



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:
 - a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
 - b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.
2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**PENGARUH INDUKSI BEBERAPA STRAIN *Fusarium spp*,
TERHADAP PRODUKSI SESKUITERPEN DARI BERBAGAI UMUR
KALUS GAHARU (*Aquilaria malaccensis*)**

SKRIPSI



**FACHRUL RIJAL
06132052**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

**PENGARUH INDUKSI BEBERAPA STRAIN *Fusarium* spp.
TERHADAP PRODUKSI SESKUITERPEN DARI BERBAGAI UMUR
KALUS GAHARU (*Aquilaria malaccensis*)**

Oleh

FACHRUR RIJAL

06 132 052

**Skripsi ini diajukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sain pada Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Andalas**

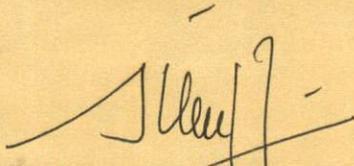
**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG
2011**

HALAMAN PENGESAHAN

Pengaruh Induksi Beberapa Strain *Fusarium* spp. Terhadap Produksi Seskuitерpen dari Berbagai Umur Kalus Gaharu (*Aquilaria malaccensis*) merupakan skripsi oleh Fachrur Rijal (06 132 052) dan diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (Strata 1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Andalas, yang telah diuji dan dipertahankan pada tanggal 31 Januari 2011.

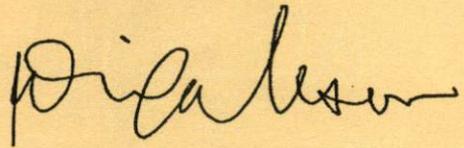
Disetujui oleh :

Pembimbing I



Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M.Sc
NIP. 195501041980102001

Pembimbing II



Dr. Ir. Witjaksono, M.Sc
NIP. 196110081985121001

ABSTRAK

PENGARUH INDUKSI BEBERAPA STRAIN *Fusarium* spp. TERHADAP PRODUKSI SESKUITERPEN DARI BERBAGAI UMUR KALUS GAHARU (*Aquilaria malaccensis*)

Oleh

Fachrur Rijal

**Sarjana Sain (S.Si) dalam bidang Kimia FMIPA Universitas Andalas
dibimbing oleh Prof. Dr. Sumaryati Syukur, M. Sc dan Ir. Witjaksono**

Studi tentang pengaruh strain *Fusarium* spp. terhadap produksi senyawa seskuioterpen dari berbagai umur kalus gaharu telah dilakukan. Jamur *Fusarium* yang digunakan, yaitu *Fusarium* A Gaharu, *Fusarium* B Gaharu, dan *Fusarium solani* (LIPI MC 744) yang diinokulasikan terhadap kalus gaharu berumur 3, 4, dan 5 minggu. Pengamatan pertumbuhan secara visual dilakukan dan diketahui bahwa *Fusarium solani* memberikan pengaruh infeksi yang lebih nyata dibandingkan dengan dua strain lainnya yang ditunjukkan dengan pertumbuhan hifa putih yang cepat dan banyak. Hasil ekstraksi dengan pelarut etanol dipartisi dengan n-heksan, kemudian hasil pemekatan dianalisa dengan GC-MS. Spektrum massa yang dihasilkan untuk setiap analisa dibandingkan dengan spektrum massa yang ada di *MS-library*. Hasil interaksi kalus gaharu dengan jamur *Fusarium* A Gaharu membentuk 2 senyawa seskuioterpen, yaitu cis-alpha bisabolene yang ditemukan pada kalus berumur 3 dan 4 minggu, sedangkan beta-elemene pada semua umur kalus. Kalus gaharu tanpa penambahan jamur yang digunakan sebagai kontrol hanya menghasilkan senyawa cis-alpha bisabolene pada umur kalus 3 minggu. Interaksi kalus dengan *Fusarium* B Gaharu menghasilkan senyawa beta elemene yang ada pada semua umur kalus. Interaksi dengan *Fusarium solani* menghasilkan alpha-guaiene yang hanya dihasilkan pada kalus berumur 3 minggu. Berdasarkan pertumbuhan, hasil infeksi, dan analisa GC-MS menunjukkan hasil interaksi antara kalus gaharu dengan jamur *Fusarium solani* menunjukkan hasil yang paling baik diantara yang lain. Senyawa yang dihasilkan juga ditemukan pada minyak dari gubal gaharu *Aquilaria malaccensis* Lamk. (Ishihara, 1993).

8. Semua Dosen dan Karyawan Jurusan Kimia Universitas Andalas yang telah memberikan ilmu dan semangat.
9. Keluarga besar Zokure (Angkatan 2006) yang telah memberikan dukungan.

Tiada hal lain yang dapat menggantikan semua bantuan, dukungan, kerjasama maupun bimbingan dari seluruh pihak yang telah disebutkan, maupun yang tidak disebutkan di atas, selain doa dan ucapan terima kasih, kiranya Allah SWT berkenan membalas semua yang telah diberikan kepada penulis.

Padang, 08 Januari 2011

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|----------------|
| ABSTRAK | ii |
| ABSTRACT | iii |
| KATA PENGANTAR | iv |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR TABEL | viii |
| DAFTAR GAMBAR | ix |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| I. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan | 3 |
| 1.4 Hipotesis | 3 |
| 1.5 Manfaat | 3 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 <i>Aquilaria malaccensis</i> | 4 |
| 2.1.1 Tinjauan Botani | 4 |
| 2.1.2 Morfologi | 4 |
| 2.1.3 Kegunaan Secara Tradisional | 5 |
| 2.1.4 Kandungan Kimia dan Morfologi | 6 |
| 2.2 Jamur <i>Fusarium</i> spp. | 7 |
| 2.2.1 Klasifikasi Taksonomi | 7 |
| 2.2.2 Deskripsi Jamur | 7 |
| 2.3 Proses Terbentuknya Gubal Gaharu | 8 |
| III. METODOLOGI PENELITIAN | |
| 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian | 9 |
| 3.2 Alat dan Bahan | 9 |
| 3.3 Prosedur Percobaan | 9 |
| 3.3.1 Persiapan Materi Penelitian | 9 |

| | |
|---|----|
| 3.3.2 Sterilisasi Bahan dan Alat | 10 |
| 3.3.3 Pembuatan Media Semi Padat D ₁ | 10 |
| 3.3.4 Pembiakan Jamur Patogen Gaharu | 10 |
| 3.3.5 Subkultur Biak Sel <i>Aquilaria malaccensis</i> | 10 |
| 3.3.6 Pengamatan Pertumbuhan Jamur | 11 |
| 3.3.7 Inokulasi Jamur pada Kalus | 11 |
| 3.3.8 Ekstraksi Kalus, Kalus-Jamur, dan Jamur | 12 |
| 3.3.9 Analisa Ekstrak dengan GC-MS | 12 |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 4.1 Pertumbuhan Kalus | 13 |
| 4.2 Interaksi Kalus dengan Jamur | 14 |
| 4.3 Ekstraksi Kalus-Jamur, Kalus, Jamur, dan Gubal Gaharu | 18 |
| 4.4 Produksi Senyawa Seskuiterpen dari Kalus, Jamur, dan Kalus-Jamur | 19 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 5.1 Kesimpulan | 28 |
| 5.2 Saran | 28 |
| DAFTAR PUSTAKA | 29 |
| LAMPIRAN | 31 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|---|---------|
| 1. Pengamatan dan pengukuran diameter pertumbuhan jamur 10 hari setelah inokulasi jamur terhadap kultur kalus | 15 |
| 2. Warna ekstrak metanol dari kontrol kultur sel, jamur, kalus-jamur, dan gubal gaharu | 18 |
| 3. Senyawa seskuiterpen yang terbentuk dari interaksi jamur dan kalus gaharu dengan variasi umur kalus | 19 |
| 4. Persentase kenaikan konsentrasi senyawa cis-alpha bisabolene hasil interaksi kalus dengan jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu | 22 |
| 5. Persentase kenaikan konsentrasi senyawa cis-alpha bisabolene hasil interaksi kalus dengan jamur <i>Fusarium</i> B Gaharu | 25 |

DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|--|---------|
| 1. Bentuk buah, bunga, dan daun dari tanaman <i>A. malaccensis</i> | 5 |
| 2. Gubal gaharu dan minyak essens | 6 |
| 3. beberapa struktur kimia senyawa seskuiterpen dan turunan kromon yang ditemukan dalam kalus dan kultur suspensi sel <i>Aquilaria</i> | 7 |
| 4. Pertumbuhan kalus | 13 |
| 5. Kalus yang sudah digabung dari beberapa cawan petri hingga menutupi permukaan media tanam..... | 14 |
| 6. Jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu, inokulasi, dan infeksi | 16 |
| 7. Jamur <i>Fusarium</i> B Gaharu, inokulasi, dan infeksi | 16 |
| 8. Jamur <i>F. solani</i> LIPI MC 744, inokulasi, dan infeksi | 17 |
| 9. Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen pada kontrol kalus kontrol kalus | 20 |
| 10. Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari kontrol kalus..... | 20 |
| 11. Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dan jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu (1)..... | 21 |
| 12. Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari interaksi kalus dengan jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu (1)..... | 21 |
| 13. Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dan jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu (2) | 24 |
| 14. Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari interaksi kalus dengan jamur <i>Fusarium</i> A Gaharu (2)..... | 24 |
| 15. Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur <i>Fusarium</i> B Gaharu | 25 |
| 16. Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen dari interaksi kalus dengan jamur <i>F. solani</i> MC 744 | 26 |
| 17. Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari interaksi kalus dengan jamur <i>F. solani</i> MC 744..... | 26 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|--|---------|
| 1. Komposisi media | 31 |
| 2. Ekstraksi kalus, kalus yang terinfeksi jamur, jamur, dan gubal gaharu dengan pelarut metanol | 33 |
| 3. Partisi ekstrak metanol dengan pelarut heksana | 34 |
| 4. Evaporasi (penguapan pelarut) dan persiapan sebelum injeksi GC-MS | 35 |

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tumbuhan *Aquilaria* merupakan salah satu tumbuhan hutan yang menghasilkan produk hutan non-kayu (*non-timber forest product*) berupa gubal gaharu beraroma harum yang mengandung damar wangi (*aromatic resin*)¹. Terbentuknya gubal gaharu secara alami berkaitan dengan proses patologis, yaitu respon tumbuhan terhadap infeksi mikroba. Komoditi ini mempunyai harga yang sangat tinggi dan terus meningkat dari tahun ke tahun. Genus *Aquilaria*, *Gonystulus*, dan *Grynops* yang merupakan tumbuhan penghasil gubal gaharu terancam punah dan dimasukkan dalam daftar Appendix II CITES (*Convention on Internal Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) sejak 2005^{2,3}

Gubal gaharu mengandung bahan bioaktif, umumnya senyawa metabolit sekunder berupa seskuiterpen yang dimanfaatkan secara luas untuk keperluan industri parfum, kosmetik, dan obat-obatan. Senyawa ini dapat diperoleh dengan mengekstraksi langsung gubal gaharu, tetapi cara ini memerlukan budidaya tanaman dalam skala besar, disamping itu proses ekstraksi, isolasi dan pemurniannya mahal. Beberapa kelemahan metode konvensional tersebut diatasi dengan penemuan metode yang lebih baik⁴.

Salah satu metode alternatif tersebut ialah teknik kultur jaringan yang merupakan metode pembudidayaan jaringan tanaman menjadi tanaman kecil yang mempunyai sifat seperti induknya dalam jumlah yang banyak dan waktu yang singkat. Kultur jaringan juga mempunyai manfaat yang besar, karena dari usaha ini dapat dihasilkan metabolit sekunder dengan memisahkan unsur-unsur yang terdapat dalam kalus (kumpulan sel yang belum terorganisasi dan belum terdiferensiasi) ataupun protokormus (*protocorm like bodies*), misalnya alkaloid, steroid, dan terpenoid. Dengan ditemukannya cara mendapatkan metabolit sekunder dari kalus suatu eksplan yang ditumbuhkan dalam medium kultur jaringan, maka berarti dapat menghemat waktu dan tenaga⁵. Metode ini tidak memerlukan bahan yang banyak, lahan yang luas, dapat diproduksi secara terus menerus, dan proses pemurniannya lebih mudah karena sel-sel hasil kultur jaringan tidak banyak mengandung pigmen sehingga biaya pemrosesannya lebih

rendah. Andayana dkk. menemukan kesamaan profil kimia dalam ekstrak kalus *Vitex trifolia L* dengan senyawa yang berasal dari daun tanaman tersebut⁶, sedangkan Luthfi Aziz Mahmud dkk. melaporkan terbentuknya senyawa alkaloid melalui kultur kalus dan suspensi sel dengan kandungan yang lebih tinggi dibanding akar tumbuhan induk *Eurycoma longifolia Jack*⁷.

