

TEKNIK PEMURNIAN BIAKAN MONOXENIC CMA DENGAN METODE CAWAN PETRI DAN TABUNG REAKSI

PURIFICATION TECHNIQUES OF MONOXENIC VAM CULTURE USING PETRIDISK AND TEST TUBE METHODS

Rr. Yudhy Harini Bertham

Program Pasca Sarjana Ilmu Pengetahuan Kehutanan, IPB

ABSTRACT

VAM is an obligate symbiont as it requires the existant of host plant to perform association in their roots. Consequently, its life cycle cannot be completed in absence of root tissues. This phenomenon make the natural production of mycorrhizae impractical. Techniques enabling of mass production of VAM spores used as biofertilizer in the field is, therefore, becoming important. Purpose of this study was to compare the effectiveness of spore production using petridisk and test tube and to characterize the morphological performance of three VAM, namely *Glomus*, *Gigaspora*, and *Acaulospora*. Results of the study indicated that 1) test tube culture produced more hyphae but took more time than petridisk culture; 2) hyphae life of *Gi margarita* was shorter than the other VAM and it was not determined by culture technique; 3) *Gi. margarita* showed a faster sporulation than the other VAM and it was consistent over the two culture techniques; and 4) The propagule mortality was lower in the test tube at similar rate over period of time, while in petridisk it tended to increased.

Key words : monoxenic culture, VAM, hyphae, *Glomus*, *Gigaspora*, sporulation

ABSTRAK

CMA merupakan simbiosis obligat karena memerlukan hadirnya tanaman inang yang dapat dikolonisasi agar terbentuk asosiasi akibatnya CMA tidak akan dapat melengkapi daur hidupnya secara normal kalau tidak ada jaringan akar. Ini membuat tidak praktisnya produksi cendawan mikoriza untuk aplikasi tanah. Karena itu diperlukan pengetahuan mengenai teknik-teknik untuk memproduksi spora CMA yang nantinya akan digunakan sebagai inokulum dalam jumlah besar untuk digunakan sebagai inokulan di lapangan dalam bentuk pupuk hayati. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas teknik cawan petri dan tabung reaksi dalam memproduksi spora sekaligus mempelajari ciri-ciri morfologis tiga spesies CMA yang diteliti yaitu *Glomus*, *Gigaspora*, dan *Acaulospora*. Dari percobaan ini dapat disimpulkan bahwa 1) pembentukan hifa pada kultur tabung reaksi sekalipun lebih lambat tapi jumlah hifa yang terbentuk lebih banyak, 2) umur hifa *Gi. margarita* relatif lebih singkat daripada umur hifa CMA lainnya dan umur itu tidak ditentukan oleh teknik yang digunakan, 3) sporulasi CMA ditentukan oleh teknik pengkulturannya dan spesiesnya. Sporulasi CMA berlangsung lambat pada kedua teknik yang diuji akan tetapi sporulasi *Gi. margarita* lebih cepat daripada sporulasi CMA lainnya dan tidak ditentukan oleh teknik kulturnya. Jumlah spora *Gi. margarita* yang bersporulasi pada cawan petri relatif lebih banyak daripada yang di tabung reaksi. *G. aggregatum* gagal bersporulasi, baik pada cawan petri maupun tabung reaksi., 4) angka kematian propagul CMA relatif lebih sedikit pada tabung reaksi dan itupun dari waktu ke waktu relatif tetap, ini berbeda halnya dengan kematian pada cawan petri yang relatif lebih tinggi dan relatif semakin meningkat.

Kata kunci : biakan monoxenic, CMA, hifa, *Glomus*, *Gigaspora*, sporulasi

PENDAHULUAN

Mikoriza Arbuskula (CMA) adalah salah satu anggota ordo Glomales (Morton, 1988), dan merupakan simbiosis mutualistik yang telah terbentuk semenjak 400 juta tahun yang lalu

(Simon *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1995). Simbiosis tersebut dibentuk pada sebagian besar tanaman vascular dan pada sekelompok kecil cendawan penghuni tanah. Pertukaran hara dan keuntungan lainnya yang diperoleh oleh CMA dan tanaman inang dari asosiasi CMA (Harley and Smith,

1983) cukup memadai untuk menggantikan investasi yang dibutuhkan untuk memelihara asosiasi tersebut (Azcon-Aguilar and Bago, 1994).

