



Eksplorasi *Fusarium* Spp yang Berasosiasi Dengan *Aquillaria* Spp di Kabupaten Nunukan Kalimantan Utara

NURBAYA¹, TUTIK KUSWINANTI², BAHARUDDIN², ADE ROSMANA²,
SYAMSUDDIN MILLANG³

¹Pasca Sarjana Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Makassar 90245
¹State Vocational High School – 1,
Nunukan, Kalimantan Timur 77842
email: nurbaya_bima@yahoo.co.id

²Jurusan Hama dan Penyakit Tanaman, Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Makassar 90245

³Fakultas Kehutanan, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan Km 10 Makassar 90245

ABSTRAK

Fusarium spp adalah salah satu isolat cendawan yang berasosiasi dengan tanaman *Aquillaria* spp untuk menghasilkan gaharu sebagai hasil hutan bukan kayu. Penelitian ini mengambil sampel dari batang *Aquillaria* spp yang menunjukkan gejala pembentukan gaharu yang tumbuh secara alami pada ketinggian yang berbeda, mulai dari ketinggian 0-2000 mdpl, yang ada pada empat Kecamatan yaitu: Kecamatan Nunukan Selatan (0-100 mdpl), Lumbis (100-500 mdpl), Krayan Induk (1000-1500 mdpl), Krayan Selatan (1000-2000 mdpl) di Kabupaten Nunukan Kalimantan Utara. Tujuan penelitian ini untuk mendapatkan informasi mengenai isolat-isolat *Fusarium* pembentuk gaharu dari batang *Aquillaria* spp. Isolat *Fusarium* diperoleh dengan mengamati pertumbuhan morfologi cendawan pada media PDA. Hasil yang diperoleh diidentifikasi secara molekuler menggunakan jenis primer LSU. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada batang *Aquillaria* spp yang tumbuh pada ketinggian 0-100 mdpl terinfeksi oleh *F. solani*, ketinggian 100-500 mdpl terinfeksi oleh *Fusarium* sp, *F. fujikuroi* dan *F. oxysporum*, ketinggian 1000-1500 mdpl terinfeksi oleh *F. solani*, sedangkan *Aquillaria* spp yang tumbuh pada ketinggian 1000-2000 mdpl terinfeksi oleh *F. solani*, *F. oxysporum* dan *F. ambrosium*

Kata Kunci: *Aquillaria* spp, cendawan, eksplorasi, *Fusarium*

PENDAHULUAN

Tanaman gaharu merupakan tanaman yang dapat tumbuh di dataran rendah hingga dataran tinggi dan hampir semua jenis tanah dapat ditumbuhi tanaman gaharu. Tanaman ini adalah salah satu komoditi hasil hutan bukan kayu (HHBK) yang memiliki nilai ekonomis tinggi, karena memiliki banyak manfaat seperti: sebagai bahan dasar pembuatan parfum, pewangi ruangan, dupa, kosmetik dan obat tradisional (Sudrajat, 2003). Gaharu juga digunakan dalam ritual kepercayaan dan upacara keagamaan serta benda-benda rohani seperti tasbih dan Rosario (Barden *et al*, 2000). Sehingga gaharu memiliki nilai yang multiguna.

Eksplorasi hutan alam tropis dan perburuan gaharu yang tidak terkendali telah

mengakibatkan spesies-spesies gaharu menjadi langka. Untuk itu pada tahun 1995 CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) telah memasukkan *Aquillaria malaccensis*, dalam Appendix II dan pada tahun 2004 seluruh spesies *Aquillaria* spp., dan *Gyrinops* spp., dimasukkan dalam Appendix II, tujuannya untuk melindungi spesies agar tidak punah (Semiadi *et al*, 2009). Sebagai komoditas yang memberikan penghasilan yang sangat besar di Indonesia, maka pemanfaatannya secara berkesinambungan harus dapat dijaga (Sulistyo, 2010).

Kebanyakan gaharu ditemukan pada pohon gaharu yang terluka, baik secara alami oleh faktor abiotik seperti angin, hujan atau petir, maupun secara biotik oleh



mikroorganisme. Faktor abiotik sulit ditiru karena tidak dapat dijadikan dasar pada proses produksi dalam industri (Mucharromah, 2010), selain itu faktor abiotik tidak sistemik yang bisa menyebar ke bagian lain dari tanaman kayu yang masih dianggap sehat (Santoso *et al*, 2010). Sedangkan pembentukan gaharu oleh faktor biotik dapat disebabkan oleh mikroorganisme (Mucharromah, 2010). Mekanisme pembentukan gaharu oleh mikroorganisme dapat menyebar kebagian lain dari tanaman karena penyebab mekanisme ini adalah organisme yang melakukan semua aktivitas yang diperlukan untuk kehidupannya (Santoso *et al*, 2010).