Tumbuhan penghasil gubal gaharu merupakan salah satu tumbuhan yang menjadi perhatian utama dalam teknik kultur jaringan. Proses terbentuknya gubal gaharu merupakan suatu metode elisitasi, yaitu induksi secara simultan pembentukan fitoaleksin, metabolit sekunder konstitutif, atau metabolit sekunder lain yang secara normal tidak terakumulasi di tanaman gaharu⁴. Secara alami, senyawa-senyawa ini dimanfaatkan oleh tumbuhan untuk mempertahankan diri terhadap serangan mikroorganisme patogen, seperti jamur yang menginfeksi bagian batang pohon yang terluka. Pada infeksi buatan, pohon gaharu sengaja diinfeksi jamur dengan membuat perlukaan di batang pohon untuk kemudian diinokulasi jamur patogen, seperti *Fusarium spp.* dan *Cylindrocapon spp.* sehingga terjadi akumulasi senyawa fitoaleksin di bagian dalam batang yang disebut juga gubal.

Nor azah dkk. melaporkan adanya beberapa senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan gubal gaharu, antara lain seskuiterpen, turunan kromon, seskuiterpen furanoid, asam tetradekanoik, dan asam pentadekanoik⁸. Kalus dan kultur suspensi sel *Aquilaria* telah diperiksa kandungan senyawanya dan diketahui bahwa selain menghasilkan turunan kromon, juga mengandung senyawa seperti α -guaiene, α -humulene, dan δ -guaiene². Shu-Yuan Qi et al. berhasil mengidentifikasi empat kromon 2-(2-feniletil) dari kultur suspensi sel *Aquilaria sinensis* yang ditambahi ekstrak kasar jamur *Melanotus flavolivens*⁹.

Kultur kalus gaharu yang ditumbuhkan pada media semi padat diduga juga menghasilkan senyawa metabolit sekunder jika diinduksikan jamur patogen penginduksi resin, seperti *Fusarium spp.*. Untuk itu perlu dilakukan penelitian untuk melihat adanya interaksi yang terjadi antara kultur kalus dan jamur berdasarkan perbedaan umur kalus dan jenis strain jamur *Fusarium* yang digunakan. Diharapkan senyawa metabolit sekunder dapat terbentuk dari interaksi keduanya dan dapat dikembangkan dan dimanfaatkan secara luas.

1.2 Rumusan Masalah

1. Budidaya dan infeksi buatan merupakan salah satu alternatif produksi gubal gaharu yang berkelanjutan, tetapi hasil penelitian menunjukkan produksi yang kurang efisien.
2. Kultur kalus yang diinfeksi jamur *Fusarium* spp. menghasilkan senyawa seskuiterpen yang merupakan bahan aktif gaharu. Penelitian ini masih tahap awal. Keberhasilan metode ini merupakan alternatif produksi seskuiterpen gaharu secara efisien.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang produksi seskuiterpen gaharu secara *in vitro*.

1.3 Tujuan

1. Mengetahui interaksi yang terjadi antara kalus *Aquilaria malaccensis* yang ditumbuhkan di media semi padat dengan beberapa strain jamur *Fusarium*.
2. Mengetahui dampak interaksi kalus dan jamur terhadap produksi senyawa metabolit sekunder.
3. Mengetahui pengaruh umur kalus terhadap banyak dan jenis senyawa metabolit sekunder yang terbentuk.
4. Menentukan jenis strain jamur *Fusarium* spp. yang cocok dan memberikan hasil terbaik terhadap produksi senyawa metabolit sekunder.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang diajukan ialah induksi jamur *Fusarium* spp. terhadap kultur kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder berupa seskuiterpen.

1.5 Manfaat

Dengan dilakukannya penelitian ini, maka dapat diketahui kemungkinan senyawa metabolit sekunder berupa seskuiterpen terbentuk dari hasil interaksi kultur kalus pada media semi padat dengan jamur patogen.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Aquilaria malaccensis*

2.1.1 Tinjauan Botani

Aquilaria malaccensis merupakan salah satu tanaman yang termasuk ke dalam famili Thymelaeaceae. Tanaman ini dikenal dengan nama agarwood, Malayan aloeswood, Malayan eaglewood (Inggris); Bois d'aigle, calambac, calambour (Perancis); gaharu, tengkaras, karas (Malaysia); agar (Myanmar)¹⁰. Masyarakat Indonesia mengenal tanaman ini dengan nama gaharu dan kikaras, sedangkan nama daerahnya, antara lain calabac, karas, kekaras, mengkaras (Dayak), galoop (Melayu), halim (Lampung), alim (Batak), dan kareh (Minang).

Klasifikasi botani tanaman gaharu (*Aquilaria malaccensis*) adalah sebagai berikut¹¹:

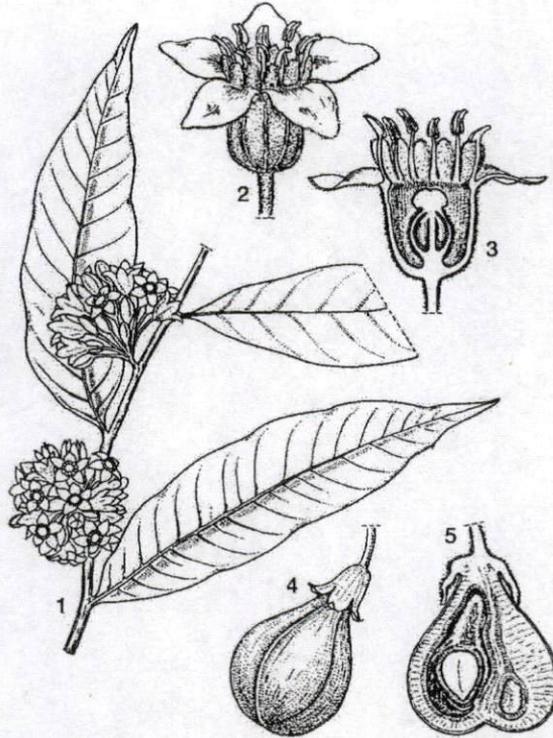
| | |
|-----------|--------------------------------|
| Kingdom | : Plantae |
| Phylum | : Spermatophyta |
| Subphylum | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledonae |
| Ordo | : Thymelaeales |
| Famili | : Thymelaeaceae |
| Genus | : <i>Aquilaria</i> |
| Spesies | : <i>Aquilaria malaccensis</i> |

2.1.2 Morfologi

Tanaman *Aquilaria malaccensis* merupakan pohon setinggi 20-40 m, batang lurus dan berdiameter 60 cm. Daun tunggal, berseling, tangkai daun sepanjang 4-6 mm, elips oblong hingga lanset oblong, ukuran 7,5-12 cm x 2,5-5,5 cm. Perbungaan tumbuh di ketiak daun, berbentuk payung, bercabang, bunga berkelopak tabung dengan ukuran 5-6 mm, dan berwarna hijau atau kuning tua. Buah bulat telur dengan bagian basal lebih lonjong, ukuran 2-3 cm, daging buah tebal, jumlah biji 1-2 buah. Kayunya lunak, ringan, pucat, mudah rusak. Tanaman ini tumbuh di

hutan tropis dataran rendah hingga ketinggian 750 m dpl yang tersebar di India, Indocina, Malaysia, Sumatera, Kalimantan, Sarawak, dan Filipina^{10,12}.

Bentuk buah, bunga, dan daun dari tanaman *Aquilaria malaccensis* dapat dilihat pada gambar dibawah ini (Gambar 1).



Gambar 1: 1. Cabang berbunga; 2. Bunga; 3. Belahan membujur bunga; 4. Buah; 5. Belahan membujur buah.
Foto: *Plant Resources of South-East Asia (PROSEA)*¹⁰

2.1.3 Kegunaan secara tradisional

Gaharu mengandung essens yang disebut sebagai minyak essens (*essential oil*) yang dibuat dengan ekstraksi atau penyulingan dari gubal gaharu. Minyak gaharu digunakan sebagai bahan pembuatan parfum, sedangkan serbuk atau abu gaharu digunakan sebagai bahan pembuatan dupa, *aroma therapy*, serta untuk keperluan upacara adat dan agama di India dan kawasan Asia Tenggara. Gaharu telah digunakan untuk tujuan medis hampir selama ribuan tahun di Ayuverda, Tibet, dan Asia Timur. Pengobatan tradisional Asia Timur menggunakannya sebagai obat rematik, obat gosok, obat perangsang, dan juga digunakan dalam produksi obat-obatan asma^{3,12}.

Daun pohon gaharu bisa dibuat menjadi teh daun pohon gaharu yang membantu kebugaran tubuh. Senyawa aktif agarospirol yang terkandung dalam daun pohon gaharu dapat menekan sistem saraf pusat sehingga menimbulkan efek menenangkan. Gaharu digunakan dalam bidang farmasi sebagai obat anti muntah, obat penenang, dan obat untuk masalah pencernaan dalam pengobatan tradisional masyarakat timur².

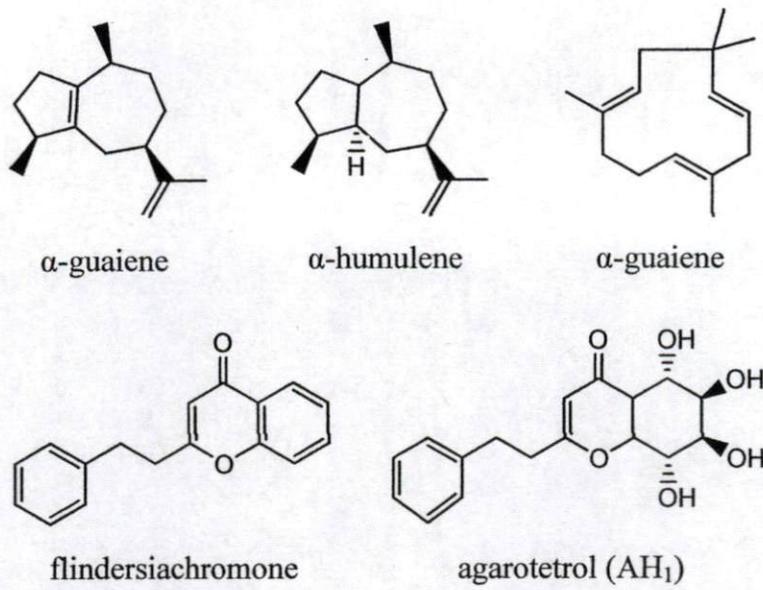


Gambar 2: Gubal gaharu dan minyak essens. 1. Gubal berwarna hitam yang terbentuk di bagian dalam batang tumbuhan *A. malaccensis*; 2. Minyak essens hasil penyulingan gubal gaharu.

Foto: Nasima Akter dan Ananta Neelim¹³

2.1.4 Kandungan Kimia dan Farmakologi

Gaharu dilaporkan mengandung senyawa seskuiterpen, turunan kromon, seskuiterpen furanoid, asam tetradekanoik, dan asam pentadekanoik. Beberapa senyawa kimia yang telah berhasil diidentifikasi, antara lain 3-phenyl-2-butanon, α -guaiene, β -agarofuran, α -agarofuran, nor-ketoagarofuran, 10-epi- γ -eudesmol, agarospirol, β -eudesmol, jinkoh-eremol, kusunol, dan jinkohol II⁸. Shu-Yuan Qi et al. juga berhasil mengidentifikasi 4 turunan kromon dalam kultur suspensi sel dari *Aquilaria sinensis* yang ditambah ekstrak jamur *Melanotus flavolivens*, yaitu 6,7-dimetoksi-2-(2-feniletil); 6,7-dimetoksi-2-(2-(4'-metoksifenil)etil); 6-metoksi-2-[2-(4'-metoksifenil)etil] dan 6-metoksi-2-(2-feniletil)⁹.