Ciri khas CMA terletak pada banyaknya arbuskula bercabang-cabang yang berkembang dalam sel-sel kortek tanaman. Arbuskula umumnya berumur pendek dan seringkali sulit diamati sekalipun dengan bantuan mikroskop. Struktur lain yang dibentuk oleh CMA adalah vesikula, sel-sel tambahan, hifa ekstra matrikal, dan spora. Vesikula adalah struktur ber dinding tipis yang berisi lemak dan biasanya terbentuk pada ruang interseluler. Fungsi utamanya adalah sebagai wahana penyimpanan dan propagul reproduktif. Spora dapat terbentuk di dalam akar tanaman dan di dalam tanah, tapi yang paling banyak dijumpai adalah di dalam tanah. Spora yang dibentuk oleh CMA adalah aseksual karena di bentuk dari diferensiasi vegetatif hifa. CMA juga akan membentuk jaringan luas hifa ekstra matrikal (Sylvia, 1999) yang berfungsi membantu aliran fosfor dari dalam tanah ke jaringan tanaman yang dikolonisasi oleh CMA (Jakobsen *et al.*, 1992).

Ordo Glomales terbagi menjadi dua sub ordo berdasarkan ada tidaknya vesikula yaitu (i) sub-orde Glomineae yang dicirikan oleh adanya vesikula di dalam akar dan pembentukan kladospora dari hifanya, dan (ii) sub-orde Gigasporinae yang dicirikan tidak adanya vesikula dalam akar dan adanya pembentukan sel-sel tambahan dan azigospora dalam tanah. Ordo Glomales dibagi lagi menjadi beberapa familia dan genera berdasarkan pembentukan sporanya, spora CMA bersifat khusus dan diameternya berkisar antara 10 sampai > 10000 μm . Warna sporanya beraneka macam mulai dari hyaline sampai hitam dan tekstur permukaannya mulai dari halus sampai kasar. Kurang lebih ada 150 spesies CMA yang berhasil dikenali, namun demikian taksonomi pada aras spesiesnya masih terus berkembang dan banyak mengalami revisi.

CMA merupakan simbiosis obligat karena memerlukan hadirnya tanaman inang yang dapat dikolonisasi agar terbentuk asosiasi akibatnya CMA tidak akan dapat melengkapi daur hidupnya secara normal kalau tidak ada jaringan akar. Ini membuat tidak praktisnya produksi cendawan mikoriza untuk aplikasi tanah. Karena itu diperlukan pengetahuan mengenai teknik-teknik untuk

memproduksi spora CMA yang nantinya akan digunakan sebagai inokulum dalam jumlah besar untuk digunakan sebagai inokulan di lapangan dalam bentuk pupuk hayati. Para peneliti telah melaporkan kemungkinan penggunaan teknik *in vitro* atau kultur *monoxenic* sebagai salah satu teknik perbanyakan spora CMA yang nantinya akan digunakan sebagai inokulum CMA (Bago *et al.*, 1996; Villegas *et al.*, 1996; Pawloswska *et al.*, 1999). Masing-masing metoda tersebut memiliki keunggulannya sendiri-sendiri.

Perkecambahan dari spora CMA *in vitro* sulit untuk diduga. Daniel dan Graham pernah melaporkan kecenderungan menurunnya daya perkecambahan dari spora *Glomus mosseae* walaupun spora tersebut baru saja dipanen. Tetapi peneliti yang lain menemukan hasil lain yakni walaupun spora *Glomus mosseae* telah disimpan beberapa bulan ternyata masih dapat berkecambah dalam jumlah yang banyak. Percobaan-percobaan telah dilakukan pada tanah-tanah dengan berbedabeda kadar airnya. *Glomus epigaeum* ternyata berkecambah paling baik pada kandungan air di antara kapasitas lapang dan kandungan air jenuh (Menge, 1984). Di bawah kapasitas lapang perkecambahan menurun drastis sedang pada di bawah potensial air - 31 bar tidak ada perkecambahan sama sekali. Perkecambahan *Gigaspora* spp akan menurun pada kondisi water potensial yang rendah juga ini mempengaruhi pertumbuhan hifanya. Pada -10 bar perkecambahan sangat drastis menurun.

