

## **Deteksi Cepat *Fusarium* sp. pada Benih Kedelai Menggunakan Metode Spektroskopi Fluoresens**

### **Rapid Detection Method for *Fusarium* sp. on Soybean Seed Using Fluorescence Spectroscopy Method**

**Djoko Pujiarto, Bonny Poernomo Wahyu Soekarno\*, Akhiruddin Maddu**  
Institut Pertanian Bogor, Bogor 16680

#### **ABSTRAK**

Patogen terbawa benih kedelai dapat menjadi sumber penyakit tanaman di lapangan. Salah satu langkah untuk mencegah risiko akibat patogen terbawa benih ialah melalui uji kesehatan benih. Salah satu potensi teknologi yang dapat dikembangkan ialah menggunakan metode deteksi spektroskopi fluoresens. Penelitian ini bertujuan mengembangkan protokol deteksi cepat cendawan patogen terbawa benih menggunakan spektroskopi fluoresens. Hasil penelitian menunjukkan bahwa metode ini dapat mendeteksi emisi fluoresens metabolit *Fusarium* sp. yang diinkubasi selama 24 jam. Metabolit *Fusarium* sp. menghasilkan fluoresens cyan pada puncak panjang gelombang emisi 504 nm ketika dipapari sinar laser violet (405 nm). *Fusarium* sp. mempunyai spektrum emisi fluoresens yang berbeda dengan spektrum emisi fluoresens medium dekstroza kentang cair (502 nm). Dengan demikian metode spektroskopi fluoresens dapat digunakan sebagai metode deteksi cepat cendawan patogen terbawa benih.

Kata kunci: emisi fluoresens, patogen terbawa benih, sinar laser violet, uji kesehatan benih

#### **ABSTRACT**

Seed borne pathogens play an important role as source of inoculum for disease in the field. Seed health testing is applied in order to prevent risks caused by seed borne pathogen. Fluorescence spectroscopy is a potential technology to be used as detection method for seed borne pathogen. Research was conducted to develop rapid detection protocol for seed borne pathogenic fungus by fluorescence spectroscopy method. The result showed that fluorescence spectroscopy could detect fluorescence emission of metabolite of *Fusarium* sp. after soybean seeds were incubated for 24 hr. Metabolite of *Fusarium* sp. produced cyan fluorescent at peak wavelength emission 504 nm when excited to violet light (405 nm). *Fusarium* sp. displayed typical fluorescence emission spectra which differ from fluorescence emission spectra of growth medium potato dextrose broth (PDB) (502 nm). It was evidenced that fluorescence spectroscopy method can be used to detect pathogenic seed borne fungi.

Key word: fluorescence emission, seed borne pathogen, seed health testing, violet light

---

\*Alamat penulis korespondensi: Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Jalan Kamper, Kampus Darmaga IPB, Bogor 16680.  
Tel : 0251-8629364, Faks : 0251-8629362; surel : bonnypws@gmail.com

## PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max*) merupakan komoditas pokok dan sumber protein nabati di Indonesia. Kebutuhan nasional kedelai mencapai 2.5 juta ton per tahun, namun hanya 30% kebutuhan dapat dipenuhi oleh produksi dalam negeri (BPS 2016). Penurunan produktivitas kedelai disebabkan beberapa faktor, salah satunya cendawan *Fusarium* sp. sebagai patogen terbawa benih. Infeksi *Fusarium* sp. dapat terjadi pada saat panen, penyimpanan, dan pemasaran dengan tingkat infeksi berturut-turut mencapai 22.5–27.5%, 34–50%, dan 28–29% (Ramesh *et al.* 2013). Cendawan *Fusarium* yang sering ditemukan pada benih kedelai ialah *F. oxysporum*, *F. semitectum* dan *F. sporotrichioides* (Levic *et al.* 2012).

Pengujian kesehatan benih perlu dilakukan untuk mencegah dan mengurangi patogen terbawa benih. Metode spektroskopi fluoresens mempunyai keunggulan untuk dikembangkan sebagai metode cepat deteksi dan identifikasi cendawan terbawa benih. Metode ini bekerja berdasarkan pada pancaran emisi fluoresens dari senyawa metabolit yang dihasilkan oleh cendawan setelah terpapar oleh panjang gelombang tertentu. Emisi yang dipancarkan oleh setiap metabolit biasanya bersifat spesifik. De Champrode *et al.* (2007) menyatakan bahwa uji menggunakan fluoresens merupakan metode yang murah, selektif, sensitif, dan akurat. Penelitian ini bertujuan mengembangkan protokol deteksi cepat cendawan *Fusarium* sp. sebagai patogen terbawa benih menggunakan metode spektroskopi fluoresens.