Gambar 3: beberapa struktur kimia senyawa seskuiterpen dan turunan kromon yang ditemukan dalam kalus dan kultur suspensi sel *Aquilaria*².

2.2 Jamur *Fusarium* spp.

2.2.1 Klasifikasi taksonomi

- Kingdom : Fungi
- Phylum : Ascomycota
- Class : Sordariomycetes
- Subclass : Hypocreomycetidae
- Ordo : Hypocreales
- Famili : Hypocreaceae
- Genus : *Fusarium*

2.2.2 Deskripsi Jamur

Sekitar 1000 jenis jamur *Fusarium* telah dideskripsikan dalam kurun waktu 100 tahun terakhir. Dalam mengidentifikasi jenis jamur *Fusarium*, karakter morfologi dan tipe *conidia* (spora) ialah hal yang paling penting. langkah awal dalam mengamati morfologi koloni dengan parameter kecepatan berkembang dan ada atau tidaknya pigmentasi pada medium PDA. Selanjutnya, harus diamati pula terbentuk atau tidaknya *chlamydospore* serta bentuk dan ukuran *macroconidia* dan

microconidia. Bentuk *macroconidia* dari jamur *Fusarium* sangat spesifik, berbentuk bulat panjang dan meruncing pada kedua ujungnya, atau seperti bulan sabit. Sementara *microconidia* agak bervariasi dengan bentuk *oval*, *pyriform*, *clavate*, *fusiform*, *napiform*, dan *globose*¹⁴.

Ada tiga spesies *Fusarium* yang berhasil diisolasi dari *Aquilaria* spp., yaitu *Fusarium solani* (Mart.), *Fusarium tricinctum* (Corda), dan *Fusarium sambucinum* Fuckel. Diantara ketiga spesies tersebut, *F. solani* merupakan spesies yang paling banyak ditemukan. *Fusarium solani* dibedakan dengan *F. sambucinum* berdasarkan bentuk mikrokonidianya, sedangkan *F. solani* dapat dibedakan dengan *F. tricinctum* berdasarkan karakter bentuk makrokonidianya juga bentuk mikrokonidianya yang relatif lebih besar dan berbentuk elips¹⁵.

2.3 Proses Terbentuknya Gubal Gaharu

Gubal gaharu tidak bisa terbentuk pada jaringan pohon yang sehat. Gubal gaharu merupakan resin yang diproduksi oleh pohon gaharu sebagai bentuk pertahanan terhadap suatu gangguan seperti infeksi jamur. Mekanisme terbentuknya gaharu secara fisiologis dimulai dari masuknya mikroorganisme penyakit ke dalam jaringan kayu. Infeksi yang terjadi pada tanaman gaharu dapat terjadi secara alami, karena luka yang disebabkan hewan atau api, namun ada juga infeksi buatan. Infeksi jamur terjadi ketika batang tanaman gaharu rusak, kemudian jamur menyerang dan memasuki pembuluh batang. Kerusakan ini membentuk celah seperti terowongan dalam batang pohon. Awalnya, dampak infeksi dapat terlihat dengan adanya lapisan berwarna kecoklatan pada jaringan tanaman. Infeksi jamur ini kemudian perlahan menyebar dan membentuk lapisan-lapisan yang disebut gubal. Semakin banyak infeksi terjadi, gubal yang terbentuk juga semakin banyak. Gubal ini mengandung resin yang wangi. Akumulasi resin yang terbentuk ini kemudian tersimpan pada jaringan kayu membuat serat-serat kayu lebih terikat dan mengubah warna serat dari putih menjadi kecoklatan dan kemudian kehitaman seiring dengan meningkatnya konsentrasi resin tersebut^{16,17}.

III. METODA PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biak Jaringan dan Sel Tumbuhan dan Laboratorium Biosains, Bidang Botani, Pusat Penelitian Biologi-LIPI Cibinong, Jawa Barat, pada Februari sampai Mei 2010.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain: *autoclave* (All American No: 1941X), *laminar air flow* (Ogawa Seiki THS-1300M), cawan petri (Normax), spatula, gelas ukur, pipet takar, kertas saring Whatman No. 41. Analisa senyawa dilakukan dengan *GC-MS* (Varian, Saturn 2000).

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: NH_4NO_3 ; KH_2PO_4 ; KNO_3 ; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; nutrient mikro; FeNaEDTA; Thiamin HCl; myoinositol; gula; agar; 2,4 D (2,4 dikloro fenoksiasetat); *Potato Dextrose Agar (PDA)*; tiga jenis strain jamur *Fusarium* spp.. Biji buah tumbuhan *Aquilaria malaccensis* yang digunakan sebagai bahan eksplan kultur jaringan merupakan koleksi Herbarium Bogor.

3.3 Prosedur Percobaan

3.3.1 Persiapan Materi Penelitian

Penelitian ini menggunakan kalus hasil subkultur embrio biji gaharu yang ditumbuhkan pada media semi padat G_8 (Lampiran 1). Embrio biji ini diambil dari buah salah satu pohon penghasil gubal gaharu, yaitu *Aquilaria malaccensis*. Kemudian kalus yang tumbuh dipindahkan ke media selanjutnya, yaitu D_1 . Galur biak sel GD 95.b.2 digunakan karena menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan galur biak sel yang lain. Subkultur dilakukan secara terus-menerus sampai kalus yang tumbuh mencukupi untuk digunakan sebagai materi penelitian.

3.3.2 Sterilisasi Bahan dan Alat

Alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian disterilisasi menurut cara yang sesuai. Alat gelas seperti cawan petri, spatula, dan media disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 21 menit. Sedangkan *laminar air flow (LAF)* untuk tempat kerja aseptik dibersihkan dengan etanol 70%.

3.3.3 Pembuatan Media Semi Padat D₁

Media semi padat D₁ dibuat dengan komposisi bahan kimia: NH₄NO₃, KNO₃, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, nutrient mikro, FeNaEDTA, Thiamin HCl, myoinositol, gula, dan 2,4 dikloro fenoksiasetat (Lampiran 1). Campuran bahan dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan air destilasi hingga volume yang diinginkan sambil diaduk. Campuran ditera hingga pH menjadi 5,7-5,8. Setelah itu, campuran dimasukkan ke dalam botol *Schot* yang berisi agar. Botol yang berisi media ini serta cawan petri yang akan digunakan kemudian disterilisasi dengan *autoclave*. Setelah proses sterilisasi selesai, media dituang ke cawan petri secara aseptik dalam *laminar air flow*. Media dibiarkan sampai memadat dan cawan petri disegel dengan plastik tipis (*plastic seal*).

3.3.4 Pemiakan Jamur Patogen Gaharu

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini ialah tiga jenis strain *Fusarium* spp., yaitu A Gaharu, B Gaharu, dan LIPI MC 744 (*F. solani*). Stok jamur diremajakan terlebih dahulu dalam agar miring PDA (*Potato Dextrose Agar*) (Lampiran1). Peremajaan juga bertujuan untuk mengetahui waktu optimal pertumbuhan masing-masing strain jamur. Untuk materi penelitian, jamur yang telah diremajakan kemudian diperbanyak diatas media PDA dalam cawan petri.

3.3.5 Subkultur Biak Sel *Aquilaria malaccensis*

Kalus hasil kultur jaringan yang digunakan merupakan kalus yang telah mengalami 6 kali subkultur setelah inisiasi. Kalus berbentuk butiran kecil dan berwarna kuning pucat. Subkultur dilakukan dari media semi padat ke media semi padat dalam cawan petri ukuran sedang (diameter 9,5 cm). Satu cawan petri berisi

7 kelompok biak sel. Untuk penelitian ini, materi kalus yang sudah tersedia kemudian dipindahkan ke cawan petri kecil (diameter 5 cm) sebanyak 2 kelompok biak sel dari cawan petri besar. Setelah semua materi dipindahkan (disubkultur), cawan petri berisi kalus dimasukkan dalam kotak plastik dan disimpan dalam ruang kultur bersuhu 28°C dengan cahaya TL 1000 Lux selama 3 minggu dan diamati pertumbuhannya setiap minggu.

3.3.6 Persiapan Biakan Kalus

Pertumbuhan kalus diamati setiap minggu dan diharapkan kalus yang telah disubkultur akan tumbuh dan menutupi permukaan media tanam. Jika hal ini tidak terjadi, maka dibutuhkan beberapa cawan petri dengan biak sel untuk digabung sehingga semua media tertutupi kalus sebelum inokulasi jamur dilakukan.

3.3.7 Inokulasi Jamur pada Kalus

Kalus beumur tiga minggu dari beberapa cawan petri dipindahkan ke cawan petri dengan media D₁ baru, sehingga total berat kalus yang dipindahkan ialah sebanyak 2,6-2,8 g. Kemudian cawan petri yang berisi biak kalus ini dibuka dan pada permukaan atasnya dilapisi kertas saring (Whatman No. 41) steril yang dilembabkan dengan aquades steril. Biak jamur pada media PDA umur 10 hari dipakai sebagai sumber inokulum. Pada saat ini hifa jamur telah menutup setengah permukaan media tumbuhnya. Biak jamur tersebut dipotong-potong berukuran 0,5 x 0,5 cm. Sebanyak tiga potongan agar dengan hifa di atasnya diletakkan diatas kalus yang telah dialasi kertas saring. Biak kalus ini kemudian disegel dengan plastik tipis dan disimpan dalam lemari kultur jamur.

Jamur yang digunakan untuk menginfeksi kalus, yaitu *Fusarium* sp. dengan tiga jenis strain yang berbeda. Perlakuan yang sama juga dilakukan pada kalus berumur 4 dan 5 minggu. Kemudian dilakukan pengamatan visual terhadap pertumbuhan jamur dipermukaan kertas saring dengan melihat penyebaran hifa serta melihat pengaruh infeksi jamur terhadap kalus melalui perubahan warna kultur kalus dan media pertumbuhannya.

3.3.8 Ekstraksi Kalus, Kalus-Jamur, dan Jamur

Kalus yang telah terinfeksi jamur kemudian diekstrak dengan cara memisahkan kalus dengan kertas saring di atasnya, kemudian kalus beserta media dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan metanol sampai semua bahan terendam, dibiarkan selama satu jam. Hasil ekstraksi disaring, residu diekstraksi lagi dengan metanol dan diambil ekstrakya. Hal ini dilakukan sampai tiga kali (Lampiran 2). Ekstak metanol yang telah digabung kemudian dipartisi dengan heksana dalam corong pisah. Ekstrak heksana diambil, sedangkan ekstrak metanol dipartisi sebanyak dua kali lagi dengan heksana dengan cara yang sama. Ekstrak heksana kemudian digabung dan disaring lagi untuk menghilangkan pengotor (Lampiran 3). Ekstrak kemudian dihilangkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 30°C sampai hanya tersisa 1 mL dalam labu (Lampiran 4). Ekstrak ini kemudian dimasukkan dalam botol kecil untuk kemudian dianalisa dengan *GC-MS*. Hal yang sama juga dilakukan untuk mengekstraksi kultur kalus dan jamur tanpa perlakuan sebagai kontrol.