Mikroorganisme yang biasa dijumpai menginfeksi dan sebagai pembentuk gaharu adalah cendawan seperti: *Fusarium* spp., *Phytium* sp., *Lasiodiplodia* sp., *Libertela* sp., *Trichoderma* sp., *Syctalidium* sp., dan *Thielaviopsis* sp. Namun spesies yang paling

dominan adalah *Fusarium* (Sumarna, 2002), yaitu: *F. solani*, (Mart) Appel & Wollenw., *F. lateritium* Ness., *F. tricinctum* (Corda) Sacc., dan *F. moniliformae* Sheldon., yang dapat menginfeksi gaharu (Budi *et al*, 2010).

Berdasarkan hal tersebut diatas maka perlu dilakukan penelitian keragaman isolat *Fusarium* yang dapat menghasilkan gaharu pada *Aquillaria* spp sehingga dapat mengembalikan status komoditi dari kelangkaan atau kepunahan menjadi produk andalan.

METODE

Penelitian keragaman *Fusarium* spp dilaksanakan di Divisi Bioteknologi Pertanian Pusat Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi LP2M dan Laboratorium Terpadu Universitas Hasanuddin Makassar. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2014.

Tabel 1. Lokasi dan Ketinggian Tempat Pengambilan Sampel Isolat

No.	Lokasi dan Ketinggian Tempat Pengambilan Sampel (mdpl)	Kode Isolat
1	Nunukan Selatan (0-100)	NKS
2	Lumbis (100-500)	LM
3	Krayan Induk (1000-1500)	KR
4	Krayan Selatan (1000-2000)	KRS

Tahap Identifikasi Secara Morfologi.

Morfologi cendawan yang diamati harus dilakukan melalui peremajaan terlebih dahulu. Bahan induk untuk peremajaan menggunakan isolat yang sudah dimurnikan. Peremajaan isolat bertujuan untuk memacu pembentukan struktur reproduksi/morfologi cendawan. Media yang digunakan untuk peremajaan isolat adalah: media PDA. Media PDA yang telah disterilisasi dan dituangkan ke dalam cawan petri, dibiarkan hingga membeku, selanjutnya isolat cendawan dimasukkan ke dalam media yang telah disiapkan dengan menggunakan jarum ose di dalam *Laminar air flow cabinet*, kemudian kultur diinkubasi sesuai waktu yang ditentukan. Pengamatan morfologi cendawan dilakukan dengan beberapa tahapan yaitu: (1) Mengukur dan mengamati laju pertumbuhan koloni cendawan dan warnanya. Isolat ditumbuhkan pada cawan

petri yang berisi media PDA dan diinkubasikan pada pencahayaan yang cukup di suhu kamar. Diameter koloni yang terbentuk diukur secara vertikal, dan horizontal setiap hari selama tujuh hari. Warna dan ada tidaknya aerial hifa diamati pada hari ketujuh. (2) Mengamati bentuk karakteristik konidofor. Bentuk karakteristik konidofor dapat diamati dengan slide culture, yang dibuat dengan cara mengambil sejumlah kecil koloni cendawan pada media PDA, lalu diletakkan pada objek glass dan ditutup dengan cover glass. Selanjutnya slide culture diletakkan pada cawan petri steril yang dipertahankan kelembabannya, dengan meletakkan kertas saring yang telah dibasahi dengan aquades steril. Setelah diinkubasi selama 24-72 jam pada suhu kamar, slide culture diamati di bawah mikroskop. (3) Mengamati bentuk sporodokia, makrokonidia dan mikrokonidia



cendawan pada media alami yaitu media BLA (Banana Leaf agar). dengan menggunakan metode Nelson *et al* (1983). Letakkan potongan daun pisang berukuran $\pm 1 \text{ cm}^2$ yang telah disterilisasi pada temperatur 121°C pada cawan petri yang berisi media PDA. Koloni isolat cendawan diletakkan diantara potongan daun pisang tersebut. Kemudian kultur diinkubasi selama 10-14 hari pada suhu kamar dengan pencahayaan 100-130 lux. Koloni cendawan yang tumbuh pada permukaan daun pisang diamati di bawah mikroskop.

Variabel yang digunakan dalam mengamati bentuk konidiofor, mikrokonidia dan makrokonidia berdasarkan kunci identifikasi Nelson *et al* (1983), Seifert, K. 1996, Leslie dan Summerell (2006), penentuan warna koloni mengacu pada *A Mycological Colour Chart* (Rayner, 1970).

Tahap Identifikasi Secara Molekuler. Ekstraksi DNA. Miselium cendawan yang diperoleh dari kultur *in vitro* pada media PDA sebanyak 1 gr digerus dengan bantuan nitrogen cair dan ditempatkan dalam 2,0 ml tabung eppendorf. Tepung miselia disuspensikan dengan 700 μl buffer ekstraksi (CTAB 1 % (w/v), Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,7 M dan Na_2EDTA 10 mM serta ditambahkan b-mercaptoethanol 1% (v/v) sebelum digunakan) dan divorteks sampai suspensi merata. Campuran diinkubasikan pada suhu 65°C selama 30-60 menit. DNA diekstraksi dengan menambahkan 1x volume larutan phenol:kloroform:isoamilalkohol (25:24:1 v/v).

