidase activity during the hypersensitive response to *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* in *Capsicum annuum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16:196-205.
- Faeth S.H. 2002. Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos* 98:25-36.
- Ghosh, M. 2006. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. *Ann. Bot.* 98:1145-1153.
- Guest, D. 2007. Black pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathol.* 97:1650-1653.
- Hammerschmidt, R., E.M. Nuckles, J. Kuc. 1982. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Plant Pathol.* 20:73-82.
- Hanada, R.E., A.W.V. Pomella, H.S. Costa, J.L. Bezerra, L.L. Loguercio, J.O. Pereira. 2010. Endophytic fungal diversity in *Theobroma cacao* (cacao) and *T. grandiflorum* (cupuacu) trees and their potential for growth promotion and biocontrol of black-pod disease. *Fungal Biol.* 114:901-910.
- Herre, E.A., L.C. Mejía, D.A. Kylo, E. Rojas, Z. Maynard, A. Butler, S.A. Van Bael. 2007. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae. *Ecology* 88:550-558.
- Iwano, A.D., T.N. Sreenivasan, P. Umaharan. 1997. Foliar resistance to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in *Theobroma cacao*. *Plant Dis.* 81: 619-624.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Malamy, J., J.P. Carr, D.F. Klessing, I. Raskin. 1990. Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004.
- Mejia, L.C., E.I. Rojas, Z. Maynard, S. van Bael, A.E. Arnold, P. Hebbbar, G.J. Samuels, N. Robbins, E.A. Herre. 2008. Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol. Control* 46:4-14.
- Peng, M., J. Kuc. 1992. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathol.* 82:696-699.
- Pudjihartati, E., S. Ilyas, Sudarsono. 2006. Aktivitas pembentukan secara cepat spesies oksigen aktif, peroksidase, dan kandungan lignin kacang tanah terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati* 13:166-172.

- Quiroga, M., C. Guerrero, M.A. Botella, A. Barcelo', I. Amaya, M.I. Medina, F.J. Alonso, S.M.de Forchetti, H. Tigier, V. Valpuesta. 2000. A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122:1119-1127.
- Rubini, M.R., R.T. Silva-Ribeiro, A.W.V. Pomella, C.S. Maki, W.L. Araujo, D.R. dos Santos, J.L.Azevedo. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 1:24-33.
- Schulz, B, C. Boyle. 2005. The endophyte continuum. *Mycol. Res.*109:661-686.
- Segarra, G., E. Casanova, D. Bellido, M.A. Odena, E. Oliveira, I. Trillas. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics* 21:3943-3952.
- Shah, J. 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:365-371.
- Shirasu, K., H. Nakajima, V.K. Rajasekhar, R.A. Dixon, C. Lamb. 1997. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9:261-270.
- Tahi, G.M., B.I. Kébé, A. Sangare, F. Mondeil, C. Cilas, A.B. Eskes. 2006. Foliar resistance of cacao (*Theobroma cacao*) to *Phytophthora palmivora* as an indicator of pod resistance in the field: interaction of cacao genotype, leaf age and duration of incubation. *Plant Pathol.* 55:776-782.
- Van Damme, E.J.M., P. Willems, S. Torrekens, F. Van Leuven, W.I. Peumans. 1993. Garlic (*Allium sativum*) chitinases: characterization and molecular cloning. *Physiol. Plant* 87:177-186.
- Vlot, A.C., D.F. Klessig, S.W. Park. 2008. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:436-442.
- Xu, X.M., P. Jeffries, M. Pautasso, M.J. Jeger. 2011. Combined use of biocontrol agents to manage plant diseases in theory and practice. *Phytopathol.* 101:1024-1031.
- Yu, D., Y. Liu, B. Fan, D.F. Klessig, Z. Chen. 1997. Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiol.* 115:343-349.
- Zhang, C.L., B.O. Zheng, J.P. Lao, L.J. Mao, S.Y. Chen, C.P. Kubicek, F.C. Lin. 2008. Clavator and patulin formation as the antagonistic principle of *Aspergillus clavatoranicus*, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:833-840.