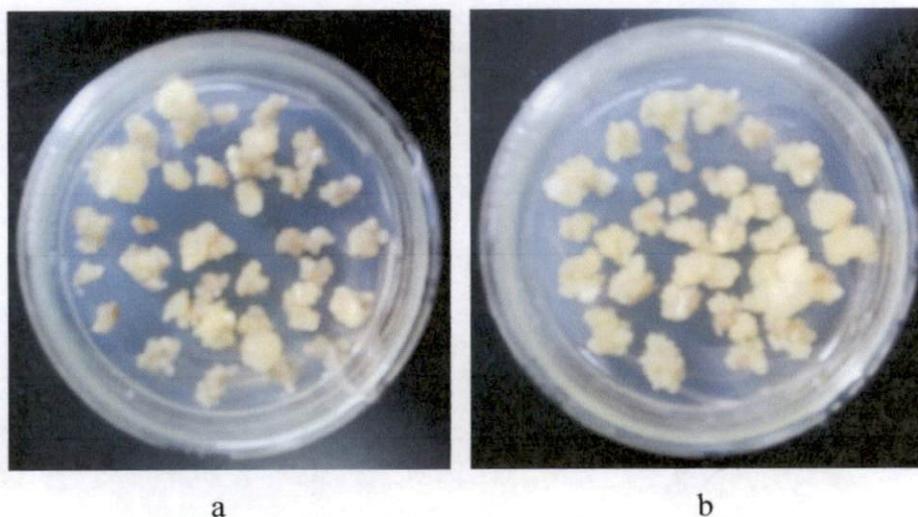
3.3.9 Analisa Ekstrak Kalus, Kalus-Jamur, dan Jamur

Ekstrak yang diperoleh kemudian dianalisa dengan metoda *gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)*. Kondisi *GC-MS*: kolom kapiler *WCOT Fused Silica* (30 m x 0,25 mm); gas pembawa helium; laju alir pelarut 1,3 mL/menit. Suhu kolom diprogram dengan suhu awal 50°C dan suhu akhir 250°C, kenaikan suhu dua tahap, pada tahap awal suhu kolom dibuat konstan 50°C selama 3 menit dan kemudian dinaikkan sampai suhu 150°C dengan kecepatan kenaikan suhu 5°C/menit, selanjutnya suhu dinaikkan sampai 250°C dengan kecepatan kenaikan suhu 3°C/menit dan pada suhu ini dipertahankan selama 4 menit. Suhu injektor diprogram konstan pada 230°C, sedangkan volume sampel yang diinjeksikan adalah 5µL. Setiap puncak dari kromatogram yang dihasilkan kemudian diidentifikasi massa dan fragmen-fragmen massanya dengan membandingkan fragmen massa dari senyawa yang telah diketahui menggunakan bank data dari National Institute Standard of Technology (NIST Library), Mainlib, dan Wiley.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pertumbuhan Kalus

Setelah dilakukan subkultur, kalus gaharu kemudian diamati pertumbuhannya. Kalus yang mengalami pertumbuhan dapat dilihat pada gambar 4.

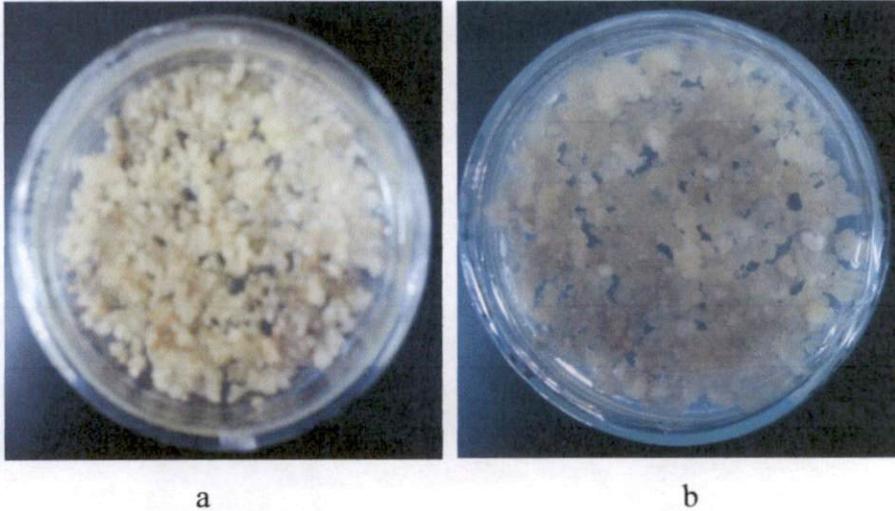


Gambar 4: Pertumbuhan kalus: a. kalus berumur 3 minggu; b. kalus berumur 4 minggu;

Pada minggu pertama kalus mulai tumbuh namun belum menunjukkan pertumbuhan yang signifikan. Kalus pada saat ini diperkirakan mengalami fase lag atau fase adaptasi dengan lingkungan media tanam. Pertumbuhan mulai terjadi pada minggu kedua dimana mulai terlihat kalus membesar dan berwarna kuning kehijauan. Pada masa ini, kalus mengalami fase logaritmik dimana pada fase ini kemungkinan energi yang diperoleh dari media nutrisi sebagian besar diserap untuk pembentukan massa kalus.

Pada minggu kelima kalus mulai mengalami perubahan warna menjadi kecoklatan. Hal ini diakibatkan oleh nutrisi dalam media yang sudah mulai habis. Diperkirakan setelah periode ini, kalus mengalami fase kematian akibat habisnya cadangan nutrisi, dehidrasi media, atau meningkatnya hasil metabolit yang bersifat toksik bagi sel itu sendiri¹⁸. Selain perubahan warna menjadi coklat, karakter fisik yang menandakan kalus mengalami fase kematian ialah mengeringnya sebagian besar massa kalus dan media.

Pertumbuhan kalus yang tidak merata di permukaan media tanam mengharuskan penggabungan beberapa cawan petri dengan biak sel yang berumur sama, sehingga semua media tanam (D₁) tertutup rata dengan kalus. Setelah hal ini dilakukan, kalus kemudian diinokulasi dengan jamur *Fusarium* A Gaharu, *Fusarium* B Gaharu, dan *F. solani* LIPI MC 744.



Gambar 5: Kalus yang sudah digabung dari beberapa cawan petri hingga menutupi permukaan media tanam (a. tampak depan; b. tampak belakang)

4.2 Interaksi Kalus dengan Jamur

Pada hari pertama sampai hari ketiga, jamur belum terlihat menginfeksi kalus, hanya terbentuk sedikit hifa berwarna putih di sekitar inokulum. Pada hari keempat, jamur mulai menginfeksi media kultur kalus yang terlihat dari adanya perubahan warna, sedangkan kalus mulai berwarna agak kecoklatan.

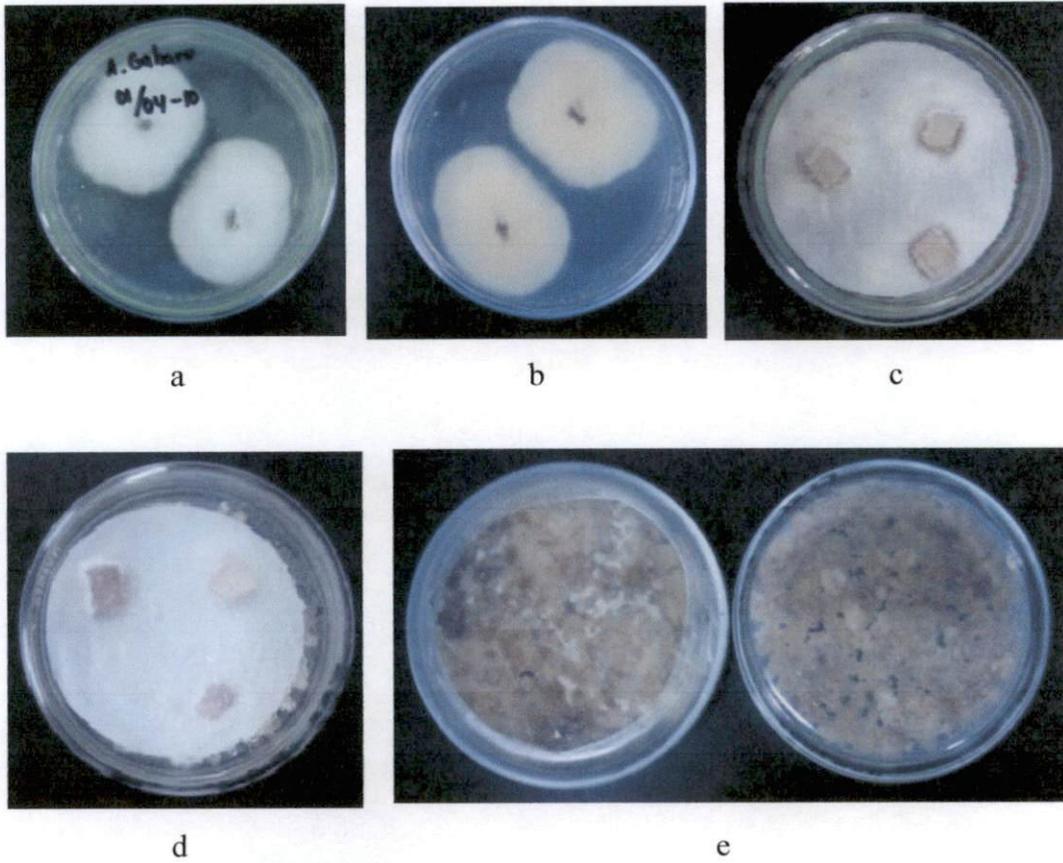
Variasi umur kalus tidak memperlihatkan perbedaan nyata terhadap infeksi yang terjadi. Setelah 10 hari, dilakukan pengamatan warna secara visual dan pengukuran diameter pertumbuhan jamur yang merupakan hasil rata-rata semua ulangan dari setiap perlakuan.

Tabel 1: Pengamatan dan pengukuran diameter pertumbuhan jamur 10 hari setelah inokulasi jamur terhadap kultur kalus

| No. | Jamur | Warna | Diameter pertumbuhan jamur (cm) | Pengamatan pertumbuhan |
|-----|------------------------------------|--------|---------------------------------|---|
| 1 | <i>Fusarium</i> A Gaharu | ungu | 1-1,8 | Hanya sedikit hifa tumbuh disekitar inokulum dan hifa tidak menyebar di permukaan kertas saring |
| 2 | <i>Fusarium</i> B Gaharu | kuning | 1,3-2 | Hifa terbentuk lumayan banyak, hanya menutupi sebagian permukaan kertas saring saja |
| 3 | <i>F. solani</i> LIPI MC 744 | orange | 1,5-2,3 | Hifa banyak dan menutupi hampir seluruh permukaan kertas saring |

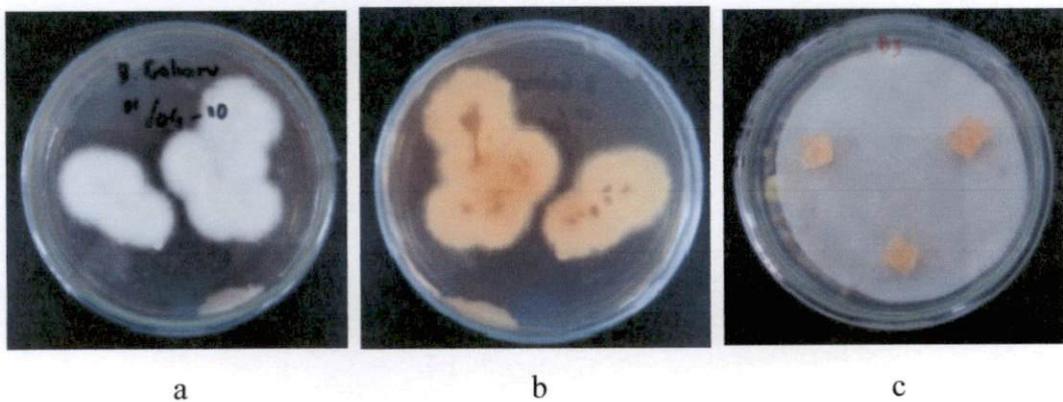
Beberapa hari setelah inokulasi, jamur *Fusarium* A Gaharu memperlihatkan dampak infeksi yang kecil dan lambat. Hanya sedikit hifa yang terbentuk diatas permukaan kertas saring dan infeksi jamur ke kalus juga kurang terlihat (Gambar 6). Infeksi yang terjadi beberapa hari setelah inokulasi jamur *Fusarium* B Gaharu terhadap kultur kalus gaharu menunjukkan adanya interaksi yang lebih baik daripada interaksi kalus dengan jamur *Fusarium* A Gaharu (Gambar 7). Hal ini terlihat dari warna media kultur kalus berubah dan hifa yang tumbuh menyebar hingga menginfeksi kalus. Infeksi jamur *F. solani* LIPI MC 744 menunjukkan hasil yang paling baik, karena dalam beberapa hari saja hifa sudah tumbuh dan mulai menginfeksi kultur kalus. Warna media tanam kultur kalus gaharu juga berubah menjadi oranye sesuai dengan warna jamur penginduksi. Kalus juga terinfeksi yang ditandai dengan beberapa bagian mengalami perubahan warna menjadi coklat (Gambar 8).

