

**SORDARIOMYCETES, KELOMPOK JAMUR YANG PALING BANYAK
TERISOLASI DARI DAUN JARUM *Pinus radiata* DI AUSTRALIA**
*Sordariomycetes, the most frequently isolated fungal group of Pinus radiata needles in
Australia*

Istiana Prihatini
Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
e-mail: istiana.prihatini@biotifor.or.id

Tanggal diterima : 6 April 2015, Tanggal direvisi : 29 April 2015, Disetujui terbit : 31 Juli 2015

ABSTRACT

Endophytes fungi have been extensively studied in conifer needles involving culture dependent methods, however little number have been conducted in Pinus radiata and no record have been reported from Tasmania. This study aimed to identify the major group of endophyte fungi isolated from P. radiata needles with varied conditions collected from Tasmania, Victoria and New South Wales plantation and confirmed by phylogenetic analysis of ITS gene. Sixteen endophyte fungi species as member of Sordariomycetes were isolated and Coniochaeta sp. 1 was the most frequently isolated species in this study.

Keywords: *Pinus radiata, endophyte fungi, fungal isolate, fungal identification*

ABSTRAK

Jamur endofit pada daun jarum beberapa jenis konifer telah banyak dipelajari melalui teknik isolasi jamur namun belum banyak penelitian yang dilakukan pada jenis *Pinus radiata* dan belum ada studi yang dilaporkan dari Tasmania. Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi kelompok terbesar jamur endofit yang berhasil diisolasi dari daun jarum *P. radiata* dengan beberapa kondisi yang berbeda dari beberapa hutan tanaman di Tasmania, Victoria dan New South Wales serta mengkonfirmasi dengan analisis filogenetik berdasarkan pada sekuen gen ITS. Sebanyak 16 jenis jamur endofit dari golongan kelas Sordariomycetes terisolasi dan *Coniochaeta* sp. 1 merupakan jenis yang paling banyak terisolasi pada penelitian ini.

Kata kunci: *Pinus radiata, jamur endofit, isolat jamur, identifikasi jamur*

I. PENDAHULUAN

Pinus radiata merupakan jenis tanaman kayu lunak yang merupakan komoditas penting di beberapa negara terutama di belahan bumi bagian selatan, seperti Selandia Baru, Chili, Australia, Afrika Selatan dan Argentina. Total luasan hutan tanaman *P. radiata* di seluruh dunia mencapai 4 juta ha (2013). Di Selandia Baru, *P. radiata* merupakan jenis utama

yang dikembangkan pada hutan tanaman dengan luasan mencapai 90% dari total hutan tanaman (NZFOA, 2012), sedangkan di Australia luasannya mendekati 50% dari total hutan tanaman (Gavran, 2012). Adapun hutan tanaman jenis *P. radiata* di Australia tersebar di beberapa wilayah antara lain Tasmania serta beberapa wilayah di bagian selatan daratan utama Australia yaitu New South Wales (NSW), Victoria, South Australia dan bagian

selatan dari wilayah Western Australia (Mead, 2013).

Kendala yang dihadapi dalam pengembangan hutan tanaman *P. radiata* di beberapa bagian dunia saat ini adalah adanya serangan hama dan penyakit (Mead, 2013). Salah satu penyakit yang menyerang tanaman *P. radiata* di Australia dan Selandia Baru adalah jamur pathogen *Cyclaneusma minus* (Mead, 2013). Penyakit ini menyebabkan kerugian sebesar \$38 juta per tahun di Selandia Baru (Watt et al., 2011). Di Tasmania penyakit yang ditemukan menyerang tanaman *P. radiata* adalah penyakit *spring needle cast* (SNC) yang belum diketahui penyebabnya (Podger and Wardlaw 1990b). Adapun dampak dari penyakit SNC yaitu berkurangnya pertumbuhan sebesar diameter batang sebesar 14% pada tanaman yang berumur 9-13 tahun (Podger and Wardlaw, 1990b).

Beberapa cara telah dilakukan untuk mengatasi penyakit akibat serangan jamur patogen pada tanaman *P. radiata*, antara lain dengan penyemprotan fungisida (Bradshaw, 2004, Bulman et al., 2004). Namun aplikasi fungisida ini umumnya memerlukan ulangan serta penelitian lebih lanjut untuk mengetahui adanya interaksi dengan faktor genetik (Merrill and Wenner, 1996). Di Selandia Baru, aplikasi fungisida secara sistemik melalui injeksi telah menunjukkan keberhasilan (Hood

and Vanner, 1984), namun aplikasi lewat udara tidak mampu mengatasi serangan jamur *C. minus* (Vanner, 1986). Hal tersebut menjadi alasan bahwa aplikasi fungisida bukan cara terbaik untuk mengatasi jamur patogen pada skala hutan tanaman (Bulman, 1993). Penyemprotan fungisida juga telah dilakukan untuk mengatasi penyakit SNC di Tasmania, dan menunjukkan hasil positif pada skala penelitian, namun aplikasi di lapangan menjadi tidak efektif (Podger and Wardlaw, 1990a). Penggunaan materi genetik *P. radiata* yang tahan penyakit saat ini sedang diupayakan di Selandia Baru (Bulman et al., 2013), maupun Tasmania (Wardlaw, 2008), namun upaya pengendalian penyakit dengan agen pengendali hayati juga menarik untuk dipelajari (Ganley, 2008; Ganley et al., 2008).

Jenis jamur endofit kelompok Sordariomycetes merupakan kelompok jamur yang cukup banyak terdeteksi dari tanaman konifer misalnya pada *P. taeda* sebanyak 13% isolat yang didapatkan merupakan anggota Sordariomycetes (Arnold et al., 2007), dengan frekuensi isolat sebanyak 16% ditemukan pada *P. halepensis* (Botella et al., 2010) serta ditemukan pada *Pinus wallichiana* dengan frekuensi isolat mencapai 35% (Qadri et al., 2014). Kelompok jamur endofit ini bahkan dilaporkan merupakan kelompok

yang dominan pada daun *P. sylvestris* (Peršoh et al., 2010). Beberapa penelitian menemukan bahwa jamur endofit *Sordariomycetes* memiliki korelasi dengan ketahanan tanaman terhadap serangan hama dan penyakit (Ganley, 2008) atau berkorelasi dengan tanaman yang sehat (Arnold et al., 2003).