Perkecambahan dari spora tidak begitu dipengaruhi oleh kesuburan tanah (Menge, 1984). Penambahan nitrogen dan kalium dapat merangsang atau menghambat perkecambahan. Penambahan Fosfor dapat merangsang perkecambahan tetapi penambahan nitrogen dan potasium kurang ada pengaruhnya. Di dalam kondisi tanah yang subur, perkecambahan dari spora agak terhambat tetapi apabila tingkat dari kadar glucose menurun perkecambahan akan meningkat lagi. Ada kemungkinan kegiatan mikroba dalam tanah akan mengakibatkan penguraian dinding spora atau hyperparasitis pada spora CMA, akibatnya akan mengurangi kemampuan berkecambah dari spora
pH optimum untuk perkecambahan spora pada masing-masing jenis CMA berbeda pada lingkungan yang tak sama. Misalnya untuk

Glomus mosseae biasanya pada tanah alkali dapat berkecambah dengan baik yaitu pada pH 6 – 9. sedangkan spora dari *Gigaspora coralloidea* dan *Gigaspora heterogama* dari jenis yang lebih asam dapat berkecambah dengan baik pada pH 4 – 6. pH optimum untuk perkecambahan nampaknya tergantung kepada daya adaptasi CMA terhadap lingkungan, misalnya terhadap suhu optimum dan juga tergantung kepada jenis CMANYa. *Gigaspora* sp. dapat tumbuh dan berkecambah dengan baik pada suhu 25 – 35 °C sedangkan *Glomus mosseae* yang berasal dari daerah lebih dingin perkecambahannya yang terbaik yakni pada suhu 18 – 20 °C

Dalam penelitian ini akan dibandingkan tehnik cawan petri dan tabung reaksi untuk menentukan efektivitasnya dalam produksi spora sekaligus mempelajari ciri-ciri morfologis tiga spesies CMA yang diteliti yaitu *Glomus*, *Gigaspora*, dan *Acaulospora*.

METODE PENELITIAN

Bahan yang digunakan dalam percobaan ini adalah biji *Pueraria*, Zeolit asal Jawa Barat dengan ukuran 2 mm, PVLG, Melzer, aluminium foil, isolat CMA *Gigaspora margarita* FL-105, *Glomus manihotis* INDO-1, *Glomus etunicatum* NPI-126, *Glomus agregatum* OG-5, dan *Acaulospora tuberculata* INDO-2, larutan hyponex merah (1 g hyponex merah dilarutkan dalam 2 L air distilasi). Sedangkan alat yang digunakan adalah: pinset mikro, botol semprot, mikroskop stereo, mikroskop majemuk, cawan petri plastik berdiameter 8 cm yang telah dilubangi pada sampingnya, tabung reaksi ukuran 2,5 x 15 cm, rak, nampan plastik dan air distilasi.

Zeolit yang digunakan sebagai media monoxenic dicuci hingga bersih kemudian di-autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Biji *Pueraria* dikecambahkan dalam nampan plastik menggunakan zeolit steril sebagai media tumbuhnya. Bibit yang sudah memiliki dua buah daun (umur ± 2 minggu) digunakan sebagai tanaman inang pada kedua metoda yang akan diuji. Seratus spora dari setiap isolat CMA dikulturkan secara monoxenic, yang 50 buah dikulturkan pada cawan petri dan 50 buah lainnya pada tabung reaksi.

Setiap isolat CMA dikulturkan 5 kali sehingga secara keseluruhan terdapat 250 buah kultur monoxenic cawan petri dan 250 buah kultur monoxenic tabung reaksi.

Metode cawan petri:

Bibit *Pueraria* ditumbuhkan dalam cawan petri berisi zeolit steril, dengan posisi bagian batang kecambah diletakkan pada bagian petri yang sudah dilubangi, pada bagian akar lateral diletakkan satu spora kemudian di tutup. Bagian tepi cawan petri direkatkan dengan isolasi dan kemudian dibungkus dengan aluminium foil agar tidak ditumbuhi cendawan. Bagian bawah Cawan petri kemudian diletakkan pada nampan plastik yang berisi air untuk menjaga kelembaban zeolit. Nampan plastik dan cawan petrinya kemudian di letakkan di rak yang atasnya diberi lampu TL (neon) 20 watt. Pada umur dua (2) minggu setelah tanam bibit di semprot dengan larutan hyponex merah, penyemprotan ini diulangi setiap minggu sampai umur 3 bulan setelah tanam.. Perkembangan hifa dan sporulasi diamati pada umur 1 bulan setelah tanam dan seterusnya dilakukan pengamatan setiap seminggu sekali.