Campuran dibalik secara menyeluruh dengan membolak-balik tabung secara hati-hati, lalu disentrifugasi pada kecepatan 12000 g selama 12 menit. Fase cairan lapisan sebelah atas (supernatan) dipindahkan ke tabung eppendorf baru. Sampel DNA pada supernatan diekstrak kembali dengan menambahkan larutan kloroform: isoamilalkohol (24:1) sebanyak 0,5x volume larutan. Tabung dibolak-balik secara perlahan dan disentrifugasi pada kecepatan 12000 g selama 5-10 menit. Fase cairan sebelah atas (supernatan) dan dipindahkan ke tabung eppendorf baru dan ditambahkan 0,6x volume

isopropanol dingin untuk mengendapkan DNA, lalu diinkubasikan pada freezer (-20°C) selama 1 jam atau lebih. Endapan DNA dipisahkan dari larutan dengan mensentrifugasinya pada kecepatan 12000 g selama 12 menit.

Supernatan dibuang dengan menggunakan pipet, selanjutnya pellet dicuci dengan 70% ethanol dingin dan divakum keringkan. Pelet disuspensikan dengan menambahkan 1x TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) sebanyak 200 μl . Pada tahapan pemurnian DNA dari kemungkinan kontaminasi oleh RNA, maka dilakukan penghilangan RNA dengan menambahkan 0,1x RNAase ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) dan diinkubasikan selama 1-2 jam pada suhu 37°C . Suspensi ditambahkan dengan 0,5x volume ammonium acetate 7,5 M, diikuti dengan penambahan 2x volume 95% (v/v) ethanol dingin dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10000 g selama 12 menit. Setelah disentrifugasi, pellet yang diperoleh dicuci dengan 70% (v/v) ethanol dingin, dikering anginkan pada suhu 40°C dan dilarutkan dengan 100 μl 1x TE.

Uji Kualitas DNA. Uji kualitas DNA dilakukan untuk melihat kualitas DNA. Pengujian kualitas DNA dilakukan dengan teknik elektroforesis menggunakan gel agarosa. Dengan cara ini kualitas DNA dapat diestimasi secara bersamaan dalam waktu yang cepat. Dilakukan dengan DNA hasil ekstraksi dihomogenkan dengan dipipet naik turun selama beberapa detik agar larutan tercampur merata, lalu disentrifugasi selama satu menit. DNA stock 2 μl ditambahkan dengan 1 μl loading dye diatas kertas parafilm. Sampel dimasukkan ke dalam sumur agarose 1,2 % dan dielektroforesis 90 volt selama 30 menit. Kemudian gel dimasukkan ke dalam *geldoc (UVP High Performance Ultraviolet Transluminator)* yang dilengkapi dengan cahaya UV dan divisualisasi dengan kamera. Warna pada permukaan pendaraan menunjukkan besar kecilnya konsentrasi DNA.

Amplifikasi DNA. Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan 28S *Nuclear ribosomal large Subunit rRNA* gene (LROR:



ACCCGCTGAACTTAAGC, LR5: TCCTGAGGGAACTTCG). Analisis PCR dilakukan dengan total reaksi 50 µl mengandung 5 uL DNA hasil ekstraksi, dNTP 10 µM (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) sebanyak 2 uL, MgCl₂ sebanyak 6 uL, primer LROR 1 uL, Primer LR5 1 uL, enzim HotStart *Taq DNA Polymerase* 1,25 unit dalam larutan 10 uL PCR buffer 10X. Program PCR terdiri dari *Pre-denaturasi* pada suhu 95° C, selama 15 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari *Denaturasi* pada suhu 94°C selama 60 detik, *Annealing* pada suhu 50°C selama 60 detik, dan *Extension* pada suhu 72°C selama 60 detik. Pada tahap terakhir proses PCR dilakukan *Final Extension* pada suhu 72°C selama 10 menit.

Elektroforesis. Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dalam gel agarosa 2% dalam larutan TAE 0,5x (Tris Acetic Acid EDTA). Sebanyak 8µl DNA hasil PCR ditambahkan 2µl loading dye diatas kertas parafilm, kemudian dimasukkan kedalam sumur gel elektroforesis. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100volt selama 60 menit. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan diatas *UVP High Performance Ultraviolet Transilluminator* dan didokumentasikan.

Analisis Data. Analisis hasil elektroforesis dengan membandingkan pita hasil amplifikasi 28S *Nuclear ribosomal large Subunit* rRNA gene 28S *Nuclear ribosomal large Subunit* rRNA gene sepanjang 900 bp yang muncul pada sampel uji dengan marker 100 bp pada sisi kiri dan kanan. Produk PCR disekuensing untuk mengetahui urutan basa dari masing-masing isolat yang diuji dan dibandingkan dengan spesies *Fusarium* yang terdapat pada Genbank (*National Center for Biotechnology Information/NCBI*).