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui jenis-jenis jamur kelompok *Sordariomycetes* yang berhasil diisolasi dari daun jarum *Pinus radiata* menggunakan penanda DNA, sebagai langkah awal untuk mempelajari potensinya sebagai agen pengendali hayati terhadap serangan jamur patogen.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Penelitian ini menggunakan daun jarum yang dikoleksi secara acak dari 33 pohon *Pinus radiata* yang ditanam pada beberapa lokasi di Tasmania, NSW dan Victoria (Gambar 1). Jumlah daun jarum yang digunakan dari setiap lokasi berbeda-beda (Tabel 1) karena penelitian awal ini masih bersifat oportunistik. Total sampel yang digunakan untuk isolasi jamur adalah sebanyak 180 helai daun jarum. Sampel daun tersebut digunakan dalam tahapan isolasi jamur endofit untuk mendapatkan jamur endofit yang tumbuh pada daun jarum *P. radiata*.

B. Metode

1. Isolasi dan pemurnian isolat jamur endofit

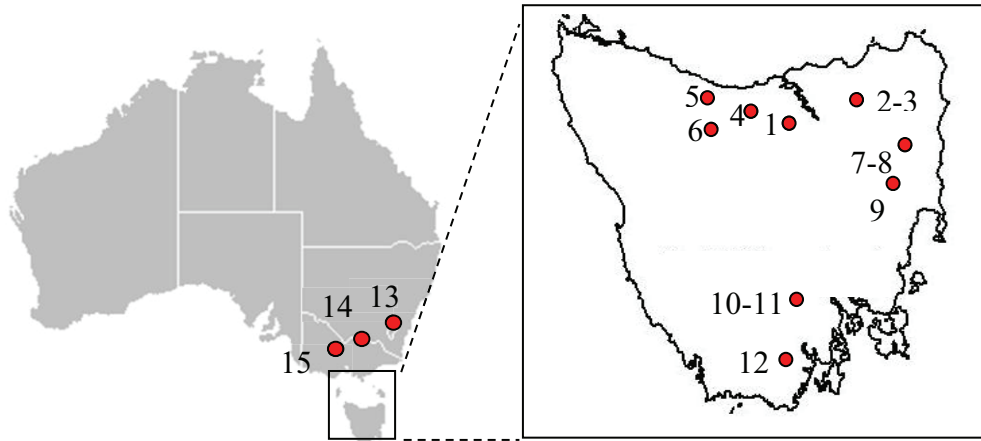
Daun jarum dipilih secara acak dari setiap lokasi meliputi daun yang masih berwarna hijau segar, daun yang berwarna kuning serta sampel daun yang sudah berwarna coklat, baik yang masih menempel ataupun sudah jatuh dari tangkai pohon (Gambar 2).

Semua sampel yang telah dipilih kemudian dibersihkan dan dipotong menjadi 3 atau 4 bagian sepanjang kurang lebih 2-3 cm dan dilakukan sterilisasi permukaan daun. Sterilisasi dilakukan dengan cara merendam dalam larutan ethanol 90% selama 1 menit, dibilas dengan air steril dan direndam dalam larutan *sodium hypochlorite* 4% (NaOCl_2 , Chem. Supply) selama 5 menit serta dibilas kembali dengan air steril sebanyak dua kali. Potongan-potongan daun kemudian dikeringkan menggunakan kertas *tissue* steril dan ditanam pada media MA 1%. Media isolasi kemudian diinkubasikan pada suhu 22°C dan dilakukan pengamatan setiap hari.

Isolat jamur yang telah tumbuh kemudian disubkultur satu persatu pada media MA 1% yang baru untuk mendapatkan isolat murni jamur endofit. Isolat hasil subkultur kemudian diinkubasi kembali pada suhu 22°C. Subkultur

kemudian diamati setiap 3 hari sekali dan dicatat pertumbuhannya. Setelah dua minggu, karakter morfologi isolat meliputi warna miselium, bentuk dan tekstur koloni

serta kecepatan pertumbuhannya diamati dan dikelompokkan menurut Stalpers (1978).



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel daun *P. radiata* di beberapa wilayah di negara bagian Tasmania, NSW dan Victoria, yaitu Branch Creek (1), Springfield (2,3), Oonah (4), Inglis River (5), Longhill (6), Nicholas (7,8), Tower Hill (9), Styx (10), Plenty (11), Franklin (12), Tumbarumba (13), Benalla (14) and Beech Forest (15).

Tabel 1. Jumlah daun jarum dari setiap lokasi yang digunakan dalam tahapan isolasi. Daun berwarna hijau (H), kuning (K) dan coklat (C) yang masih menempel pada pohon *P. radiata*.

Lokasi	Jumlah daun jarum			Jumlah total sampel
	H	K	C	
Victoria	13	2	25	40
NSW	1	1	4	6
Branches Creek, Tasmania	0	0	5	5
Oonah, Tasmania	4	2	34	40
Plenty, Tasmania	2	0	41	43
Springfield, Tasmania	0	1	1	2
Styx, Tasmania	6	2	36	44



Gambar 2. Daun jarum yang masih segar (A), berwarna kuning (B) dan coklat (C) yang digunakan dalam tahapan isolasi jamur endofit.

2. Ekstraksi DNA

Isolat murni jamur digunakan pada tahap ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA dilakukan

menggunakan buffer SDS (Raeder and Broda, 1985) sesuai protokol yang digunakan pada Glen et al. (2002).

3. Amplifikasi PCR dan Electroforesis

Reaksi PCR dilakukan menggunakan Mangotaq DNA polymerase (Bioline) sesuai dengan prosedur yang dilakukan pada penelitian sebelumnya (Prihatini, 2014) pada volume akhir 50 μ l. Primer yang digunakan pada penelitian ini adalah primer ITS1F (Gardes and Bruns, 1993) dan ITS4 (White et al., 1990). Produk hasil amplifikasi PCR dipisahkan melalui proses elektroforesis pada gel agarose 1% sesuai dengan penelitian sebelumnya (Prihatini, 2014).