Metode tabung reaksi:

Tabung reaksi ukuran 2,5 × 15 diisi zeolit steril sebanyak tiga perempat dari panjang tabung reaksi. Bibit ditanamkan dalam tabung reaksi, miringkan posisinya ketika meletakkan tanaman, kemudian letakkan satu spora pada bagian akar lateral. Bibit *Pueraria* diletakkan dengan posisi menghadap ke atas dan bagian yang di inokulasi dengan mikoriza menghadap dinding kaca. Ketuk dengan jari tangan agar zeolit letaknya rata dan kemudian disiram dengan air distilasi. Bagian luar tabung reaksi kemudian dibungkus dengan aluminium foil agar tidak ditumbuhi cendawan. Tabung reaksi petri kemudian diletakkan di rak yang atasnya diberi lampu TL (neon) 20 watt. Pada umur dua (2) minggu setelah tanam bibit di semprot dengan larutan hyponex merah, penyemprotan ini diulangi setiap minggu sampai umur 3 bulan setelah tanam. Jika media terlihat mengering dilakukan penyemprotan dengan air

distilasi. Perkembangan hifa dan sporulasi diamati pada umur 1 bulan setelah tanam dan seterusnya dilakukan pengamatan setiap seminggu sekali.

Analisis Data

Data yang dikumpulkan berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif adalah data hasil pengamatan morfologi spora dan miselia cendawan pada masing-masing kultur, yaitu berupa warna spora pada PVLG dan Melzer, dan bentuk spora. Data kuantitatif adalah data yang diperoleh dari hasil penghitungan jumlah dinding spora, jumlah spora yang belum berkecambah, jumlah miselium, jumlah sporulasi dan jumlah spora mati. Jumlah dinding spora dihitung langsung di bawah mikroskop dan tidak dianalisis secara statistik. Data kuantitatifnya merupakan penjumlahan pengamatan pada ke 50

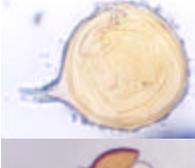
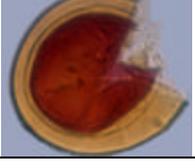
cawan petri atau tabung reaksi dan kemudian dikuantifikasikan dalam bentuk persen.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi CMA

Lima isolat yang diuji memperlihatkan morfologi yang berbeda-beda satu dengan lainnya (Tabel 1), warnanya pada PVLG cenderung mirip, hanya *Gi. margarita* dan *A. tuberculata* yang mampu mengubah warna Melzer, ukuran sporanyapun beragam antar spesies. Tiga spesies *Glomus* memperlihatkan warna yang berbeda mulai dari putih tembus pandang sampai jingga, ukuran spora dan dinding sporanya juga berbeda. Karena morfologi berbeda maka kelima jenis isolat yang diuji juga akan menghasilkan reaksi yang berbeda-beda.

Tabel 1. Morfologi lima jenis isolat CMA

Jenis isolat	Warna pada PVLG	Warna pada Melzer	Ukuran spora (μm)	Jumlah dinding spora	Bentuk spora
<i>Gi. margarita</i> (FL-105)	Kuning sampai kuning kecoklatan	Merah tua	2600-4000	3 lapis (INVAM)	
<i>G. etunikatum</i> (NPI-126)	Jingga sampai merah kecoklatan	Tidak ada perubahan	60-160	2 lapis (INVAM)	
<i>G. agregatum</i> (OG 105)	Kuning jernih	Tidak ada perubahan	45-60	2 lapis (INVAM)	
<i>G. manihotis</i> (INDO-1)	Putih sampai kuning kecoklatan	Tidak ada perubahan	100-260	3 lapis (INVAM)	
<i>A. tuberculata</i> (INDO-2)	Jingga ke kuningan sampai merah ke coklatan	Merah tua pada bagian tengahnya	120-280	3 lapis (INVAM)	

Sporulasi dan hifa CMA

Pada minggu ke 4 setelah kultur dimulai, empat spesies CMA sudah membentuk hifa jika dikembangkan di kultur cawan petri sedangkan pada tabung reaksi hanya dua spesies yang sudah membentuk hifa (Tabel 2). *G. aggregatum*, baik pada cawan petri maupun tabung reaksi, belum membentuk hifa pada minggu ke empat. Persentase pembentukan hifa tertinggi pada minggu

ke empat dicapai oleh *Gi. margarita*, yaitu sebesar (58% pada kultur cawan petri), akan tetapi sejalan dengan waktu hifa CMA tersebut mengalami kematian. Pada minggu ke 20 persentase hifa tertinggi justru dicapai oleh *G. aggregatum* yaitu sebesar 38% pada kultur tabung reaksi. Sekalipun pembentukan hifanya lambat, keempat spesies CMA selain *Gi. margarita*, justru hifanya lebih mampu bertahan lama.