HASIL

Identifikasi Morfologi. Karakterisasi Makroskopis. Karakterisasi morfologi pada isolat-isolat yang diperoleh meliputi pengukuran diameter isolat, keberadaan aerial miselium dan warna koloni. Keragaman diameter koloni isolat merupakan variabel yang berhubungan erat dengan kecepatan pertumbuhan hifa. Pada beberapa isolat kecepatan tumbuh merupakan karakter yang khas. Kecepatan tumbuh yang tinggi diduga juga terkait dengan kemampuan virulensi isolat, sehingga untuk mengetahui kemampuan virulensinya isolat perlu dilakukan pengujian pada inangnya.

Tabel 2. Karakteristik Isolat yang diisolasi dari Pohon Gaharu *Aquillaria* spp., pada Medium PDA

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Karakter Morfologi		
			Φ Koloni 7 Hari Inkubasi (cm)	Aerial miselium	Warna Koloni Pada Medium PDA
		Koloni pada			
1	NKS	Nunukan Selatan	9.00	+++	Putih,kuning
2	KR 1	Krayan Induk 1	2.37	+	Putih,coklat
3	KR 2	Krayan Induk 2	6.80	+++	Kuning
4	LM 1	Lumbis 1	7.30	+++	Putih,ungu
5	LM 2	Lumbis 2	7.13	+++	Putih ungu
6	LM 3	Lumbis 3	7.20	+++	Putih ungu
7	KRS 1	Krayan Selatan 1	9.00	+++	Putih, coklat
8	KRS 2	Krayan Selatan 2	9.00	+++	Putih, krem
9	KRS 3	Krayan Selatan 3	7.03	+++	Putih, ungu
10	KRS 4	Krayan Selatan 4	7.17	+++	Putih
11	KRS 5	Krayan Selatan 5	9.00	+++	Putih, orange

Keterangan kelimpahan relatif aerial miselium: + Sedikit, ++ Cukup banyak, +++ Banyak

Tabel 2 menunjukkan hasil identifikasi morfologi dengan cara menumbuhkan semua isolat cendawan pada media PDA, dan melakukan pengukuran pertumbuhan isolat

cendawan pada media PDA hingga 7 hari masa inkubasi menunjukkan bahwa isolat yang tertinggi pertumbuhannya (Ø 9.00 cm) terdapat pada isolat NKS, KRS 1, KRS 2, dan



KRS 5, sedangkan pertumbuhan yang terendah terdapat pada isolat KR 1 sebesar 2.37 cm diakhir pengamatan.

Aerial miselium terdapat pada setiap isolat cendawan, meskipun demikian terdapat perbedaan antar isolat jika dilihat dari kelimpahan relatif aerial miseliumnya. Isolat NKS, LM 1, LM 2, LM 3, KR 2, KRS 1, KRS 2, KRS 3, KRS 4, dan KRS 5 memiliki aerial miselium yang banyak, sedangkan isolat KR 1 memperlihatkan kelimpahan aerial miselium yang sedikit. Warna koloni isolat yang diperoleh menunjukkan karakter yang berbeda. Isolat NKS berwarna putih kuning, isolat KR 1 berwarna putih coklat muda, isolat

KR 2 berwarna kuning, isolat LM 1-LM 3 berwarna putih ungu, isolat KRS1 berwarna putih coklat, isolat KRS 2 berwarna putih krem, isolat KRS 3 berwarna putih ungu, isolat KRS 4 berwarna putih, dan isolat KRS 5 berwarna putih orange.

Karakterisasi Mikroskopis. Tabel 3 menunjukkan hasil pengamatan pada makrokonidia, mikrokonidia dan sporodokia dari isolat uji. Jumlah septa makrokonidia 4-7 dimiliki oleh isolat NKS, KR 2, KRS 1, KRS 2, KRS 4 dan KRS 5. Jumlah septa 3-5 dimiliki oleh isolat LM1, LM 2, LM 3 dan KRS 3, sedangkan isolat KR 1 belum ditemukan adanya makrokonidia.

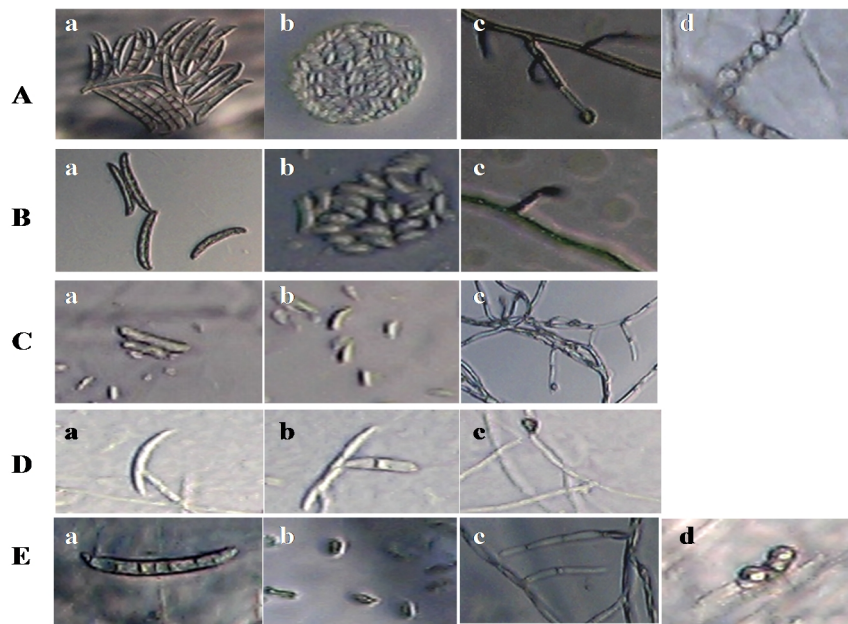
Tabel 3. Karakteristik Isolat Cendawan yang berasal dari Kabupaten Nunukan