4. Sekuensing DNA dan Analisis data hasil sequencing

Sekuensing DNA dan analisis data hasil sekuensing dilakukan sesuai dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya (Prihatini, 2014). Hasil pencocokan identitas jamur sampel yang digunakan dalam penelitian terhadap sekuen DNA jamur pada database GenBank dari National Center for Biotechnology Information (NCBI) menggunakan BLAST kemudian dikelompokkan sesuai dengan tingkat kemiripannya. Sekuen DNA dari kelompok isolat yang masuk dalam golongan *Sordariomycetes* kemudian dianalisis menggunakan program ClustalW (Thompson et al., 1994) untuk membuat *alignment* terhadap

semua sekuen. Hasil *alignment* kemudian digunakan dalam analisis filogenetik dengan pendekatan *maximum likelihood* menggunakan program DNAML. Analisis filogenetik terhadap kelompok *Sordariomycetes* dilakukan menggunakan beberapa sekuen DNA yang mewakili setiap kelompok cluster dari hasil analisis pertama serta sekuen referensi yang didapat dari database GenBank (Tabel 2). Analisis filogenetik lanjutan dilakukan dengan pendekatan *maximum likelihood* dengan program DNAML yang tersedia pada paket program PHYLIP (Felsenstein, 1989). Gambar pohon filogenetik dibuat menggunakan program Mega6.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

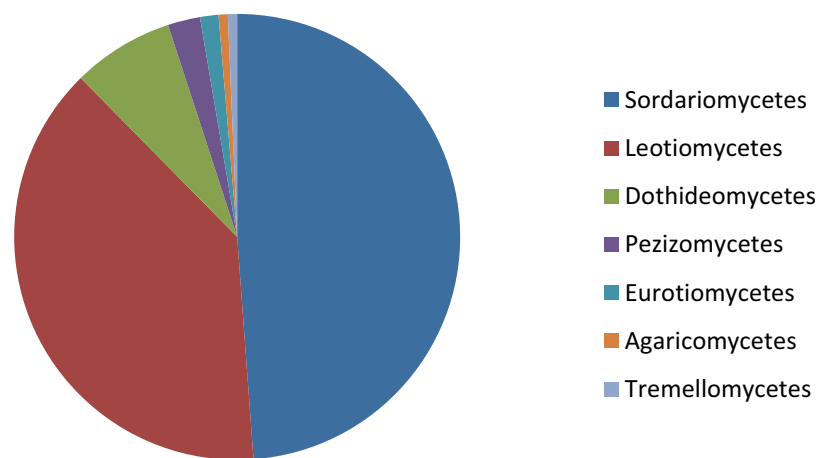
A. Hasil

1. Isolasi jamur endofit

Jamur endofit berhasil diisolasi dari 172 sampel daun jarum yang digunakan, hanya 8 sampel daun yang tidak berhasil diisolasi jamur endofitnya. Jumlah kultur jamur yang berhasil diisolasi bervariasi mulai dari tidak ada isolat hingga 6 isolat per potongan daun dengan karakter morfologi berbeda. Total jamur endofit yang berhasil diisolasi adalah sebanyak 588 isolat. Hasil pengamatan terhadap karakter morfologi isolat jamur didapatkan 26 kelompok isolat yang memiliki jumlah anggota

paling sedikit tiga, dan ditemukan 14 tipe isolat yang hanya memiliki satu anggota (*singleton*). Hasil pemilihan sampel yang mewakili tiap kelompok isolat yang berbeda dipilih dan semua isolat *singleton* mendapatkan 295 sampel untuk diproses. Analisis BLAST untuk mencocokkan sekuen DNA sampel dengan sekuen

database GenBank dari NCBI menghasilkan 140 sekuen masuk dalam kelompok Sordariomycetes, 116 isolat masuk dalam kelompok Leotiomycetes dan sisanya tersebar masuk ke dalam beberapa kelompok Dothideomycetes, Pezizomycetes, Leotiomycetes serta anggota Basidiomycetes (Gambar 3).



Gambar 3. Diagram hasil analisis BLAST terhadap 299 sekuen isolat jamur endofit daun jarum *Pinus radiata*.

2. Analisis filogenetik jamur

Sordariomycetes

Analisis filogenetik pertama terhadap 139 sekuen jamur endofit Sordariomycetes (10 sampel sekuen tidak disertakan karena kualitasnya tidak bagus) untuk memisahkan sampel dalam kelompok sesuai dengan karakter sekuen bagian ITS. Dari hasil analisis ini didapatkan sebanyak 11 kluster (data tidak dilampirkan). Setiap wakil dari kelompok ini kemudian dipilih dan

dilakukan analisis kedua menggunakan sekuen DNA referensi dari database GenBank yang memiliki kecocokan tertinggi dengan sekuen DNA sampel (Gambar 4).

3. Jenis-jenis jamur Sordariomycetes yang terisolasi dari daun *P. radiata*

Hasil analisis filogenetik menggunakan metode DNAML memberikan gambaran bahwa ada 3 kelompok besar jamur yang termasuk dalam kelas Sordariomycetes, yaitu

Hypocreales, Sordariales-Coniochaetales, dan Xylariales. Hypocreales memiliki 2 anggota jenis yaitu *Fusarium* sp. dan *Xylomelasma* sp., meskipun jenis kedua masuk dalam klaster Sordariales-Coniochaetales.