Tabel 2. Pembentukan hifa CMA pada minggu ke 4 sampai 20 setelah pengkulturan

CMA	Kultur cawan petri					Kultur tabung reaksi				
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
<i>G. manihotis</i> (INDO-1)	5	7	10	7	7	0	7	18	12	12
<i>G. etunicatum</i> (NPI-126)	2	9	7	6	7	0	5	9	12	9
<i>G. aggregatum</i> (OG-105)	0	0	5	11	15	0	2	11	16	19
<i>Gi. margarita</i> (FL-105)	29	7	6	0	0	25	19	0	0	0
<i>A. tuberculata</i> (INDO-2)	4	8	4	8	8	3	7	13	6	7

Pembentukan spora pada umumnya baru dimulai setelah minggu ke delapan itupun hanya terjadi pada *Gi. margarita* (Tabel 3). Persentase sporulasi tertinggi juga tetap dicapai oleh *Gi. margarita* yaitu 88% dan 86% untuk kultur cawan petri dan tabung reaksi. Sporulasi pada kultur tabung reaksi sekalipun tidak setinggi pada kultur cawan petri namun relatif lebih stabil. *A.*

tuberculata menduduki ranking kedua setelah *Gi. margarita* dan itupun hanya terjadi pada kultur tabung reaksi. *G. aggregatum* praktis tidak mampu membentuk spora pada kultur tabung reaksi sedangkan pada kultur cawan petri pembentukan sporanya sangat lambat. Pada umumnya pembentukan spora pada kultur tabung reaksi relatif lebih cepat dan persentasenya juga lebih tinggi.

Tabel 3. Perkembangan sporulasi CMA pada minggu ke 4 sampai 20 setelah pengkulturan

CMA	Kultur cawan petri					Kultur tabung reaksi				
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
<i>G. manihotis</i> (INDO-1)	0	0	2	7	10	0	0	5	16	18
<i>G. etunicatum</i> (NPI-126)	0	0	5	6	12	0	0	6	8	14
<i>G. aggregatum</i> (OG-105)	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0
<i>Gi. margarita</i> (FL-105)	0	26	33	0	49	0	14	35	43	43
<i>A. tuberculata</i> (INDO-2)	0	0	8	8	14	0	5	10	16	20

Angka kematian spora pada kedua kultur yang diuji relatif sama (Tabel 4) yaitu berkisar antara 6 – 20% pada minggu keempat dan 14 – 20% pada minggu ke dua puluh. Persentase ke-

matian terendah dicapai oleh *G. aggregatum* pada kultur cawan petri dan *Gi. margarita* pada kultur tabung reaksi. Angka-angkanya memang tidak terlalu jauh berbeda satu dengan yang lainnya.

Tabel 4. Propagul CMA yang mati pada minggu ke 4 sampai 20 setelah pengkulturan

CMA	Kultur cawan petri					Kultur tabung reaksi				
	4	8	12	16	20	4	8	12	16	20
<i>G. manihotis</i> (INDO-1)	3	3	10	10	11	3	3	6	8	8
<i>G. etunicatum</i> (NPI-126)	10	11	12	12	12	10	10	10	10	10
<i>G. aggregatum</i> (OG-105)	3	4	6	7	9	4	4	10	11	11
<i>Gi. margarita</i> (FL-105)	11	11	11	11	11	7	7	7	7	7
<i>A. tuberculata</i> (INDO-2)	10	10	12	12	12	3	6	8	8	8

Persentase kematian *G. manihotis* dan *G. aggregatum* cenderung semakin meningkat seiring dengan berjalannya waktu sedangkan pada tiga spesies lainnya cenderung tetap. Ini menunjukkan bahwa *G. etunicatum*, *Gi. margarita*, dan *A. tuberculata* relatif lebih mampu beradaptasi dengan kondisi media zeolit dalam cawan petri ataupun tabung reaksi jika dibandingkan dengan *G. manihotis* dan *G. aggregatum*.