No	Kode Isolat	Asal Isolat	Karakter Mikroskopis			
			Makrokonidia		Mikrokonidia	
			Jumlah Septa	Konidiofor	Kelimpahan	Bentuk
1	NKS	Nunukan Selatan	4-7	Simpel	Banyak	Elips, oval
2	KR 1	Krayan Induk 1	-	Simpel	Banyak	Elips, oval
3	KR 2	Krayan Induk 2	4-7	Simpel	Banyak	Elips, oval
4	LM 1	Lumbis 1	3-5	Simpel	Banyak	Elips, oval
5	LM 2	Lumbis 2	3-5	Simpel	Banyak	Elips, oval
6	LM 3	Lumbis 3	3-5	Simpel	Banyak	Elips, oval
7	KRS 1	Krayan Selatan 1	4-7	Simpel	Banyak	Elips
8	KRS 2	Krayan Selatan 2	4-7	Simpel	Banyak	Elips
9	KRS 3	Krayan Selatan 3	3-5	Simpel	Banyak	Elips, oval
10	KRS 4	Krayan Selatan 4	4-7	Simpel	Banyak	Elips, oval
11	KRS 5	Krayan Selatan 5	4-7	Simpel	Banyak	Elips, oval

Konidiofor semua isolat memiliki bentuk yang simpel, bentuk mikrokonidiana elips dan oval. Mikrokonidia pada berbagai isolat cendawan berbentuk bulan sabit (fusoid) sehingga mudah dibedakan dengan genus lain yang memiliki ciri yang mirip. Isolat NKS, KR 2, KRS 1, KRS2, KRS 4 dan KRS 5 merupakan isolat yang memiliki jumlah septa yang relatif banyak berkisar 4-7. Hasil dari karakterisasi makroskopis dan mikroskopis

menjadi dasar untuk melakukan identifikasi morfologi secara mikroskopis berdasarkan Nelson *et al* (1983), Seifert, (1996), Leslie and Summerell (2006).

Dari 11 isolat yang diperoleh, dapat diketahui bahwa 10 isolat merupakan cendawan dalam Genus *Fusarium*. Satu isolat cendawan belum teridentifikasi karena belum ditemukan adanya makrokonidia, yaitu isolat KR 1.



Gambar 1. Konidia Cendawan *Fusarium* spp. (A) Isolat NKS, KR 2, KRS 1, KRS 2, dan KRS 5, (B).Isolat LM 2 dan KRS 3, (C). Isolat LM 1, (D). Isolat LM 3, (E). Isolat KRS 4. a. Makrokonidia, b. Mikrokonidia, c. Sporodokia, d. Klamidospora. Pengamatan menggunakan Mikroskop Binokuler Multimedia Sony Color Video Camera SSC-G118, Pembesaran 10x40.

Gambar 1A memperlihatkan bahwa isolat KRS 1 dan KRS 2, memiliki kemiripan pada bentuk konidiofor dengan mikrokonidiana berbentuk elips, sedangkan isolat yang lain mikrokonidiana berbentuk elips oval. Isolat NKS, KR2, KRS 1, KRS 2 dan KRS 5, memiliki makrokonidia dengan bentuk sel apikal tumpul, agak bulat, selalu melimpah di dalam sporodokia yang bentuknya panjang. Sel basalnya berlekuk dengan ujung bulat. Secara morfologi isolat ini diidentifikasi sebagai *F. solani*.

Isolat LM 2 dan KRS 3, memiliki sporodokia yang lebih pendek, sporodokia kadang jarang bahkan tidak ada. Mikrokonidiana banyak dan berbentuk elips hingga oval, umumnya pendek, sedikit melengkung, relatif ramping dan berdinding tipis, memiliki 3-5 septa dengan bentuk sel apikal dan basalnya runcing dan melengkung dengan sudut yang kecil. Ciri-ciri ini mengarah pada karakter *F. oxysporum* (Gambar 1B).