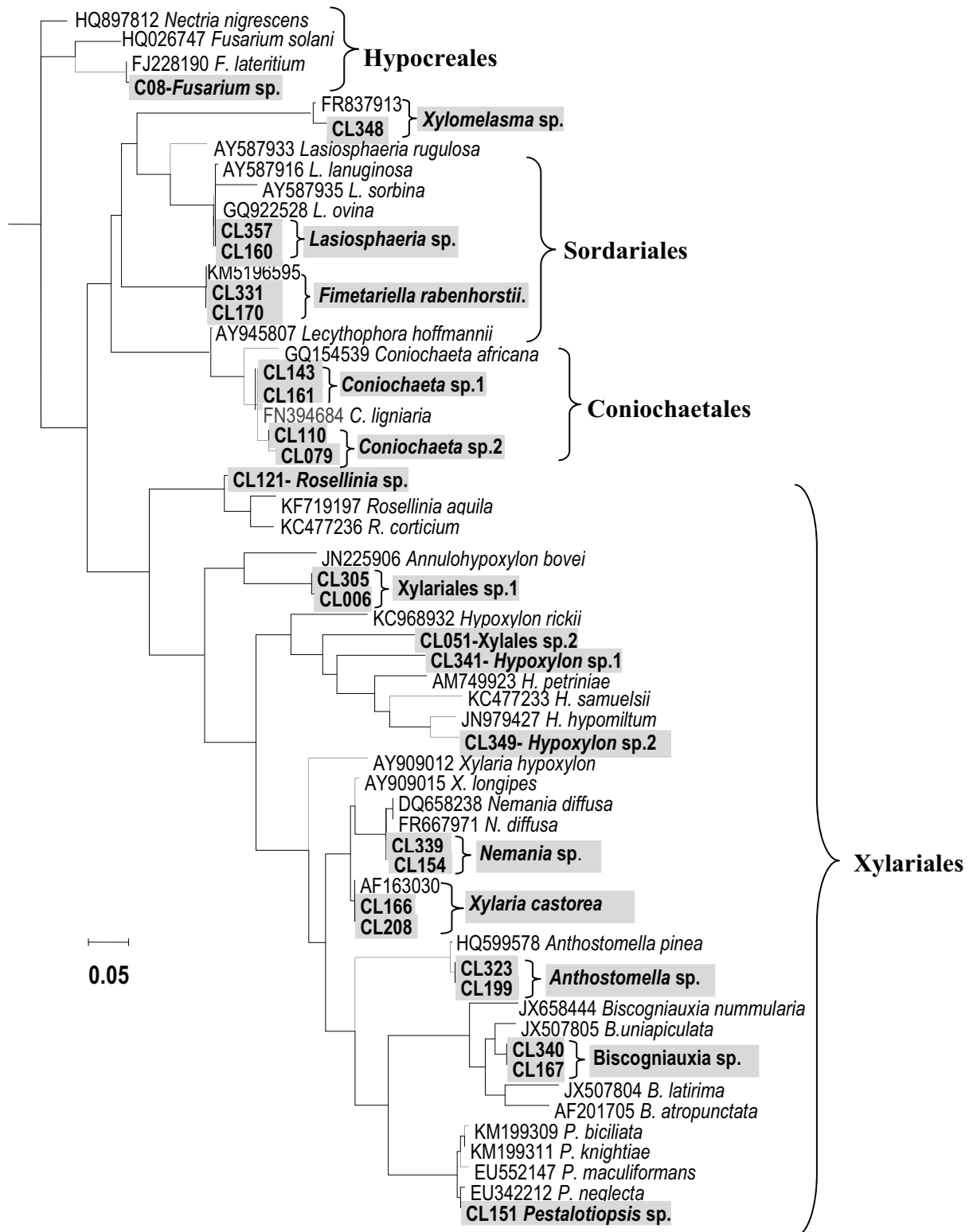
Tabel 2. Sekuen referensi dari database Genbank (GB) yang digunakan dalam analisis filogenetik bersama dengan sekuen jamur Sordariomycetes yang diisolasi dari daun jarum *P. radiata*.

Jenis jamur	No akses GenBank	Asal	Pohon inang	No koleksi
<i>Annulohyphoxylon bovei</i>	JN225906	Selandia Baru	<i>Nothofagus solandri</i> (daun)	ICMP 18814
<i>Anthostomella pinea</i>	HQ599578	Perancis	<i>Pinus</i> sp. (daun)	CBS 128205
<i>Biscogniauxia atropunctata</i>	AF201705	Amerika Serikat	<i>Quercus</i> sp.	ATCC 3898
<i>B. latirima</i>	JX507804	Taiwan	<i>Quercus</i> sp. (kulit batang)	td
<i>B. nummularia</i>	JX658444	Perancis	<i>Fagus</i> sp.	MUCL 51395
<i>B. uniapiculata</i>	JX507805	Taiwan	<i>Quercus</i> sp. (kulit batang)	td
<i>Coniochaeta africana</i>	GQ154539	Afrika Selatan	<i>Prunus salicina</i> (kayu)	CBS 120868
<i>C. ligniaria</i>	FN394684	Spanyol	<i>Holcus lanatus</i>	td
<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	KM519659	Portugis	<i>Cobrancosa</i> sp. (daun)	td
<i>Fusarium solani</i>	HQ026747	Perancis	<i>Fraxinus excelsior</i>	ATCC 36031
<i>F. lateritium</i>	FJ228190	Swedia	<i>Fraxinus excelsior</i>	
<i>Hypoxylon hypomiltum</i>	KC968914	Martinik	td	MUCL 53312
<i>H. petriniae</i>	AM749923	Perancis	<i>Populus tremulus</i>	CBS 115158
<i>H. rickii</i>	KC968932	Martinik	td	MUCL 53309
<i>H. samuelsii</i>	KC968916	Martinik	td	MUCL 51843
<i>Lasiosphaeria lanuginosa</i>	AY587916	Costa Rica	td	td
<i>L. ovina</i>	GQ922528	Kanada	td	CBS 725.69
<i>L. rugulosa</i>	AY587933	Puerto Rico	td	td
<i>L. sorbina</i>	AY587935	Jerman	td	CBS 885
<i>Lecythophora hoffmannii</i> (= <i>C. hoffmannii</i>)	AY945807	Swiss	td	CBS 245.38
<i>Nectria nigrescens</i>	HQ897812	td	td	CBS 125500
<i>Nemania diffusa</i>	FR667971	Spanyol	<i>Eucalyptus globulus</i>	td
<i>N. diffusa</i>	DQ658238	Perancis	<i>Corylus avellana</i>	td
<i>Pestalotiopsis biciliata</i>	KM199309	Italia	td	CBS 236.38
<i>P. knightiae</i>	KM199311	Selandia Baru	<i>Knightia</i> sp.	CBS 111963
<i>P. maculiformans</i>	EU552147	Afrika Selatan	<i>Leucospermum</i> sp.	CBS 122683
<i>P. neglecta</i>	EU342212	Chili	<i>Vaccinium</i> spp.	td
<i>Rosellinia aquila</i>	KF719197	Afrika Selatan	td	CBS 399.61
<i>R. corticium</i>	KC477236	Perancis	<i>Populus</i> sp.	MUCL 51693
<i>Xylaria castorea</i>	AF163030	Selandia Baru	<i>Coprosma</i> sp.	ATCC 76020
<i>X. hypoxylon</i>	AY909012	Belanda	<i>P. abies</i>	CBS 590
<i>X. longipes</i>	AY909015	Jerman	td	CBS 580
<i>Xylomelasma</i> sp.	FR837913	Chechnya	<i>P. abies</i>	