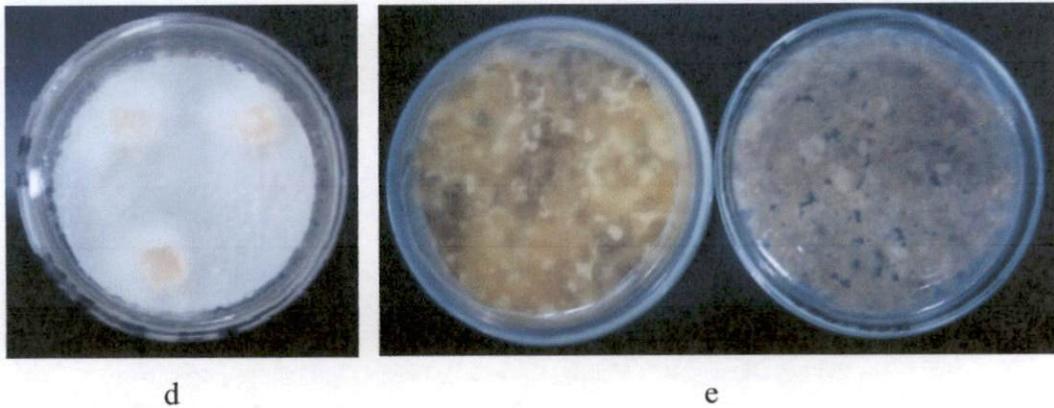
A. Jamur *Fusarium* A Gaharu, Inokulasi, dan Infeksi



Gambar 6: Jamur *Fusarium* A Gaharu, inokulasi, dan infeksi. Ket: a. Jamur (tampak depan); b. jamur (tampak belakang); c. inokulasi; d. infeksi jamur hari kelima (tampak depan); e. infeksi jamur hari kesepuluh (tampak belakang) dibandingkan dengan kontrol (kultur kalus gaharu)

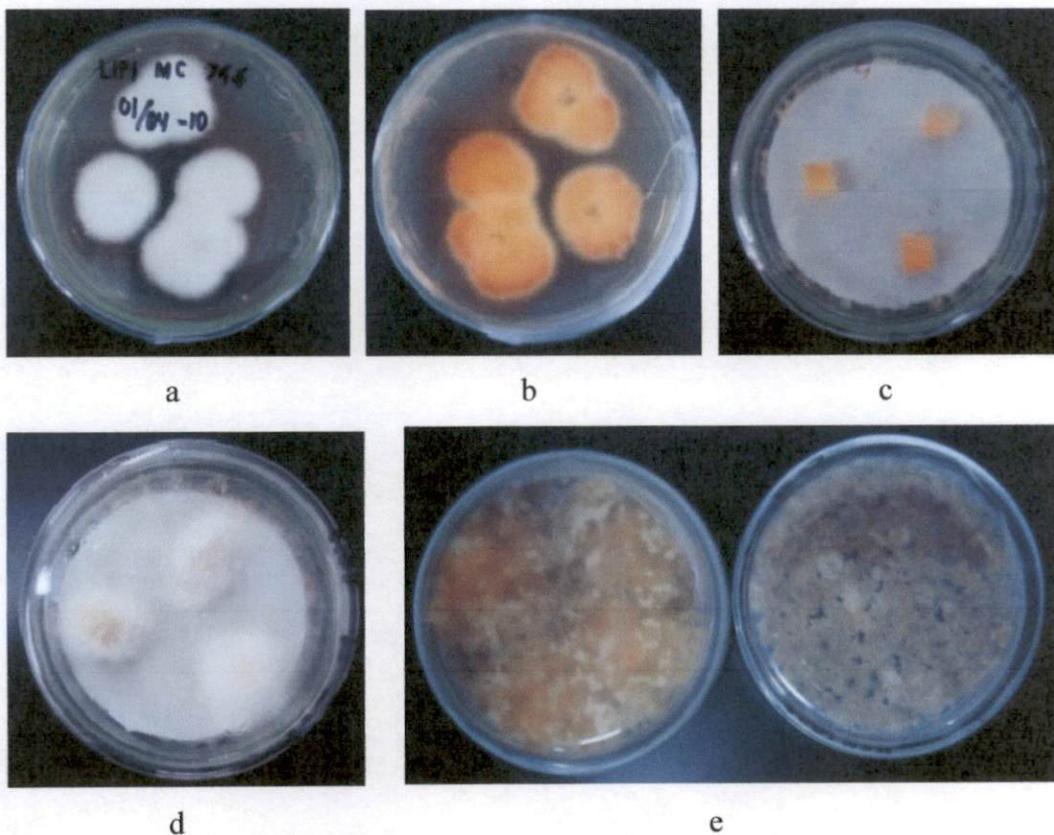
B. Jamur *Fusarium* B Gaharu, Inokulasi, dan Infeksi





Gambar 7: Jamur *Fusarium* B Gaharu, inokulasi, dan infeksi. Ket: a. Jamur (tampak depan); b. jamur (tampak belakang); c. inokulasi; d. infeksi jamur hari kelima (tampak depan); e. infeksi jamur hari kesepuluh (tampak belakang) dibandingkan dengan kontrol (kultur kalus gaharu)

C. Jamur *Fusarium solani* LIPI MC 744, Inokulasi, dan Infeksi



Gambar 8: Jamur *F. solani* LIPI MC 744, inokulasi, dan infeksi. Ket: a. Jamur (tampak depan); b. jamur (tampak belakang); c. inokulasi; d. infeksi jamur hari kelima (tampak depan); e. infeksi jamur hari kesepuluh (tampak belakang) dibandingkan dengan kontrol (kultur kalus gaharu)

4.3 Ekstraksi Kalus-Jamur, Kalus, Jamur, dan Gubal Gaharu

Proses ekstraksi ini menghasilkan ± 75 mL ekstrak metanol pada setiap perlakuan dan ulangan untuk kemudian dipartisi dengan heksana. Seskuiterpen yang diperkirakan terbentuk akibat interaksi kultur kalus gaharu dan jamur merupakan senyawa non polar, oleh karena itu diambil fasa heksana yang kemudian dievaporasi untuk menghilangkan pelarut sebelum diinjeksikan ke *GC-MS*.

Tabel 2. Warna ekstrak metanol dari kontrol kultur kalus, jamur, kalus-jamur, dan gubal gaharu

| No. | Variabel | Warna | |
|-----|------------------------------|------------------------------------|------------------|
| 1 | Kontrol kultur kalus gaharu | kuning pucat + | |
| 2 | Kontrol jamur | Jamur <i>Fusarium A</i> Gaharu | ungu muda |
| | | Jamur <i>Fusarium B</i> Gaharu | kuning pucat ++ |
| | | Jamur <i>F. solani</i> LIPI MC 744 | oranye muda |
| 3 | Interaksi kalus dengan jamur | Jamur <i>Fusarium A</i> Gaharu | kuning pucat + |
| | | Jamur <i>Fusarium B</i> Gaharu | kuning pucat ++ |
| | | Jamur <i>F. solani</i> LIPI MC 744 | kuning pucat +++ |
| 4 | Gubal gaharu | coklat muda | |

Ekstrak metanol dari kalus-jamur yang diperoleh umumnya berwarna kuning pucat, namun ada yang berwarna agak pekat. Hal ini disebabkan oleh perbedaan kemampuan jamur untuk menginfeksi kultur kalus gaharu. Jamur *F. solani* LIPI MC 744 menunjukkan kemampuan infeksi yang lebih baik daripada kedua jamur lainnya. Jamur *Fusarium A* Gaharu memberikan dampak interaksi akibat infeksi lebih lemah yang ditandai dengan warna ekstrak yang lebih pucat dibandingkan dengan ekstrak dari kalus dan jamur yang lain.

Ekstraksi metanol kultur kalus gaharu tanpa perlakuan yang digunakan sebagai kontrol memberikan hasil berupa ekstrak berwarna kuning pucat. Hasil ekstraksi jamur berwarna sama dengan jamur di media tumbuh, yaitu ungu muda (*Fusarium A* Gaharu), kuning pucat (*Fusarium B* Gaharu), dan oranye muda (*F. solani* LIPI MC 744), sedangkan ekstrak gubal gaharu berwarna coklat. Akan tetapi, secara keseluruhan setelah partisi dilakukan dengan pelarut heksana, ekstrak yang diperoleh berwarna bening hingga kuning pucat.

4.4 Produksi Senyawa Seskuitерpen dari Kalus, Jamur, dan Kalus-Jamur

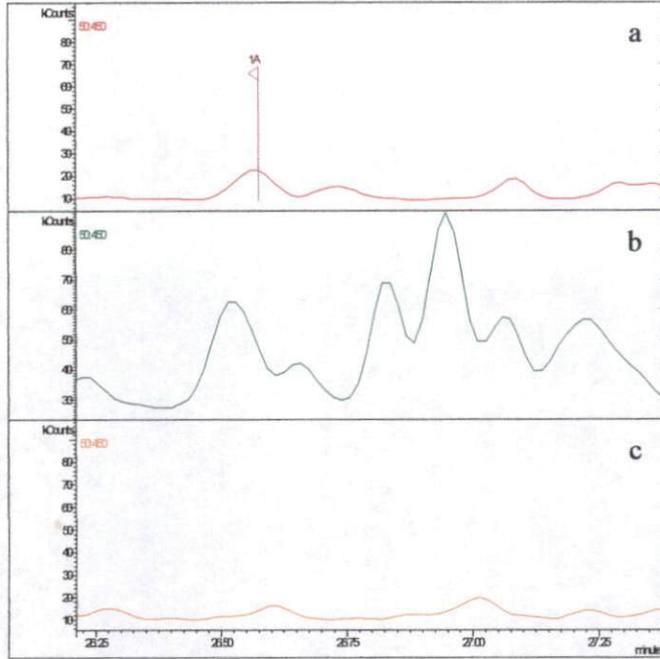
Kromatogram memperlihatkan adanya beberapa puncak yang muncul akibat interaksi kalus gaharu dengan jamur. Puncak ini kemudian diidentifikasi dengan membandingkan spektrum massanya dengan kalus dan jamur tanpa perlakuan sebagai kontrol. Ada beberapa puncak mengindikasikan senyawa baru yang terbentuk akibat interaksi ini, namun karena tujuan penelitian ini difokuskan terhadap produksi metabolit sekunder berupa seskuitерpen, oleh karena itu hanya dipilih senyawa yang memiliki rumus molekul $C_{15}H_{24}$. Berikut tabel senyawa seskuitерpen yang terbentuk akibat interaksi kalus gaharu dengan masing-masing jamur.

Tabel 3: Senyawa seskuitерpen yang terbentuk dari interaksi jamur dan kalus gaharu dengan variasi umur kalus.