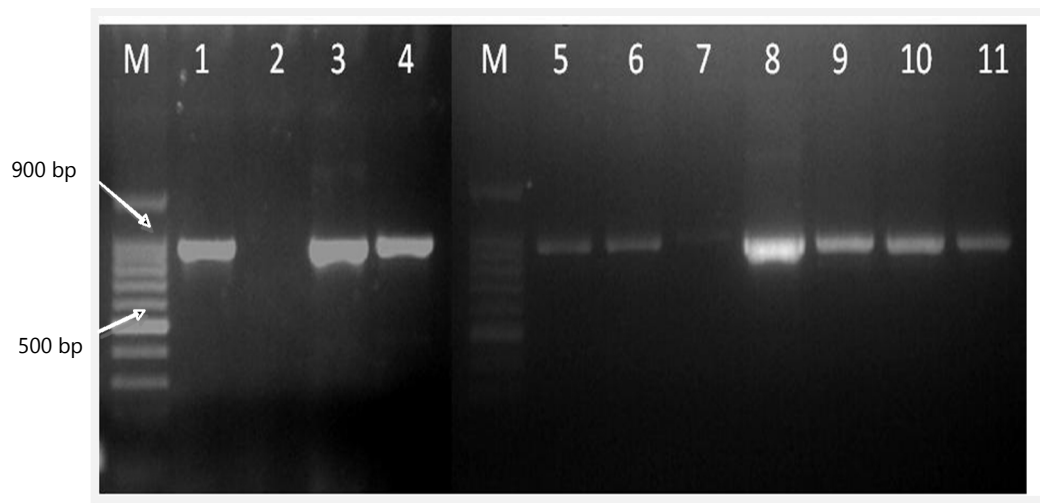
Isolat LM 1, makrokonidia terdiri dari 3-5 septa, agak panjang namun kurang jelas,

mikrokonidiana melimpah dan sporodokianya simpel lebih pendek sehingga secara morfologi isolat ini diidentifikasi sebagai *Fusarium* sp. (Gambar 1C).

Isolat LM 3 makrokonidiana tipis panjang dan agak melengkung, sel apikalnya lancip (tapered), sel basal kurang berkembang. Sporodokianya tidak nampak hal ini diduga disebabkan karena proses subkultur yang berulang, sehingga secara morfologi isolat ini diidentifikasi sebagai *F. moniliforme*.

Isolat KRS 4 memiliki sporodokia yang sederhana. Mikrokonidiana berbentuk elips, makrokonidiana berbentuk fusoid atau silinder dan soliter dengan 4-7 septa. Klamidosporanya berpasangan atau tunggal dengan bentuk yang khas, identik dengan karakter morfologi *F. lateritium* (Gambar 1E).

Identifikasi Molekuler. Untuk menentukan jenis isolat secara lebih mendetail, dilakukan identifikasi molekuler berdasarkan metode Lee (2010). Dari 11 isolat yang amplifikasi, menghasilkan produk PCR dengan kisaran ukuran 900 bp (Gambar 2).



Gambar 2. Amplifikasi DNA *Fusarium* dengan Menggunakan Primer LROR-LR5. Elektroforesis dengan Agarosa 2% dan divisualisasi menggunakan Sybergreen

Hasil amplifikasi pada 28S *Nuclear ribosomal large Subunit* dengan menggunakan primer LROR-LR5 menghasilkan pita DNA pada kisaran 900 bp pada 10 isolat cendawan. Pada isolat 2, tidak diperoleh adanya amplifikasi, diduga karena konsentrasi DNA yang digunakan sangat kecil. Hal ini menyebabkan isolat tersebut tidak dianalisa lebih lanjut. Hasil sekuensing urutan basa dari masing-masing isolat yang diuji selanjutnya

dibandingkan dengan spesies *Fusarium* yang terdapat pada Genbank (*National Center for Biotechnology Information/NCBI*), dan persentase homologinya disajikan pada Tabel 4. Tabel 4 menunjukkan bahwa dari 10 isolat yang diteliti 5 isolat merupakan *F. solani*, dengan persentase homologi antara 87% hingga 99%. Lima isolat tersebut adalah NKS, KR 2, KRS 1, KRS 2, dan KRS 5. Hasil ini identik dengan karakterisasi morfologi.

Tabel 4. Hasil Sekuensing Homologi Pada 11 Isolat *Fusarium* spp.

No.	Kode Isolat	Strain Referensi	Nukleotida Sekuens Homologi (%)
1.	NKS	<i>F. solani</i> strain CBS102256	92%
2.	KR 1	-	-
3.	KR 2	<i>F. solani</i> strain CBS102256	99%
4.	LM 1	<i>Fusarium</i> sp CBG_I7CCH	74%
5.	LM 2	<i>F. oxysporum</i> strain KAML01	96%
6.	LM 3	<i>F. fujikuroi</i> (<i>F. moniliforme</i>)	91%
7.	KRS 1	<i>F. solani</i> strain CBS102256	87%
8.	KRS 2	<i>F. solani</i> strain CBS102256	98%
9.	KRS 3	<i>F. oxysporum</i> strain KAML01	96%
10.	KRS 4	<i>F. ambrosium</i> strain SMH1999	88%
11.	KRS 5	<i>F. solani</i> strain CBS102256	87%