Catatan: Td = informasi tidak tersedia

Tabel 3. Jenis-jenis jamur Sordariomycetes dari daun *P. radiata* yang terisolasi (I) dan teridentifikasi melalui sekuen DNA ITS (S) dan kemiripan sekuen ITS rDNA dengan sekuen lain pada database GenBank (*)

Ordo /Familia	Jenis jamur	Jumlah isolat		Keterangan (*)
		I	S	
Coniochaetales /		126		
Coniochaetaceae	<i>Coniochaeta</i> sp. 1	-	74	100% mirip dengan beberapa isolat <i>Coniochaeta-Lecytophthora</i> , termasuk <i>C. ligniaria</i> FN394684
	<i>Coniochaeta</i> sp. 2	-	4	99% mirip dengan beberapa isolat <i>Coniochaeta</i> , termasuk <i>C. ligniaria</i> FN394684
Hypocreales /				
Nectriaceae	<i>Fusarium</i> sp.	1	1	95-97% mirip dengan beberapa isolat <i>Fusarium</i> , termasuk <i>F. lateritium</i> FJ228190
	<i>Xylomelasma</i> sp.	1	1	97% mirip dengan <i>Xylomelasma</i> sp. FR837913 dan 95% mirip dengan beberapa jenis <i>Nectria</i> , termasuk <i>N. nigrescens</i> CBS125500
Sordariales/				
Lasiosphaeriaceae	<i>Lasiosphaeria</i> sp.	6	5	99% mirip dengan beberapa isolat <i>L. ovina</i> termasuk CBS 725.69
	<i>Fimetariella rabenhorstii</i>	12	11	100% mirip dengan beberapa isolat <i>F. rabenhorstii</i> termasuk KM519659
Xylariales /		36		
tidak diketahui				
	<i>Xylariales</i> sp.1	-	20	90% mirip dengan beberapa isolat <i>Hypoxyton</i> , dan hingga 97% mirip dengan beberapa isolat Xylariales yang tidak diketahui jenisnya.
	<i>Xylariales</i> sp. 2	-	1	80-93% mirip dengan beberapa isolat <i>Hypoxyton</i> dan <i>Annulohypoxyton</i> termasuk <i>A. bovei</i> ICMP 18814
Xylariales /				
Xylariaceae	<i>Nemania diffusa</i>	19	14	100% mirip dengan beberapa isolat <i>N. diffusa</i> termasuk FR667971
	<i>Anthostomella pinea</i>	13	3	99% mirip dengan <i>A. pinea</i> CBS 128205
	<i>Xylaria castorea</i>	8	4	99% mirip dengan beberapa isolat <i>X. castorea</i> termasuk ATCC 76020
	<i>Biscogniauxia</i> sp.	5	3	92-99% mirip dengan beberapa jenis <i>Biscogniauxia</i> termasuk <i>B. atropunctata</i> ATCC 3898
	<i>Hypoxyton</i> sp. 1	1	1	85% mirip dengan beberapa isolat <i>Hypoxyton</i> , termasuk <i>H. petriniae</i> CBS 115158
	<i>Hypoxyton</i> sp. 2	1	1	85-91% mirip dengan beberapa isolat <i>Hypoxyton</i> , termasuk <i>H. hypomiltum</i> MUCL 53312
	<i>Rosellinia</i> sp	1	1	90-94% mirip dengan beberapa isolat <i>Rosellinia</i> , termasuk <i>R.corticium</i> MUCL 51693
	Amphisphaeriaceae	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	1	1



Gambar 4. Analisis filogenetik menggunakan pendekatan *Maximum Likelihood* terhadap 15 sekuen ITS rDNA jamur endofit yang terisolasi dari daun jarum *Pinus radiata* (dicetak huruf tebal) dan sekuen referensi yang didapat dari GenBank. Bar menunjukkan adanya variasi nukleotida sebesar 5%. Sekuen dari *Nectria nigrescens* digunakan sebagai *outgroup*.

B. Pembahasan

Identifikasi molekuler terhadap semua sekuen sampel jamur endofit mendapatkan hampir setengah (42,9%) dari isolat jamur yang didapatkan pada penelitian ini merupakan kelompok Sordariomycetes, adapun secara morfologi didapatkan sebesar 39.5% dari total isolat. Kelompok Sordariomycetes memiliki 16 anggota jenis yang teridentifikasi pada penelitian ini (Tabel 3).

Ordo Coniochaetales diwakili oleh *Coniochaeta* pada analisis filogenetik terbagi pada 2 klaster yang jelas berbeda. *Coniochaeta* spp, merupakan jenis yang paling banyak diisolasi (126 isolat) dari daun jarum *P. radiata* pada penelitian ini, Kelompok ini memiliki kedekatan hingga 100% dengan *Coniochaeta ligniaria* (anamorf dari *Lecythophora hoffmannii*). Jamur jenis ini telah ditemukan pada tanaman *Pinus* jenis lain, yaitu pada bagian sapwood *P. sylvestris* (Raberg et al., 2007). Beberapa jenis jamur dari genus *Coniochaeta* juga telah dilaporkan sebagai penyebab nekrotik pada *Prunus* di Afrika Selatan dan Belanda (Damm et al., 2010), pada *Pinus sylvestris* di Swiss (Petrini and Fisher, 1988) dan Jerman (Raberg et al., 2007), serta dilaporkan dapat menyebabkan infeksi pada manusia (Damm et al., 2010). Rosa et al. (2013) menemukan manfaat positif dari jamur *C.*

ligniaria yaitu memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan jamur fitopatogen *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae* and *C. gloeosporioides*

Jamur *C. ligniaria* juga dilaporkan sebagai jenis yang paling umum ditemukan pada pohon *P. sylvestris* (Raberg et al., 2007), sedangkan pada hutan campuran dengan *Fagus sylvatica*, *C. tetraspora* merupakan satu-satunya jenis yang ditemukan pada batang *P. sylvestris* (Petrini and Fisher, 1988). Jamur *C. ligniaria* telah digunakan dalam skala industry untuk menghasilkan beberapa bahan kimia antara lain *chaetiaccandin sulphate*, *lecythophorin* (Ayer and Kawahara, 1995), *xylarinols* dan *benzoxepin* (Lee et al., 2009; Hacıoglu et al., 2011) sebagai bahan kimia untuk mengendalikan mikroorganisme tertentu. Bahan kimia tersebut mungkin juga memiliki peranan sebagai antimikrobia didalam daun *Pinus*.