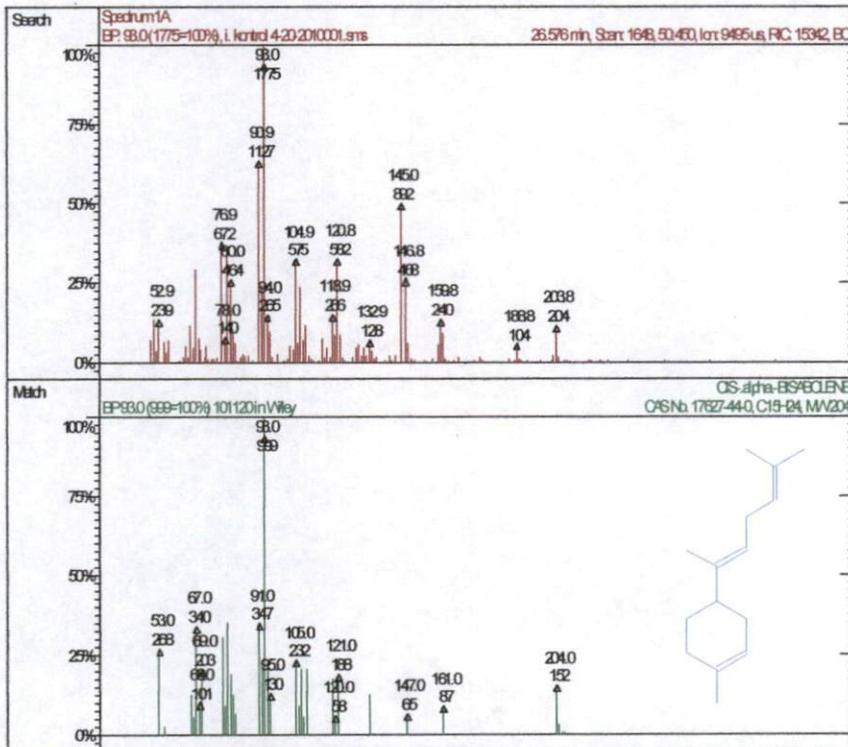
| No. | Senyawa Seskuitерpen | Kontrol | | | | | | Interaksi | | | | | | | | | |
|-----|----------------------|--------------|---|---|-------|---|---|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|--|
| | | Kalus Gaharu | | | Jamur | | | A | | | B | | | C | | | |
| | | 3 | 4 | 5 | A | B | C | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | 3 | 4 | 5 | |
| 1 | cis-alpha-bisabolene | ■ | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | |
| 2 | beta-elemene | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| 3 | alpha-guaiene | | | | | | | | | | | | | | ■ | | |

Keterangan: A. Jamur *Fusarium A* Gaharu; B. jamur *Fusarium B* Gaharu; C. jamur *Fusarium solani* (LIPI MC 744); 3, 4, dan 5 menunjukkan umur kalus (minggu)

Kultur kalus gaharu tanpa perlakuan yang digunakan sebagai kontrol menghasilkan satu senyawa seskuitерpen, yaitu cis-alpha-bisabolene. Senyawa ini hanya dihasilkan pada kalus berumur 3 minggu, sedangkan pada kalus umur 4 dan 5 minggu, puncak yang sama tidak teridentifikasi (Gambar 9). Kontrol jamur, baik jamur *Fusarium A* Gaharu, *Fusarium B* Gaharu, maupun *Fusarium solani* LIPI MC 744 tidak menghasilkan satupun senyawa seskuitерpen.

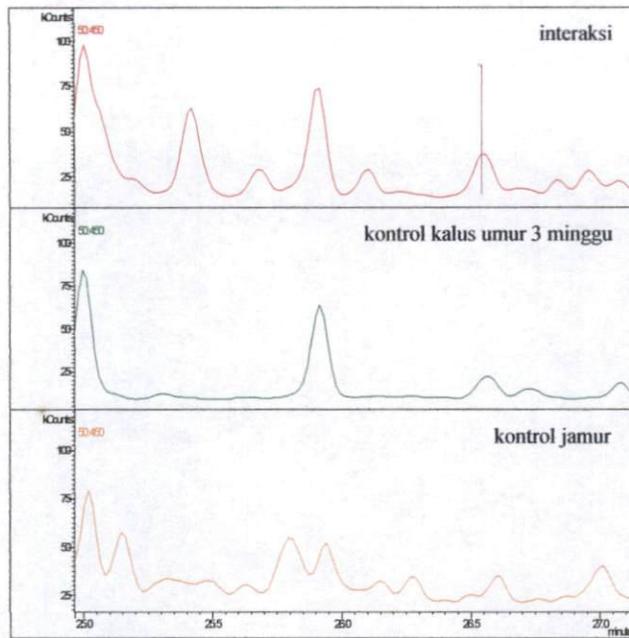


Gambar 9: Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen pada kontrol kalus: a. umur 3 minggu; b. umur 4 minggu; c. umur 5 minggu

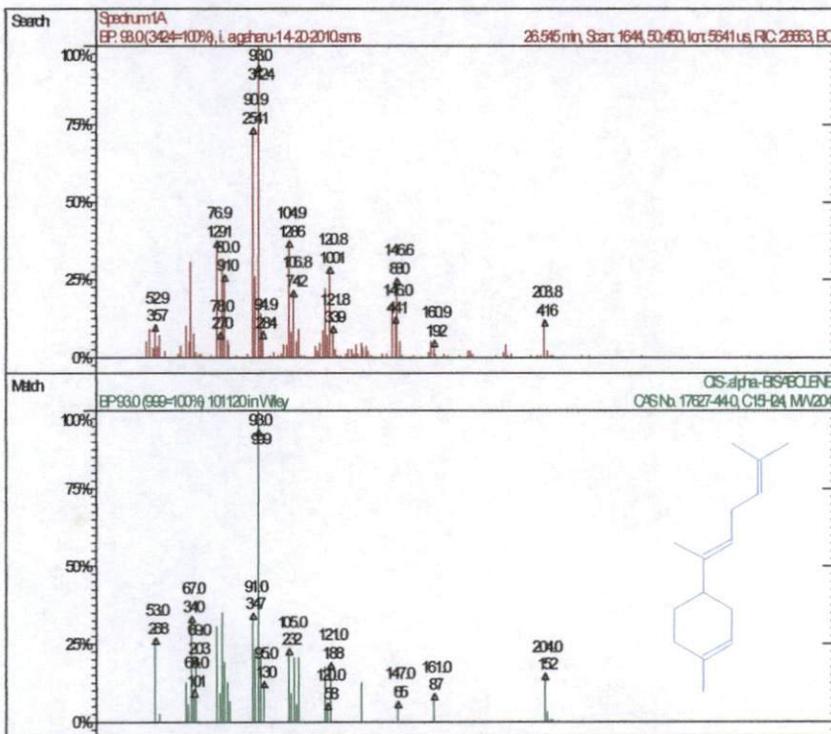


Gambar 10: Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari kontrol kalus umur 3 minggu (atas); spektrum massa dari *MS-library* dan struktur senyawa cis-alpha-bisabolene yang memiliki *probability* paling dekat dengan senyawa hasil interaksi (bawah)

Interaksi kultur kalus gaharu dengan jamur *Fusarium A* Gaharu menghasilkan dua senyawa seskuiterpen, yaitu cis-alpha-bisabolene dan beta elemene.



Gambar 11: Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium A* Gaharu (1)



Gambar 12: Spektrum massa senyawa seskuiterpen dari interaksi kalus dengan jamur *Fusarium A* Gaharu (atas); spektrum massa dari *MS-library* dan struktur senyawa cis-alpha-bisabolene yang memiliki *probability* paling dekat dengan senyawa hasil interaksi (bawah)

Senyawa cis-alpha-bisabolene yang ditemukan dalam kontrol kultur kalus gaharu umur 3 minggu tersebut memiliki konsentrasi yang rendah. Pada kalus yang diinfeksi jamur *Fusarium A Gaharu*, senyawa ini hanya ditemukan pada kultur kalus berumur 3 dan 4 minggu dengan puncak yang lebih tinggi dari puncak senyawa yang sama pada kontrol kalus gaharu. Dengan kata lain, interaksi antara kalus dan jamur berpengaruh terhadap kenaikan konsentrasi cis-alpha-bisabolene pada kalus umur 3 dan 4. Kenaikan konsentrasi ini diperkirakan terjadi karena adanya proses elisitasi, yaitu respon dari suatu sel untuk menghasilkan metabolit sekunder. Elisitasi merupakan proses penambahan elisitor pada sel tumbuhan dengan tujuan untuk menginduksi dan meningkatkan pembentukan metabolit sekunder¹³. Dalam hal ini terjadi proses elisitasi biotik dengan elisitor endogen dan eksogen. Elisitor endogen umumnya berasal dari bagian tumbuhan itu sendiri, seperti bagian dari dinding sel yang rusak karena suatu serangan patogen, sedangkan elisitor eksogen bisa berasal dari dinding jamur *Fusarium* yang digunakan.

Konsentrasi tertinggi terdapat pada ekstrak kalus-jamur dengan umur kalus 4 minggu, sedangkan pada kalus-jamur dengan umur kalus 5 minggu tidak ditemukan senyawa ini, karena pada masa ini kalus diperkirakan mengalami fase kematian diakibatkan habisnya nutrisi dalam media. Hal ini memicu kematian kalus yang diinduksi jamur selain dampak infeksi jamur itu sendiri. Oleh karena itu, senyawa metabolit yang ada pada kalus-jamur umur 3 dan 4 minggu tidak dihasilkan lagi.

Tabel 4: Persentase kenaikan konsentrasi senyawa cis-alpha bisabolene hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium A Gaharu*

| No. | Umur kalus (minggu) | Luas Puncak | Luas Puncak Kontrol | % Kenaikan Konsentrasi |
|-----|---------------------|-------------|---------------------|------------------------|
| 1 | 3 | 169727 | 73358 | 131.37 |
| 2 | 4 | 398787 | - | 443.62 |
| 3 | 5 | - | - | - |

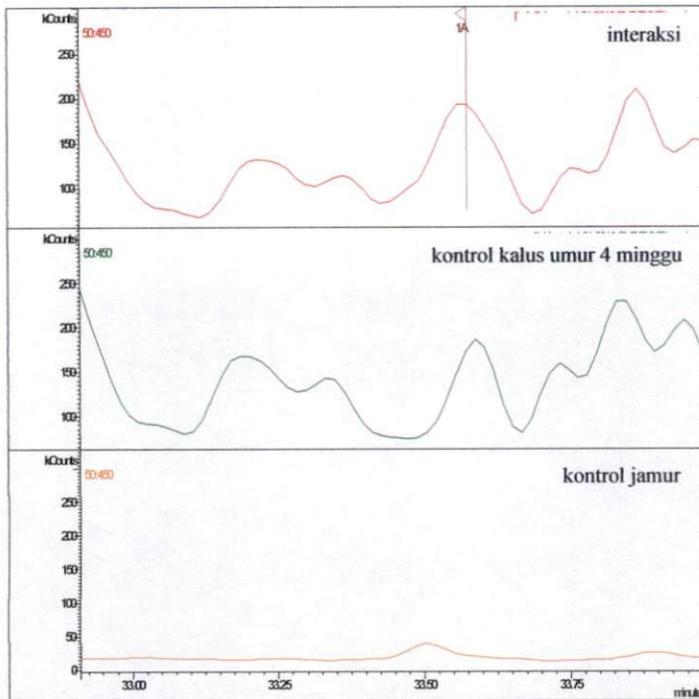
Persen kenaikan konsentrasi dihitung berdasarkan luas area puncak, yaitu perbandingan antara selisih luas area puncak kontrol dan luas area puncak senyawa hasil interaksi dengan luas area puncak kontrol.

$$\% \text{ Kenaikan Konsentrasi} = \frac{\text{Luas area puncak hasil interaksi} - \text{luas area puncak kontrol}}{\text{Luas area puncak kontrol}} \times 100\%$$

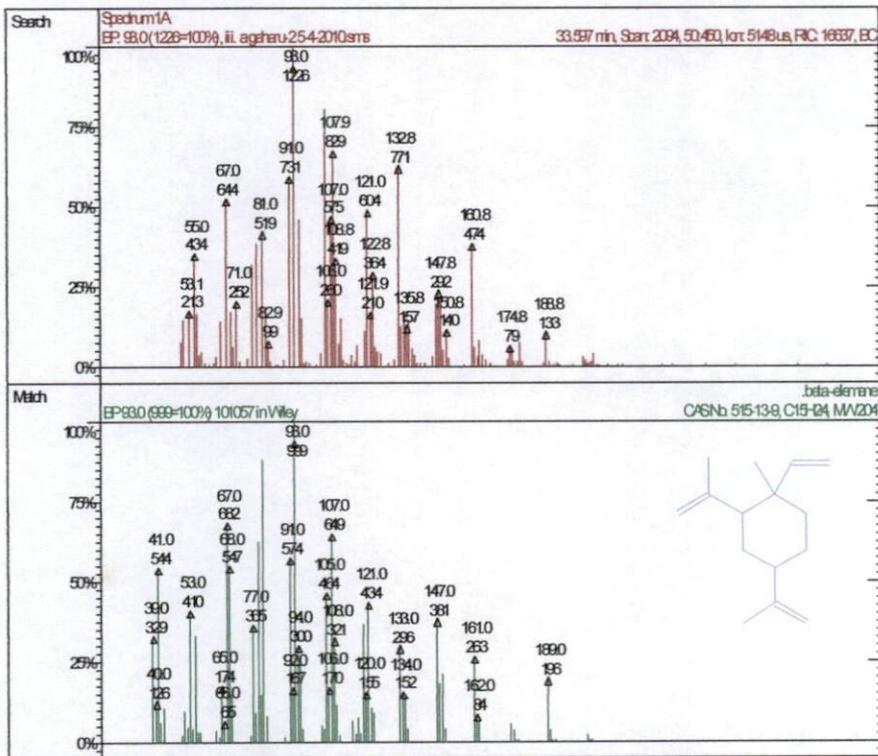
Untuk mendapatkan kenaikan konsentrasi senyawa pada perlakuan umur kalus 4 minggu, digunakan luas area puncak kontrol kalus umur 3 minggu, karena pada kontrol kalus umur 4 minggu, senyawa cis-alpha-bisabolene tidak teridentifikasi. Perhitungan ini hanya untuk membuktikan bahwa interaksi antara kalus dan jamur menghasilkan senyawa dengan konsentrasi lebih tinggi daripada senyawa yang berada di kontrol kalus tanpa perlakuan.