Jumlah hifa CMA yang terbentuk pada teknik tabung reaksi memang relatif lebih banyak namun pembentukannya justru lebih lambat daripada yang di cawan petri. CMA (Tabel 2). *Gi. margaritas* sekalipun paling cepat membentuk hifa, itupun dengan jumlah yang paling banyak, namun hifa tersebut tidak mampu bertahan lama. Hifa *Gi. margarita* yang ada di tabung reaksi mengalami kematian yang paling cepat. Sebaliknya *G. aggregatum* sekalipun lambat membentuk hifa tapi pada akhir pengamatan justru hifanya yang paling banyak. *G. manihotis* dan *G. etunicatum* memang lebih cepat membentuk hifa pada cawan petri tapi jumlah akhirnya tidak sebanyak pada tabung reaksi. Secara umum dapat dikatakan bahwa sekalipun lambat membentuk hifa tapi CMA pada teknik tabung reaksi lebih banyak membentuk hifa. Umur hifa *Gi. margarita* tidak ditentukan oleh teknik yang digunakan dan lebih singkat dibandingkan dengan CMA lainnya. Hifa ekstraradikal merupakan organ CMA terpenting untuk serapan dan translokasi hara (Sylvia, 1990) tanaman inang. Semakin lama hifa bertahan hidup berarti semakin besar peluang tanaman memperoleh hara dari dalam tanah (Abbot *et al.*, 1992).

Sporulasi pada umumnya terjadi antara minggu ke 4 – 8 setelah pengkulturan dan rerata sporulasi kelima spesies CMA relatif lebih banyak pada tabung reaksi sekalipun perbedaannya

tidak terlalu menyolok. Relatif lambat sporulasi pada hampir semua CMA yang diuji diduga berkaitan erat dengan lambat zeolit melepaskan hara fosfat padahal fosfat dibutuhkan untuk sporulasi CMA (Abbot *et al.*, 1992). Sporulasi *Gi. margarita* lebih cepat daripada sporulasi CMA lainnya dan tidak ditentukan oleh teknik kulturnya. Akan tetapi jumlah spora *Gi. margarita* yang bersporulasi pada cawan petri relatif lebih banyak daripada yang di tabung reaksi. *G. aggregatum* tercatat tidak melakukan sporulasi, baik pada cawan petri maupun tabung reaksi. Sporulasi pada tiga spesies lainnya berlangsung sama lambatnya dan jumlah sporulasi terbanyak terdapat pada tabung reaksi. Lebih dulunya sporulasi pada *Gi. margarita*, baik pada teknik cawan petri maupun pada teknik tabung reaksi, diduga karena (i) satu spora *Gigaspora* dapat berkecambah sebanyak 8 kali sedangkan spora *Glomus* hanya berkecambah sekali, (ii) mantel spora *Gi. margarita* lebih lunak dibandingkan dengan mantel *Glomus*, (iii) sporulasi dipengaruhi oleh suhu lingkungan, suhu ruang pada saat penelitian berkisar dari 26 – 30 °C. Suhardi (1989) menunjukkan bahwa *Gigaspora* sp dapat tumbuh dan berkecambah baik pada suhu 25 – 35 °C, sedangkan *Glomus mosseae* yang berasal dari daerah lebih dingin dapat berkecambah dengan baik pada suhu 18 – 20 °C. Relatif lebih banyaknya sporulasi pada tabung reaksi diduga karena tabung reaksi volumenya relatif lebih kecil sehingga penyediaan air dan hara relatif lebih mudah daripada cawan petri.

Angka kematian propagul CMA relatif lebih sedikit pada tabung reaksi dan itupun dari waktu ke waktu relatif tetap berbeda halnya dengan kematian pada cawan petri yang relatif lebih tinggi dan relatif semakin meningkat. Angka kematian tertinggi sesungguhnya terjadi pada umur 1-2

minggu setelah kultur dimulai. Penyebabnya adalah pencahayaan dalam ruangan yang tidak memadai. Namun setelah setelah cahaya diatur sedemikian rupa, hambatan pertumbuhan menjadi banyak berkurang. Hetrick (1984) menyatakan bahwa penyinaran dengan periode 12 jam atau lebih mungkin lebih penting dari pada intensitas sinar yang tinggi tetapi pendek dalam meningkatkan kolonisasi akar. Sebaliknya, dengan panjang hari penyinaran yang sesuai, peningkatan intensitas sinar dapat meningkatkan kolonisasi, namun pengaruhnya terhadap produksi spora kurang begitu nyata.

pH medium dan air penyiram tampaknya perlu diperhatikan dalam pembuatan kultur monoxenic. Setiadi (2002) menyatakan bahwa perkembangan spora setiap spesies CMA berkaitan erat dengan pH medium, CMA yang diisolasi dari tanah masam cenderung lebih menyukai pH rendah (Sieverding, 1991). Perkecambahan spora *Acaulospora laevis* optimum pada pH 4,5 dan kapasitas perkecambahan itu akan menurun 10% jika kondisi mediumnya netral atau alkalin (Hepper, 1984). Sebaliknya, *Glomus* spp. menginginkan pH netral sampai alkalin untuk perkecambahan optimumnya (Siquera *et al.*, 1984). Media zeolit pada umumnya memiliki pH > 7,4 (Barbarick and Pirela, 1984). Kondisi tersebut terlalu alkalin untuk perkembangan CMA asal tanah mineral masam.