Ordo kedua yang paling banyak terisolasi dari penelitian ini adalah Xylariales, dengan 10 jenis jamur, yaitu *Nemania diffusa*, *Xylaria castorea*, *Anthostomella pinea*, *Biscogniauxia* sp, serta beberapa jenis yang hanya ditemukan satu isolat saja (*singleton*) yaitu *Rosellinia* sp, dua jenis *Hypoxylon* dan *Pestalotiopsis* sp.

Anthostomella pinea juga ditemukan pada daun jarum *Pinus* sp. di

Perancis yang memiliki kedekatan dengan jenis *Anthostomella* dan *Xylaria* sp. (Crous and Groenewald, 2010). Jamur *N. diffusa* dilaporkan sebagai penyebab penyakit layu pada tanaman teh di Sri Lanka (Balasuriya and Adikaram, 2009). Jenis *Biscogniauxia* sp. yang terisolasi pada penelitian ini memiliki kedekatan dengan jenis yang ditemukan di hutan *Nothofagus* di Selandia Baru (Johnston et al., 2011). Jenis ini juga ditemukan pada tanaman *P. tabulaeformis* (Guo et al., 2003) dan *Abies alba* (Kowalski and Drozynska, 2011). Sedangkan kelompok Xylariaceae spp. banyak terisolasi dari daun jarum *P. radiata* di Selandia Baru dan memiliki korelasi positif dengan ketahanan tanaman terhadap penyakit *Cyclaneusma needle cast* (Ganley, 2008).

Beberapa jenis Xylariales juga dilaporkan memiliki hubungan dengan ketahanan tanaman terhadap penyakit misalnya pada *P. monticola* (Larkin and Hunt, 2010) dan pada *A. alba* (Kowalski and Drozynska, 2011). Namun beberapa penelitian lain juga menemukan kelompok ini sebagai pathogen misalnya *Hypoxylon atropunctatum* menyebabkan penyakit kanker pada pohon oak (Desprez-Loustau et al., 2006), *H. mammatum* pada tanaman poplar (Enebak et al., 1997), dan *Xylaria mali* serta *X. polymorpha* yang menyebabkan busuk akar pada pohon apel dan cheri (Hartman et al., 2008). Peranan

jamur sebagai antimikrobia mungkin disebabkan dipicunya produksi senyawa sekunder seperti *hypoxylonol*, *xylarenol*, *hexadienoic acid*, *xylarenoic acid*, *tetralone* dan *xylarenone* oleh jenis-jenis jamur tersebut (Rukachaisirikul et al., 2007). Beberapa penelitian telah membuktikan aktifitas bahan-bahan kimia tersebut yang secara signifikan menghambat pertumbuhan beberapa jenis jamur patogen (Davis, 2005; Jang et al., 2007).

Adapun jamur dari ordo Sordariales dan Hypocreales merupakan jenis yang jarang terisolasi dan masing-masing ordo hanya memiliki dua dan satu jenis jamur yang terisolasi pada penelitian ini, yaitu *Fimetariella rabenhorstii* dan *Lasiosphaeria* sp. (Sordariales) dan *Fusarium* sp. (Hypocreales) serta *Xylomelasma* sp. (ordo tidak diketahui). Jenis ini juga ditemukan pada tangkai daun *Populus nigra* dan jenis hibridnya (*P. x euramericana*) di Spanyol (Martín-García et al., 2012) serta pada tanaman *Aquilaria sinensis* (Tao et al., 2011a). Isolat jamur ini diketahui menghasilkan suatu senyawa baru dari golongan *sesquiterpene alcohol* yang disebut *frabenol* diduga memiliki peranan pada proses pembentukan gaharu didalam tanaman (Tao et al., 2011b).

Jenis jamur *Lasiosphaeria* sp. merupakan jenis yang hanya terisolasi dari pulau utama Australia (*mainland*) dan

tidak terisolasi dari daerah Tasmania, meskipun sampel daun yang diambil dari Tasmania jauh lebih banyak. Jenis ini memiliki kemiripan 99% dengan *L. ovina*, yang distribusinya tersebar mulai dari Eropa, Amerika Serikat, Filipina dan Selandia Baru pada kayu berbagai jenis pohon yang telah mati (Miller and Huhndorf, 2004). Jenis *Xylomelasma* sp. yang terdeteksi pada penelitian ini memiliki kesamaan sebesar 97% dengan species yang terisolasi dari daun jarum *Picea abies* yang ada di Chechnya. Penelitian mengenai jenis ini belum banyak dipublikasikan, namun jenis *Xylomelasma* telah terdeteksi dari tanaman *Salvia miltiorrhiza* (Lou et al., 2013) dan pada kayu lapuk dari berbagai jenis pohon termasuk *Alnus glutinosa* (Reblova, 2006).

Kelompok jamur Sordariomycetes teridentifikasi dari daun jarum *P. radiata* yang masih berwarna hijau, kuning maupun berwarna coklat. Perbandingan antara jenis jamur dengan kondisi sampel daun tidak dapat dibedakan pada penelitian ini, karena jumlah sampel yang digunakan tidak seragam. Daun tua yang telah berwarna coklat yang masih menempel pada pohon maupun daun tua yang telah jatuh di tanah lebih banyak diambil sebagai sampel, sehingga lebih banyak isolat jamur yang didapatkan dari daun-daun tersebut daripada daun yang masih segar dan berwarna hijau.