Senyawa cis-alpha-bisabolene yang diperoleh menunjukkan konsentrasi yang lebih tinggi daripada senyawa yang ada pada kontrol. Konsentrasi senyawa ini mengalami kenaikan sebanyak 131,37% pada kalus berumur 3 minggu, sedangkan pada kalus berumur 4 minggu memiliki kenaikan 443,62%.

Senyawa kedua yang ditemukan pada analisa hasil interaksi kalus gaharu dengan jamur *Fusarium A* Gaharu ialah senyawa beta-elemene. Senyawa ini merupakan senyawa hasil interaksi jamur dan kalus, karena senyawa ini tidak ditemukan baik pada kontrol jamur maupun kontrol kultur kalus gaharu. Beta-elemene terdapat pada ketiga kalus-jamur dengan variasi umur kalus, namun konsentrasi tertinggi terdapat pada kalus-jamur dengan kalus berumur 4 minggu.

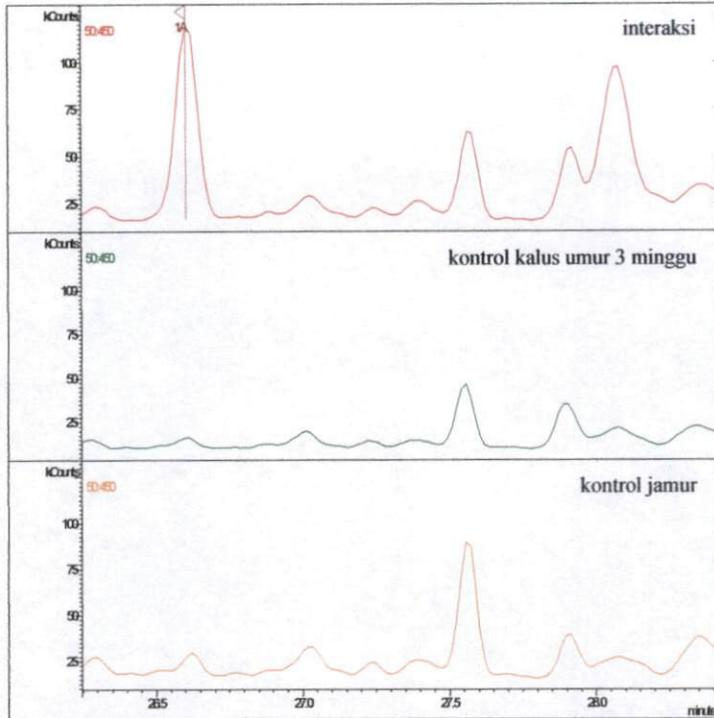


Gambar 13: Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium A Gaharu* (2)



Gambar 14: Spektrum massa dari seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium A Gaharu* (atas); spektrum massa dari *MS-library* dan struktur senyawa beta-elemene yang memiliki *probability* paling dekat dengan senyawa hasil interaksi (bawah)

Interaksi kalus dengan jamur *Fusarium* B Gaharu menghasilkan satu senyawa seskuiterpen, yaitu cis-alpha bisabolene.



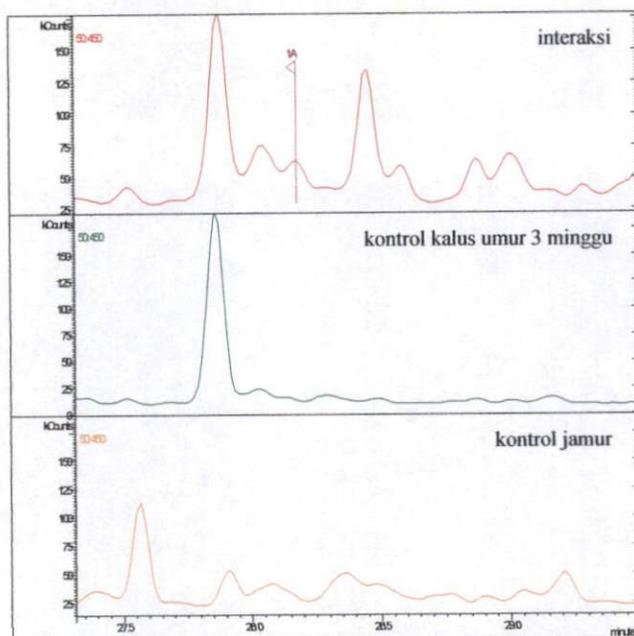
Gambar 15: Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium* B Gaharu

Tabel 5: Persentase kenaikan konsentrasi senyawa cis-alpha bisabolene hasil interaksi kalus dengan jamur *Fusarium* B Gaharu

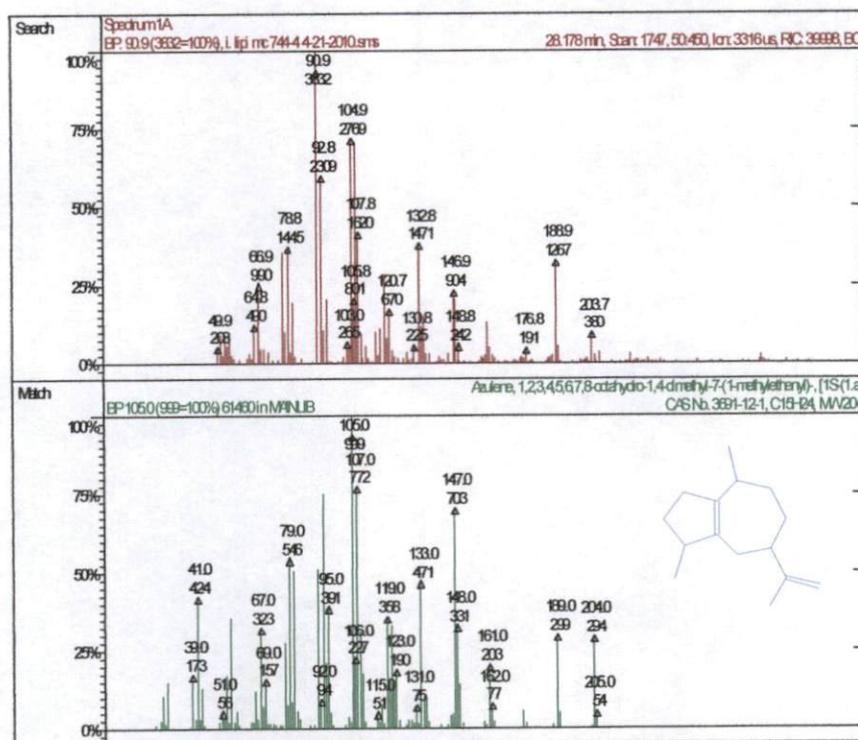
| No. | Umur kalus (minggu) | Luas Puncak | Luas Puncak Kontrol | % Kenaikan Konsentrasi |
|-----|---------------------|-------------|---------------------|------------------------|
| 1 | 3 | 692966 | 73358 | 844.64 |
| 2 | 4 | 761182 | - | 937.63 |
| 3 | 5 | 316148 | - | 330.97 |

Untuk perhitungan persen kenaikan konsentrasi pada perlakuan umur kalus 4 dan 5 minggu, digunakan luas area puncak kontrol kalus umur 3 minggu, karena senyawa cis-alpha-bisabolene ini tidak teridentifikasi pada kontrol kalus berumur 4 dan 5 minggu. Pada umur kalus 3 minggu, konsentrasi senyawa yang dihasilkan 844,63% dari luas area kontrol, umur kalus 4 minggu menghasilkan kenaikan konsentrasi 937,63%, sedangkan pada umur kalus 5 minggu memberikan kenaikan konsentrasi 330,97%.

Interaksi kalus dengan jamur *Fusarium solani* (LIPI MC 744) menghasilkan satu senyawa seskuiterpen, yaitu alpha-guaiene.



Gambar 16: Kromatogram yang menunjukkan puncak senyawa seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *F. solani* LIPI MC 744



Gambar 17: Spektrum massa dari seskuiterpen hasil interaksi kalus dengan jamur *F. solani* LIPI MC 744 (atas); spektrum massa dari *MS-library* dan struktur senyawa alpha-guaiene yang memiliki *probability* paling dekat dengan senyawa hasil interaksi (bawah)

Senyawa alpha-guaiene merupakan hasil interaksi kalus gaharu dengan jamur *Fusarium solani* LIPI MC 744 dan hanya terdapat pada kalus-jamur dengan umur kalus 3 minggu. Puncak yang sama tidak terlihat pada kromatogram kalus-jamur dengan kalus berumur 4 dan 5 minggu, diperkirakan bahwa senyawa alpha-guaiene ini terbentuk secara singkat. Senyawa ini tidak ditemukan dalam ekstrak gubal gaharu, namun terdapat dalam daftar senyawa pada *PROSEA Essential Oil Plant* yang bersumber kepada penelitian Ishihara *et al.*, 1993 yang menyatakan ada sebanyak 0,1% alpha-guaiene terdapat dalam minyak gaharu dari jenis *Aquilaria malaccensis* Lamk¹⁰.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil beberapa kesimpulan, antara lain:

1. Jamur *Fusarium* spp. dengan 3 jenis berbeda yang diinduksikan ke kultur kalus gaharu menunjukkan interaksi yang berbeda-beda, dimana jamur *Fusarium solani* LIPI MC 744 menunjukkan dampak infeksi yang lebih nyata dibanding dua jamur lainnya. Perbedaan umur kultur kalus tidak memberikan dampak signifikan terhadap infeksi jamur.
2. Induksi jamur *Fusarium* spp. terhadap kultur kalus gaharu (*Aquilaria malaccensis*) dapat menghasilkan senyawa seskuiterpen. Senyawa seskuiterpen yang dihasilkan akibat interaksi kalus dengan jamur *Fusarium* A Gaharu adalah cis-alpha-bisabolene dan beta-elemene, interaksi dengan jamur *Fusarium* B Gaharu menghasilkan senyawa cis-alpha-bisabolene, sedangkan interaksi dengan jamur *F. solani* LIPI MC 744 menghasilkan senyawa alpha-guaiene.
3. Umur kalus mempengaruhi produksi seskuiterpen dalam hal persentasi kenaikan konsentrasi. Kalus berumur 4 minggu yang diinduksi jamur memberikan hasil yang paling baik dibandingkan dua umur kalus yang lain, akan tetapi hal ini tidak terjadi pada senyawa hasil interaksi kultur kalus dengan jamur *F. solani* LIPI MC 744.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan analisa lanjutan untuk menentukan konsentrasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan.
2. Perlu adanya penelitian lanjutan mengenai optimasi proses dengan menggunakan parameter baru, misalnya variasi jamur dengan genus berbeda, banyaknya inokulum, dan jumlah kalus yang ditanam di media sebelum diinfeksi demi mencapai produksi metabolit sekunder yang maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hartal, Anwar G. 2007. Teknologi Peningkatan Kualitas Kayu Gubal Gaharu (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) di Kawasan Pesisir Bengkulu Dengan Inokulasi Jamur Penginduksi Resin. *Jurnal Ilmu-ilmu Pertanian Indonesia* 3: 464-471
2. Okudera Y, Michio I. 2009. Production of Agarwood Fragrant Constituent in *Aquilaria* Calli and Suspension Cultures. *Plant Biotechnology*. 26: 307-315
3. Barden A, Awang A, Mulliken T, Song M. 2000. *Heart of the matter: agarwood use and trade and CITES implementation for Aquilaria malaccensis*. TRAFFIC International, Cambridge, UK.
4. Purwianingsih W dan Hamdiyati Y. 2000. Metode Elisitasi Menggunakan Ragi *Sacharomyces cerevisiae* H. untuk Meningkatkan Kandungan Bioaktif Kuinon Kalus *Morinda citrifolia* L. (Mengkudu). *Artikel Biosaintifika* 3:1-14
5. Hendaryono D, Ari W. 1994. *Teknik Kultur Jaringan*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta
6. Puspitasari A, Soegihardjo. 2002. Optimasi Media Penumbuh Kalus sebagai Langkah Awal Budidaya *In Vitro* Tanaman *Vitex Tridolia* L. *Majalah Farmasi Indonesia* 13: 21-25
7. Mahmud LA, Keng CL, Lim BP. 2006. Pertumbuhan dan Akumulasi Alkaloid dalam Kalus dan Suspensi Sel *Eurycoma longifolia* Jack. *Kultura Jurnal Ilmiah Pertanian* 41:19-27
8. Azah N, Chang YS., Mailina J, Abu Said A, Husni A, Hasnida N, Yasmin N. 2008. Comparison of Chemical Profiles of Selected Gaharu Oils from Peninsular Malaysia. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences* 12: 338-340
9. Shu YQ, Meng LH, Li DL, Chuan HZ, Lan JH, Hui ZZ. 2005. Production of 2-(2-phenylethyl) chromones in cell suspension cultures of *Aquilaria sinensis*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 83: 217-221
10. Oyen LP, Nguyen Xuan Dung (Editor). 1999. *Plant Resources of South-East Asia (PROSEA) No. 19 Essential Oil Plants*. Bogor. 64-66