Hasil sekuensing terhadap isolat LM 1 menunjukkan homologi dengan *Fusarium* sp. Namun dengan persentase yang rendah (74%). Hasil ini sama dengan yang diperoleh dari identifikasi morfologi. Isolat LM 3, yang sebelumnya diidentifikasi sebagai *F. moniliforme*, setelah dianalisa secara molekuler, hasil sekuensingnya homolog dengan *F. fujikuroi* Nirenberg yang merupakan

sinonim dari *F. moniliforme* dengan persentase homologi sebesar 91%. Isolat LM 2 dan KRS 3 yang diidentifikasi sebagai *F. oxysporum*, memiliki sekuen homolog sebesar 96% dengan *F. oxysporum* strain KAML01. Hasil yang berbeda diperoleh pada identifikasi isolat KRS 4 yang secara morfologi diidentifikasi sebagai *F. lateritium*, ternyata memiliki sekuen homolog sebesar 88% dengan *F. ambrosium*



(Wollenweber) Gordon. Isolat KR 1 belum berhasil diketahui spesiesnya karena dari beberapa metode yang digunakan dalam identifikasi morfologi belum ditemukan makrokonidiana. Pada media PDA dan BLA hanya ditemukan mikrokonidia dan sporodokianya.

PEMBAHASAN

Tabel 2 menunjukkan hasil karakterisasi makroskopis dan dari total 11 isolat yang diisolasi memiliki kecepatan tumbuh yang berbeda-beda pada media PDA dengan masa inkubasi 7 hari, NKS, KRS 1, KRS 2 dan KRS 5 mencapai pertumbuhan sempurna pada hari terakhir (9 cm) sedangkan isolat yang lain belum mencapai pertumbuhan yang sempurna dengan kisaran 2,37 cm – 7.20 cm, sedangkan aerial miselium semua isolat sama dengan warna bervariasi mulai putih, putih krem, putih kuning, putih ungu (4 isolat), putih cokelat (2 isolat), putih orange, dan kuning. Terdapatnya variasi morfologi pada cendawan pada media pertumbuhan yang sama (media PDA) mengindikasikan kemungkinan keberagaman genetik dari isolat cendawan yang diisolasi.

Keragaman juga terjadi manakala isolat cendawan dikarakterisasi secara mikroskopis dimana terdapat dua variasi dalam hal jumlah septa pada makrokonidia yaitu 3-5 septa ditemukan pada isolat cendawan KRS 3, LM 1, LM 2, dan LM 3 dan 4-7 septa ditemukan pada isolat cendawan NKS, KR 2, KRS 1, KRS 2, KRS 4, dan RS 5, sedangkan mikrokonidia umumnya seragam konidiofornya (simpl) dan kelimpahannya termasuk kategori banyak kecuali bentuk mikrokonidia yang terdapat dua variasi yaitu elips, oval yang ditemukan pada semua isolat cendawan kecuali pada KRS1 dan KRS 2 yang ditemukan dalam bentuk elips (Tabel 3). Perbedaan karakter isolat semakin terlihat setelah dilakukan karakterisasi mikroskopis yang menunjukkan perbedaan bentuk sporodokia, makrokonidia dan mikrokonidia yang sangat bervariasi (Gambar 1).

Variasi dari karakterisasi morfologi ini telah dapat menjadi pemandu untuk menentukan spesies dari kesemua isolat yang

berhasil diisolasi dan hasil identifikasi menunjukkan bahwa kesemua isolat merupakan genus cendawan *Fusarium* dengan spesies yang beragam yaitu *Fusarium* sp. (LM 1), *F. moniliforme* (LM 3), *F. oxysporum* (LM 2 dan KRS 3), *F. lateritium* (KRS 4), dan *F. solani* (NKS, KR2, KRS 1, KRS 2 dan KRS 5) dan terdapat 1 isolat (KR 1) yang tidak berhasil diidentifikasi karena tidak ditemukannya makrokonidia (Gambar 1).

Hasil karakterisasi morfologi ini kemudian dilanjutkan dengan karakterisasi secara molekuler melalui metode PCR dan sekuensing sehingga berhasil diidentifikasi 10 isolat yaitu *Fusarium* sp (LM 1), *F. moniliforme/fujikuroi* (LM 3), *F. oxysporum* (LM 2 dan KRS 3), *F. ambrosium* (KRS 4), dan *F. solani* (NKS, KR2, KRS 1, KRS 2 dan KRS 5). (Tabel 4) Hanya terdapat 1 isolat yang berbeda hasil karakterisasinya antara karakterisasi morfologi dengan molekuler yaitu isolat KRS 4 yang pada karakterisasi morfologi ditetapkan sebagai *F. lateritium* tetapi ternyata pada karakterisasi molekuler didapati berada pada spesies *F. ambrosium*. Hal ini terjadi karena bentuk makrokonidia isolat KRS 4 ramping menyerupai bentuk makrokonidia dari *F. lateritium* sesuai panduan identifikasi *Fusarium* oleh Nelson *et al*(1983), Seifert, K. (1996), Leslie and Summerell (2006).