Terdapat beberapa jenis jamur Sordariomycetes yang terdeteksi pada penelitian ini memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen pengendali hayati terhadap penyakit SNC pada tanaman *P. radiata* di Tasmania, misalnya beberapa jenis yang tergolong pada Xylariaceae. Studi lebih lanjut dapat dilakukan untuk mengetahui peranan setiap jamur tersebut terhadap ketahanan penyakit, baik melalui uji biokontrol di persemaian atau lapangan maupun dengan mempelajari lebih lanjut distribusi jenis-jenis jamur endofit tersebut pada tanaman yang tahan terhadap penyakit. Distribusi jenis jamur *Lasiosphaeria* yang ada di Tasmania serta pengaruhnya terhadap penyakit SNC juga menarik untuk dipelajari lebih jauh, karena penyakit SNC tidak ditemukan pada tanaman *P. radiata* di pulau utama Australia.

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ada 16 jenis jamur endofit yang tergolong dalam kelas Sordariomycetes terisolasi dari daun jarum *Pinus radiata* di Australia. Jamur *Coniochaeta* sp. 1 merupakan jenis yang paling sering terisolasi baik dari wilayah Tasmania dan pulau utama Australia, sedangkan *Lasiosphaeria* sp. merupakan jenis yang hanya terisolasi dari pulau utama Australia. Jamur Xylariaceae memiliki

potensi untuk dipelajari lebih lanjut sebagai agen pengendali hayati penyakit pada tanaman *P. radiata* di Tasmania.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibiayai oleh Tasmanian Institute of Agriculture University of Tasmania. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Anna Smith, Alieta Eyles dan Ian Smith yang telah membantu dalam pengambilan sampel di lapangan dan kepada Morag Glen yang telah memberikan bimbingan teknis di laboratorium serta dalam analisa data.

DAFTAR PUSTAKA

- Arnold, A. E., Mejia, L. C., Kylo, D., Rojas, E. I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E. A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 15649-15654.
- Arnold, A. E., Henk, D. A., Eells, R. L., Lutzoni, F., & Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99, 185-206.
- Ayer, W. A., & Kawahara, N. (1995). Lecythophorin, a potent inhibitor of blue-stain fungi, from the hyphomycetous fungus *Lecythophora hoffmannii*. *Tetrahedron Letters*, 36, 7953-7956.
- Balasuriya, A., & Adikaram, N. K. B. (2009). Some spatial, temporal and spatio-temporal considerations of wood decay of tea (*Camellia sinensis*), caused by *Nemania diffusa* (syn. *Hypoxylon vestitum*). *Crop Protection*, 28, 273-279.
- Botella, L., Santamaria, O., & Diez, J. J. (2010). Fungi associated with the decline of *Pinus halepensis* in Spain. *Fungal Diversity*, 40, 1-11.
- Bradshaw, R. E. (2004). *Dothistroma* (red-band) needle blight of pines and the dothistromin toxin: a review. *Forest Pathology*, 34, 163-185.
- Bulman, L. S. (1993). *Cyclaneusma* needle-cast and *Dothistroma* needle blight in New Zealand pine plantations. *New Zealand Forestry*, 38, 21-24.
- Bulman, L. S., Gadgil, P. D., Kershaw, D. J., & Ray, J. W. (2004). Assessment and control of dothistroma needle-blight. *Forest Research Bulletin*, 229.
- Bulman, L. S., Dick, M. A., Ganley, R. J., McDougal, R. L., Schwelm, A., & Bradshaw, R. E. (2013). *Dothistroma* needle blight. In P. Gonthier, & G. Nicolotti (Eds.) *Infectious forest diseases*. CABI.
- Crous, P. W., & Groenewald, J. Z. (2010). Fungal Planet 53: *Anthostomella pinea*. *Persoonia*, 25, 126-127.
- Damm, U., Fourie, P. H., & Crous, P. W. (2010). *Coniochaeta* (Lecythophora), *Collophora* gen. nov and *Phaeomoniella* species associated with wood necroses of *Prunus* trees. *Persoonia*, 24, 60-80.
- Davis, R. A. (2005). Isolation and structure elucidation of the new fungal metabolite (-)-xylariamide A. *Journal of Natural Products*, 68, 769-772.
- Desprez-Loustau, M. L., Marçais, B., Nageleisen, L. M., Piou, D., & Vannini, A. (2006). Interactive effects of drought and pathogens in forest trees. *Annals of Forest Science*, 63, 597-612.
- Enebak, S. A., Bucciarelli, B., Ostry, M. E., & Li, B. (1997). Histological analyses of the host response of two aspen genotypes to wounding and inoculation with *Hypoxylon mammatum*. *European Journal of Forest Pathology*, 27, 337-345.
- Felsenstein, J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5, 164-166.
- Ganley, R. J. (2008). Density and diversity of fungal endophytes isolated from needles of *Pinus radiata*. *Client Report No 12925*. Rotorua: SCION.
- Ganley, R. J., Snieszko, R. A., & Newcombe, G. (2008). Endophyte-mediated resistance against white pine blister rust in *Pinus monticola*. *Forest Ecology and Management*, 255, 2751-2760.

- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for Basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rust. *Molecular Ecology*, 2, 113-118.
- Gavran, M. (2012). Australian plantation statistics 2012 update. *ABARES technical report*. Canberra: Australian Bureau of Agricultural and Resource Economics and Sciences (ABARES).
- Glen, M., I. C. Tommerup, Bougher, N. L., & O'Brien, P. A. (2002). Are Sebacinaceae common and widespread ectomycorrhizal associates of Eucalyptus species in Australian forests? . *Mycorrhiza*, 12, 243-247.
- Guo, L. D., Huang, G. R., Wang, Y., He, W. H., Zheng, W. H., Hyde, K. D., Guo, L. D., & Wang, Y. (2003). Molecular identification of white morphotype strains of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis*. *Mycological Research*, 107, 680-688.
- Hacioglu, N., Akata, I., & Dulger, B. (2011). Antimicrobial potential of *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 728-730.
- Hartman, J., Beale, J., & Bachi, P. (2008). Root and Collar Rots of Tree Fruits. *Plant Pathology Fact Sheet*. Kentucky: University of Kentucky.
- Hood, I. A., & Vanner, A. L. (1984). *Cyclaneusma* (*Naemacyclus*) needle-cast of *Pinus radiata* in New Zealand. 4: Chemical control research. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 14, 215-222.
- Jang, Y. W., Lee, I. K., Kim, Y. S., Lee, S., Lee, H. J., Yu, S. H., & Yun, B. S. (2007). Xylarinic acids A and B, new antifungal polypropionates from the fruiting body of *Xylaria polymorpha*. *Journal of Antibiotics*, 60, 696-699.
- Johnston, P. R., Park, D., Johansen, R. B., Williams, A. F. R., & Wilkie, P. (2011). Patterns of fungal diversity in New Zealand *Nothofagus* forests. Auckland: Landcare Research New Zealand.
- Kowalski, T., & Drozyska, K. (2011). Mycobiota in needles and shoots of *Pinus nigra* following Infection by *Dothistroma septosporum*. *Phyton-Annales Rei Botanicae*, 51, 277-287.
- Larkin, B., & Hunt, L. (2010). Western white pine endophyte isolate collection, order: xylariales and allies (potential blister rust inhibitors). *MPG Operations*. Montana: MPG Ranch.
- Lee, I.-K., Jang, Y.-W., Kim, Y.-S., Yu, S. H., Lee, K. J., Park, S.-M., Oh, B.-T., Chae, J.-C., & Yun, B.-S. (2009). Xylarinols A and B, two new 2-benzoxepin derivatives from the fruiting bodies of *Xylaria polymorpha*. *J Antibiot*, 62, 163-165.
- Lou, J., Fu, L., Luo, R., Wang, X., Luo, H., & Zhou, L. (2013). Endophytic fungi from medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge and their antimicrobial activity. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 5343-5349.
- Martín-García, J., Müller, M. M., & Diez, J. J. (2012). ITS-based comparison of endophytic mycota in twigs of native *Populus nigra* and cultivated *P. X euramericana* (cv. I-214) stands in Northern Spain. *Annals of Forest Science*, 69, 49-57.
- Mead, D. J. (2013). Sustainable management of *Pinus radiata* plantations. *FAO Forestry Paper*. Rome: FAO.
- Merrill, W., & Wenner, N. G. (1996). *Cyclaneusma* needlecast and needle retention in Scots pine. *Plant Disease*, 80, 294-298.
- Miller, A. N., & Huhndorf, S. M. (2004). Using phylogenetic species recognition to delimit species boundaries within *Lasiosphaeria*. *Mycologia*, 96, 1106-1127.
- NZFOA. (2012). New Zealand Forest Industry Facts and Figures 2011/2012. In Association, N. Z. F. O. (Ed.). Wellington.
- Peršoh, D., Melcher, M., Flessa, F., & Rambold, G. (2010). First fungal community analyses of endophytic ascomycetes associated with *Viscum album* ssp. *austriacum* and its host *Pinus sylvestris*. *Fungal Biology*, 114, 585-596.
- Petrini, O., & Fisher, P. J. (1988). A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *Fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society*, 91, 233-238.
- Podger, F. D., & Wardlaw, T. J. (1990a). Spring needle-cast of *Pinus radiata* in Tasmania:II. Effects of fertilisers and thinning on disease severity. and the impact of disease on growth. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 20, 206-219.
- Podger, F. D., & Wardlaw, T. J. (1990b). Spring needle-cast of *Pinus radiata* in Tasmania:

- I. Symptoms, distribution, and association with *Cyclaneusma minus*. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 20, 184-205.
- Prihartini, I. (2014). Identifikasi jamur endofit daun jarum *Pinus radiata* menggunakan metode ekstraksi DNA secara langsung *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 8, 30-42.
- Qadri, M., Rajput, R., Abdin, M. Z., Vishwakarma, R. A., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2014). Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the Himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial Ecology*, 67, 877-887.
- Raberg, U., Brischke, C., Rapp, A. O., Högberg, N. O. S., & Land, C. J. (2007). External and internal fungal flora of pine sapwood (*Pinus sylvestris* L.) specimens in above-ground field tests at six different sites in south-west Germany. *Holzforschung*, 61, 104-111.
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20.
- Reblova, M. (2006). Molecular systematics of *Ceratostomella* sensu lato and morphologically similar fungi. *Mycologia*, 98, 68-93.
- Rosa, L. H., Queiroz, S. C. N., Moraes, R. M., Wang, X. N., Tehen, N., Pan, Z. Q., Cantrell, C. L., & Wedge, D. E. (2013). *Coniochaeta ligniaria*: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant *Smilax sonchifolius* (Asteraceae). *Symbiosis*, 60, 133-142.
- Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Rungjindamai, N., & Sakayaroj, J. (2007). Metabolites from the Xylariaceous Fungus PSU-A80. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 55, 1316-1318.
- Stalpers, J. A. (1978). Identification of wood inhabiting Aphylliphorales in pure culture. *Studies in Mycology*, 16.
- Tao, M. H., Li, D. L., Zhang, W. M., Tan, J. W., & Wei, X. Y. (2011a). Study on the chemical constituents of endophytic fungus *Fimetariella rabenhorstii* isolated from *Aquilaria sinensis*. *Journal of Chinese medicinal materials*, 34, 221-223.
- Tao, M. H., Yan, J., Wei, X. Y., Li, D. L., Zhang, W. M., & Tan, J. W. (2011b). A novel sesquiterpene alcohol from *Fimetariella rabenhorstii*, an endophytic fungus of *Aquilaria sinensis*. *Natural product communications*, 6, 763-766.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acid. Res.*, 22, 4673-4680.
- Vanner, A. L. (1986). An aerial spray trial to control *Cyclaneusma* needle-cast on radiata pine. Wellington: New Zealand Forest Service.
- Wardlaw, T. (2008). A review of the outcomes of a decade of forest health surveillance of state forests in Tasmania. *Australian Forestry*, 71, 254-260.
- Watt, M. S., Ganley, R. J., Kriticos, D. J., & Manning, L. K. (2011). *Dothistroma* needle blight and pitch canker: the current and future potential distribution of two important diseases of *Pinus* species. *Canadian Journal of Forest Research*, 41, 412-424.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. Academic Press Inc.