Zeolit merupakan mineral silikat berongga yang mempunyai kapasitas tukar kation (KTK) sangat tinggi (berkisar antara 80 sampai 180 meq 100 g^{-1}) tergantung dari kadar zeolitnya. Sebagai akibatnya zeolit mempunyai kemampuan menukarkan kation-kationnya dengan kation lain. Kation-kation dalam zeolit yang berguna bagi tanaman adalah K^+ dan Ca^{2+} . Di samping itu, rongga-rongga di dalam zeolit memiliki ukuran yang sesuai dengan ukuran ion NH_4^+ sehingga zeolit mempunyai daya jerap yang tinggi terhadap NH_4^+ (Goto, 1990). Sifat ini dimanfaatkan untuk mempromosikan zeolit sebagai bahan pupuk penyedia lambat (*slow release fertilizer*). Kandungan zeolit sangat beragam dari satu tempat ke tempat lain ditentukan ada tidaknya mineral lain di dalamnya, misalnya monmorilonit, feldspar, atau kuarsa. Rendahnya kandungan mineral zeolit

pada bahan zeolit berpengaruh terhadap kemampuan zeolit menjerap kation (Suwardi, 1991). Zeolit baik sebagai media tanaman karena bersifat stabil, tidak mudah berubah atau rusak karena siraman air.

Zeolit yang digunakan dapat dari jenis klinoptilolit, atau mordenit, atau jenis yang lain. Klinoptilolit umumnya mengandung K tinggi, sedangkan mordenit mengandung Ca tinggi. Kedua unsur tersebut sangat penting bagi tanaman. Namun yang lebih penting dari zeolit bukan jenisnya melainkan nilai KTK nya. Sedapat mungkin zeolit yang digunakan mempunyai KTK lebih dari 100 meq per 100g. Nilai KTK yang tinggi diperlukan untuk menjerap sementara NH_4^+ sehingga dapat berfungsi untuk mempertahankan kapasitas lapang serendah mungkin. Karena KTK zeolit sangat bervariasi dari satu deposit ke deposit lain (Suwardi *et al.*, 1994) maka perlu terlebih dahulu dilakukan penetapan KTK sebelum zeolit digunakan, zeolit yang digunakan sebaiknya berukuran 2 mm. Jika terdapat fraksi halus cukup banyak aerasinya berkurang dan mengakibatkan perkembangan akar akan terganggu.

Sekalipun kultur CMA monoxenic merupakan kultur buatan, namun teknik ini merupakan pendekatan yang memungkinkan kita untuk lebih mudah memahami perilaku CMA. Kultur monoxenic terbukti cocok untuk kajian fisiologis miselium ekstradikal CMA (Bago *et al.*, 1996; Villegas *et al.*, 1996). Sistem kultur demikian cocok untuk mengaji perkembangan miselium tanpa perlu khawatir akan adanya gangguan akibat munculnya hifa cendawan tanah lainnya yang sulit dibedakan dengan hifa CMA. Kesulitan pengamatan struktur hifa yang berkembang di dalam agregat tanah akan tersingkirkan karena di gunakannya media zeolit dengan wadah yang tembus pandang dalam kultur monoxenic tersebut.

KESIMPULAN

Pembentukan hifa pada kultur tabung reaksi sekalipun lebih lambat tapi jumlah hifa yang terbentuk lebih banyak.

Umur hifa *Gi. margarita* relatif lebih singkat daripada umur hifa CMA lainnya dan umur itu tidak ditentukan oleh teknik yang digunakan.

Sporulasi CMA ditentukan oleh teknik pengkulturan dan spesiesnya. Sporulasi CMA berlangsung lambat pada kedua teknik yang diuji akan tetapi sporulasi *Gi. margarita* lebih cepat daripada sporulasi CMA lainnya dan tidak ditentukan oleh teknik kulturnya. Jumlah spora *Gi. margarita* yang bersporulasi pada cawan petri relatif lebih banyak daripada yang di tabung reaksi. *G. aggregatum* gagal bersporulasi, baik pada cawan petri maupun tabung reaksi.