Ketelitian dari metode molekuler bagaimanapun dipandang lebih baik dibandingkan dengan metode morfologi sehingga isolat KRS 4 ditetapkan sebagai *F. ambrosium*. Backhouse *et al.* (2001) menyatakan bahwa kelimpahan *Fusarium* ada pada setiap bagian dunia kecuali tempat yang ekstrim, sehingga satu *strain* dengan *strain* lain relatif sulit untuk dibedakan. Agustini *et al* (2006) menyatakan bahwa kebanyakan spesies dari *Fusarium* merupakan cendawan yang bersifat kosmopolitan, sehingga untuk membedakan spesies *Fusarium* merupakan hal yang kompleks, karena variasi yang ditemukan dalam satu spesies sangat besar.

Tanaman yang menjadi inang *Fusarium* bisa membantu dalam identifikasi terutama untuk *Fusarium* yang patogenik, tetapi untuk



yang saprofit atau patogen yang lemah memerlukan pengamatan yang menyeluruh. Jenis *F. solani*. bisa dikatakan patogen penting pada tanaman salah satunya pada *Aquilaria* spp. *Strain* ini banyak ditemukan di berbagai tempat karena sifatnya yang kosmopolit. Booth (1971); Nelson *et al.* (1983) melaporkan *F. solani*, *F. oxysporum*, dan *F. lateritium* merupakan spesies yang *kosmopolit*, walaupun tidak sedikit spesies dari kelompok ini yang bersifat saprofit. Beberapa penelitian yang pernah dilakukan sebelumnya melaporkan keberadaan *F. solani*. pada tanaman penghasil gaharu. Penelitian Sidiyasa dan Suharti (1987) menyatakan bahwa berbagai jenis jamur seperti *Diplodia* sp., *Pythium* sp. dan *F. solani* berperan dalam pembentukan resin gaharu. Umboh *et al.* (2002) menggunakan jamur *F. oxysporum.*, *F. solani.*, *Scyrtallidium* sp., *Libertella* sp. dan *Trichoderma* sp. untuk memacu terbentuknya gubal pada *Aquilaria malaccensis* dan *A. crassna* pierre ex Laconte.

KESIMPULAN

Berdasarkan karakter morfologi, dari 11 isolat yang diteliti diperoleh lima isolat yang merupakan spesies *F. solani*, dua isolat diidentifikasi sebagai *F. oxysporum*, masing-masing satu isolat sebagai *Fusarium* sp, *F. moniliforme*, dan *F. lateritium*. Identifikasi secara molekuler menunjukkan hasil yang identik, kecuali *F. lateritium* yang ternyata memiliki homologi dengan *F. ambrosium*.

DAFTAR PUSTAKA

Agustini L, Wahyuno D dan Erdy S. 2006. Keanekaragaman Jenis Jamur yang Potensial Terhadap Pembentukan Gaharu dari Batang *Aquillaria* spp. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam* 3 (5): 555-564.

Barden A, Noorainie A, Mulliken T, Song M. 2000. Heart of the matter: Agarwood use and trade and CITES implementation for *Aquilaria malaccensis*. TRAFFIC International.

Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. Key Surrey: Common Wealth Mycological Institute.

Budi SW, Erdy S, Wahyudi A. 2010. Identifikasi Jenis-jenis Fungi Yang Potensial Terhadap Pembentukan gaharu Dari Batang *Aquillaria* spp. *Jurnal Silvikultur Tropika* 1(1):5.

Leslie, John F, Brett AS. 2006. *Fusarium Laboratory Manuals*. USA: Blackwell Publishing Asia Ioa.

Mucharromah. 2010. *Pengembangan Gaharu di Sumatera*. Bogor: Penerbit Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam.

Nelson PE, Toussoun TA, Cook RJ. 1983. *Fusarium: Diseases, Biology, and Taxonomy*. Pennsylvania State University Press, University Park. pp 446-452.

Rayner, RW. 1970. *A Mycological Colour Chart*. Commonwealth England: Mycological institute & British Mycological Society

Santoso E, Totok K, Maman T. 2010. *Teknologi Induksi Pohon Penghasil Gaharu*. Bogor: Penerbit Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam.

Seifert K. 1996. *Fuskey Fusarium Interactive Key*. Her Majesty The Queen In Right Of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada.

Semiadi G. 2010. Lima Belas Tahun Di Lampu Kuning. *Buletin Plasma Nutfah* 16 (2).

Sudrajat DJ. 2003. Teknik Pembibitan Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk). *Info Benih* 8(2): 101 – 108.

Sulistyo AS. 2010. *Perkembangan Pemanfaatan Gaharu*. Bogor: Penerbit Pusat Penelitian dan Pengembangan Hutan dan Konservasi Alam.

Sumarna Y. 2002. *Budidaya Gaharu*. Jakarta: Seri Agribisnis Penebar Swadaya.

Umboh MIJ, Rahayu G, Affandi H. 2002. *Upaya Peningkatan Produksi Gubal Gaharu: Mikroorpropagasi Aquillaria sp., dan Upaya Peningkatan Bioproses Gubal Gaharu*. Laporan Riset Unggulan Terpadu V Bidang Teknologi Perlindungan Lingkungan. Jakarta: Kantor Menteri Negara Riset dan Teknologi.