11. Kahfi, Muhamad Khirul. 2008. *A Thesis: Extraction of Gaharu Essential Oil Using Enzymatic Hydrodistillation*. Malaysia: Universiti Malaysia Pahang
12. Kartawinata, Kuswata, Sastrapradja S. 1979. *Kayu Indonesia*. Lembaga Biologi Nasional LIPI, Bogor
13. Akter N dan Neelim A. 2008. *Agarwood Plantation at BRAC Tea Estate: Introduction, Environmental Factors and Financial Analysis*. BRAC Environment Research Report. Bangladesh: Research and Evaluation Division of BRAC
14. Agusta, Andria. 2009. *Biologi dan Kimia Jamur Endofit*. Penerbit ITB, Bandung
15. Agustini, Luciasih, Wahyudi D, Santoso E. 2006. Keanekaragaman Jenis Jamur yang Potensial dalam Pembentukan Gaharu dari Batang *Aquilaria* spp.. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam* 5: 558-559
16. Assam. 2005. *Handbook on Medicinal and Aromatic Plants*. Nedfi-Assam SFAC, India. 39-48
17. Widyastuti, Fauziah R. 2009. *Pengaruh Etilen dalam Menginduksi Pembentukan Senyawa Terpenoid pada Pohon Gaharu (Aquilaria microcarpa)*. Institut Pertanian Bogor, Bogor
18. Helmi, Rahmi Lestari. 2001. Mikropropagasi Tanaman Obat *Brucea javanica*. (L). Merr. yang diinduksi dari Kultur Kalus. *Widyariset* 2:1-10

Lampiran 1. Komposisi media

1. Media G₈ 1000 mL

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 mg/L |
| KNO ₃ | 1900 mg/L |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 mg/L |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 mg/L |
| KH ₂ PO ₄ | 170 mg/L |
| Hara Mikro | 10 mL dari stok |
| FeNa-EDTA | 37,3 mg/L |
| Thiamin HCl | 4 mg/L |
| Myoinositol | 100 mg/L |
| Gula | 30 g/L |
| 2,4 Dikloro fenoksiasetat | 1 mg/L |
| Gelrite | 3 g/L |
| pH 5,7-5,8 | |

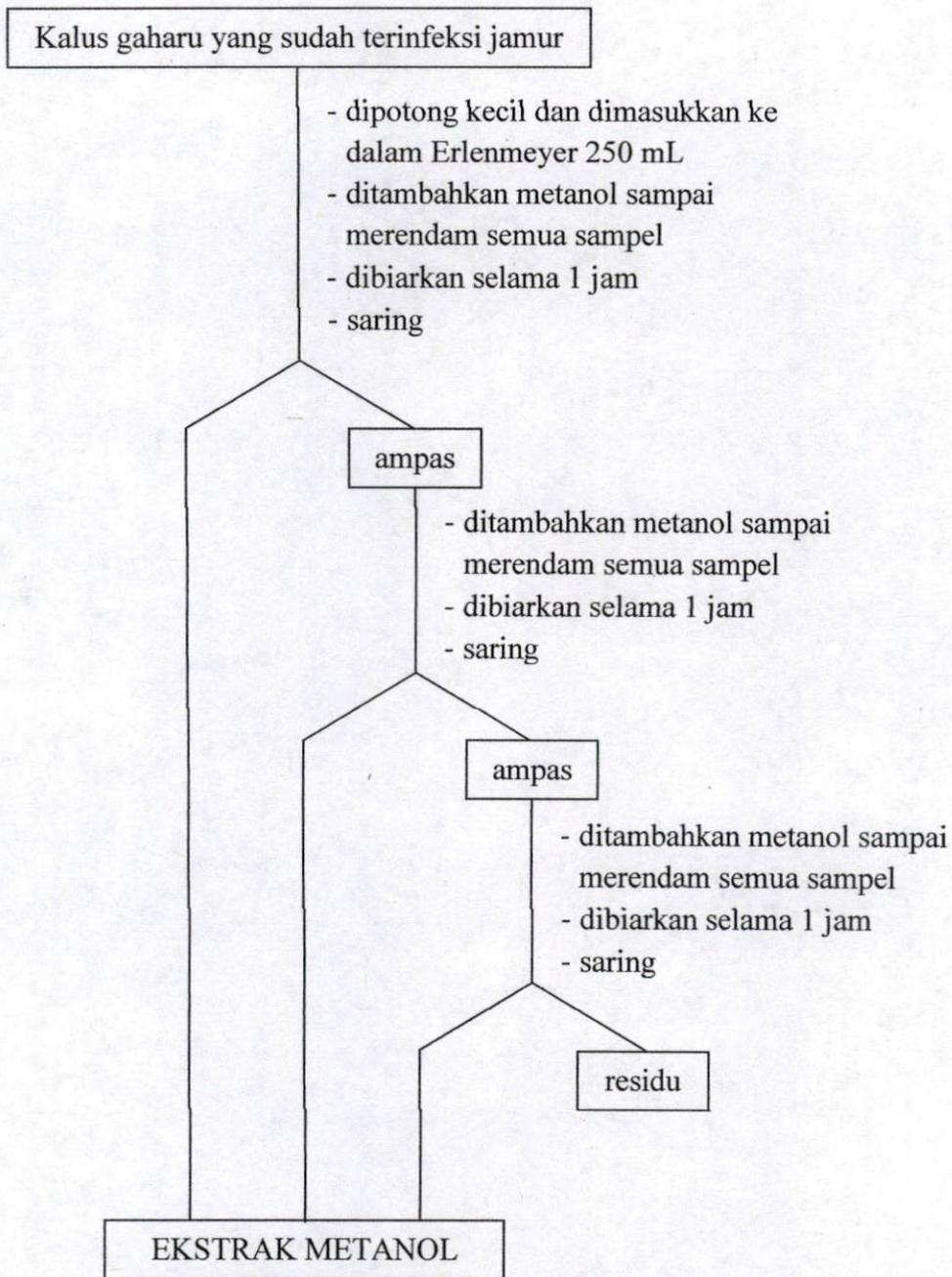
2. Media D₁Q 1000 mL

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| NH ₄ NO ₃ | 1650 mg/L |
| KNO ₃ | 1900 mg/L |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 440 mg/L |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 370 mg/L |
| KH ₂ PO ₄ | 170 mg/L |
| Hara Mikro | 10 mL dari stok |
| FeNa-EDTA | 37,3 mg/L |
| Thiamin HCl | 4 mg/L |
| Myoinositol | 100 mg/L |
| Gula | 30 g/L |
| 2,4 Dikloro fenoksiasetat | 1 mg/L |
| Agar | 8 g/L |
| pH 5,7-5,8 | |

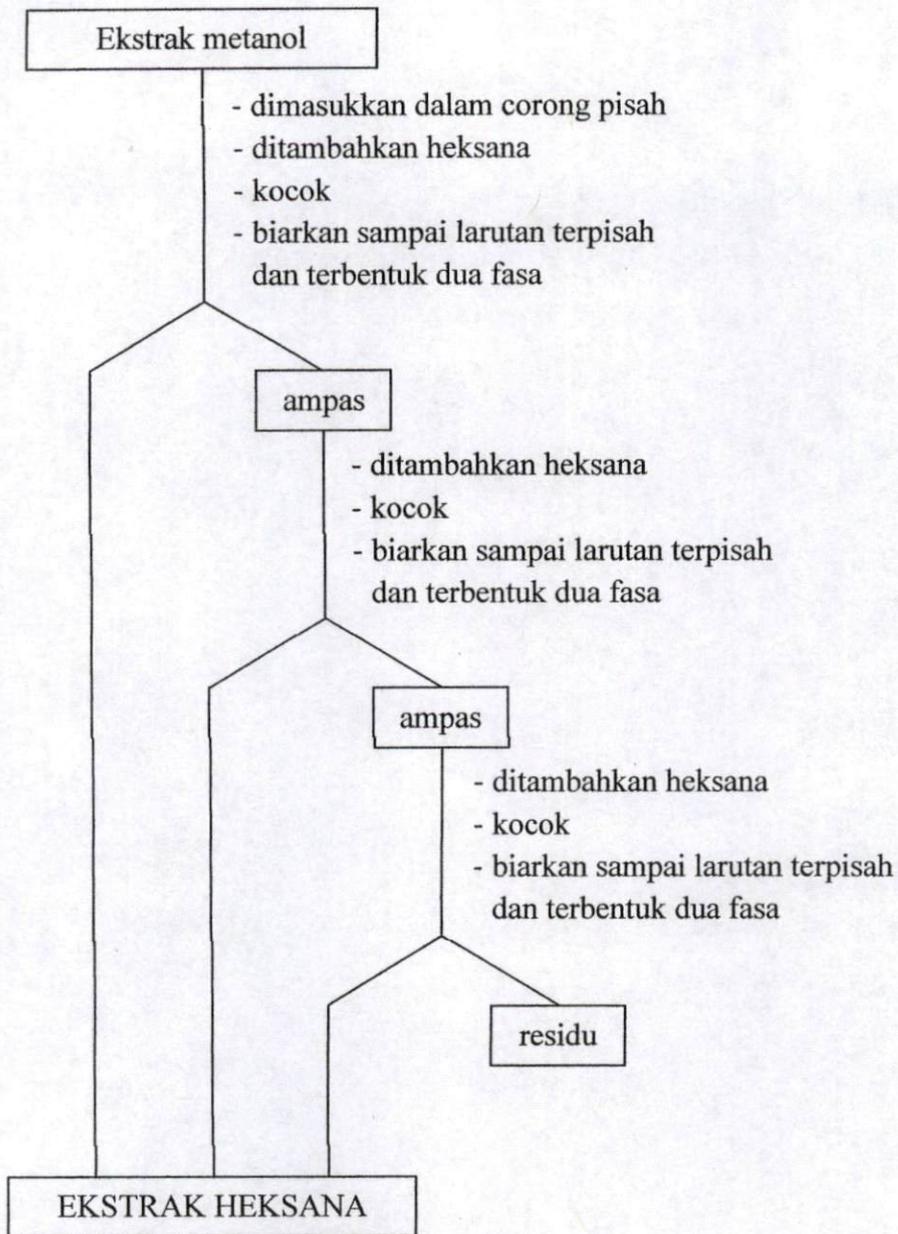
3. *Potato Dextrose Agar (PDA) (39 g/L)*

| | |
|--------------------------|------|
| Agar | 15 g |
| Dekstros | 20 g |
| <i>Potatoes infusion</i> | 4 g |
| Air sumur | 1 L |

Lampiran 2. Ekstraksi kalus, kalus yang terinfeksi jamur, jamur, dan gubal gaharu dengan pelarut metanol



Lampiran 3. Partisi ekstrak metanol dengan pelarut heksana



**Lampiran 4. Evaporasi (penguapan pelarut) dan persiapan sebelum injeksi
GC-MS**