Angka kematian propagul CMA relatif lebih sedikit pada tabung reaksi dan itupun dari waktu ke waktu relatif tetap, ini berbeda halnya dengan kematian pada cawan petri yang relatif lebih tinggi dan relatif semakin meningkat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbot, K.L., A.D. Robson, D.A. Jasper, and C. Gazey. 1992. What is the role of VA mycorrhizal hyphae in soil. Pages 37-41 in D. J. Read, D.H. Lewis, A.H. Fitter, I.J. Alexander, eds. Mycorrhizas in Ecosystems. CAB International, Wallingford, UK.
- Azcon-Aguilar, C. and B. Bago. 1994. Physiological characteristics of the host plant promoting and undisturbed functioning of the mycorrhizal symbiosis. Pages 47-60. in S. Gianinazzi and H. Schuepp, eds. Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Bago, B., H. Vierheiling, Y. Piche, and C. Azcon-Aguilar. 1996. Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytol.* 133: 273-218
- Barbarick, K.A. and H.J. Pirella. 1984. Agronomic and horticultural uses of zeolites. A review. Pages 93-103 in W.G. Pond and F.A. Mumpton, eds. *Zeo-Agriculture. Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture.* Westview Press, Boulder, Colorado.
- Goto, I. 1990. The application of zeolite on soil improvement. *Zeolite.* 7(3): 8-15
- Harley, J.L. and S.E. Smith. 1983. *Mycorrhizal Symbiosis.* Academic Press, New York.
- Hepper, C.M. 1984. Isolation and culture of mycorrhizal (VAM) fungi. *Methods in Microbiology* 24: 1-21
- Hetrick, B.A.D. 1984. Ecology of VA mycorrhizal fungi. Pages 35-55 in C.L. Powell and D.J. Bagyaraj, eds. *VA Mycorrhiza.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Jakobsen, I.L.K. Abbott, and A.D. Robson. 1992. The spread of external hyphae of VA mycorrhizas through root-free soil. p.152 in M.F. Allen and S.E. Williams, eds. Abstracts of the Eight North American Conference on Mycorrhizae, 1990, Laramie, University of Wyoming.
- Menge, J.A. 1984. Inoculum production. Pages 187-203 in C.L. Powell and D.J. Bagyaraj. *VA Mycorrhiza.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Morton, J.B. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: Classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.
- Pawlowska, T.E., D.D. Douds, and I. Charvat. 1999. In vitro propagation and life cycle of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus etunicatum.* *Mycol. Res.* 103:1549-1556.
- Setiadi, Y. 2002. Teknik produksi inokulum mikoriza untuk rehabilitasi lahan. *J. Manajemen Hutan Tropika* VIII(1): 51-64
- Sieverding, E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Development in Tropical Agro-systems. GTZ, Eschborn, Germany.
- Simon, L., J. Bousquet, R. Levesque, and M. Lalonde. 1993. Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* 363: 67-69
- Siquera, J.O., H. Hubbel, and A.W. Mahmud. 1984. Effect of liming on spore germination, germ tube growth and root colonization by vesicular-arbuscular fungi. *Plant Soil* 76: 115-124
- Suwardi, Goto, I., and M. Ninaki. 1994. The quality of natural zeolites from Japan and Indonesia and their application effect for soil amendment. *Journal of Agricultural Sci.* 39 (3): 133-143.
- Suwardi. 1991. The Mineralogi and Chemical Properties of Natural Zeolites and Their Appli-

- cation Effects for Soil Amendment. Lab. of Soil Sci., Dept. of Agric. Chem., Tokyo Univ. of Agric.
- Sylvia, D.M. 1990. Distribution, structure, and function of external hyphae of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Pages 144-167. *in* J.E. Box and L.H. Hammond, eds. *Rhizosphere Dynamics*. Westview Press, Boulder, Colorado.
- Sylvia, D.M. 1999. Fundamentals and applications of arbuscular mycorrhizae: A biofertilizer perspectives. Pages 1-19 *in* J.O Siquera, F.M.S Moreira, A.S. Lopes, L.R.G. Guilherme, V. Faquin, A.E. Furtini Neto, J.G. Carvalho, eds. *Soil Fertility, Soil Biology, and Plant Nutrition Interrelationships*. Sociedade Brasileira de Ciencia do Solo, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciencia do Solo.
- Taylor, T.N., W. Remmy, H. Hass, and H. Kerp. 1995. Fossil arbuscular mycorrhizae from the Early Devonian. *Mycologia* 87: 560-575
- Villegas, J., R.D. Williams, L. Nantais, J. Archmbault, and J.A. Fortin. 1996. Effects of N sours on pH and nutrient exchange of extramatrical mycellium in a Ri T DNA trasformed root system. *Mycorrhiza* 6: 247-251