## BAHAN DAN METODE

### Uji Kesehatan Benih

Benih kedelai yang digunakan ialah benih kedelai varietas Grobogan yang diperoleh dari Unit Pengelola Benih Sumber, Balai Penelitian Aneka Kacang dan Umbi, Kabupaten Malang, Provinsi Jawa Timur. Benih tersebut berasal dari sentra benih kedelai di Jawa Timur dan sudah melalui proses sortasi dan sertifikasi

sehingga memenuhi syarat untuk digunakan sebagai benih.

Pengujian dilakukan mengikuti metode kertas bloter Mathur dan Kongsdal (2003). Benih disterilkan permukaannya menggunakan NaOCl 1% selama 1 menit, dibilas air steril 3 kali dan dikeringanginkan. Sebagai kontrol digunakan benih yang tidak disterilkan. Sebanyak 200 benih (25 benih per cawan) diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam dengan penyinaran lampu sinar ultraviolet (NUV) 12 jam terang dan 12 jam gelap. Inkubasi dilanjutkan pada ruang dengan suhu -20 °C selama 24 jam tanpa sinar NUV. Benih diinkubasi kembali pada suhu ruang dengan penyinaran NUV 12 jam terang dan 12 jam gelap sampai hari ke-7. Pengamatan dilakukan terhadap persentase infeksi dengan rumus:

$$\text{Tingkat infeksi} = \frac{\sum \text{benih terinfeksi}}{\sum \text{benih inkubasi}} \times 100\%$$

Cendawan dengan tingkat infeksi tertinggi diisolasi dan dimurnikan pada medium agar-agar dekstrosa kentang (ADK) dan diinkubasi selama 5–7 hari pada suhu ruang. Cendawan ini digunakan untuk uji lanjut sebagai cendawan target. Cendawan diidentifikasi berdasarkan karakter koloni dan morfologi cendawan mengikuti kunci identifikasi Watanabe (2002).

### Pengukuran Panjang Gelombang Metabolit Emisi Cendawan Target

Produksi metabolit cendawan diukur mengikuti metode Margino (2008) yang dimodifikasi waktu inkubasinya (7 hari menjadi 15 hari). Sebanyak 2 target potongan isolat cendawan yang mempunyai tingkat infeksi tertinggi dimasukkan ke dalam 100 mL medium larutan dekstrosa kentang (LDK), kemudian diinkubasi selama 15 hari pada suhu ruang sambil digoyang dengan kecepatan 120 rpm. Suspensi medium disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Supernatan metabolit cendawan target yang diperoleh disaring 2 kali, pertama menggunakan filter sempit (*syringe filter*) berukuran 0.45 µm dan penyaringan kedua yang berukuran 0.2 µm.

### Kalibrasi Spektroskopi Fluoresens Metabolit Cendawan Target sebagai Metabolit Standar

Metabolit *Fusarium* sp. yang dihasilkan diencerkan berseri pada konsentrasi  $10^{-1}$  sampai  $10^{-10}$ . Masing-masing metabolit standar hasil pengenceran diukur panjang gelombang emisinya menggunakan spektrofлуorometer (Prasetya 2008).

### Aplikasi Spektroskopi Fluoresens untuk Deteksi *Fusarium* sp. pada Benih dengan Inokulasi Buatan

Suspensi massa konidium *Fusarium* sp. dengan kepadatan  $10^8$  sel  $\text{mL}^{-1}$  diperoleh dari isolat *Fusarium* sp. yang diinkubasi selama 7 hari pada medium ADK. Biakan *Fusarium* sp. dihomogenkan dengan air steril sebanyak 50 mL. Kepadatan konidium *Fusarium* sp. dihitung menggunakan hemositometer. Suspensi massa konidium *Fusarium* sp. digunakan untuk inokulasi pada benih kedelai dengan cara perendaman.

Benih kedelai direndam di dalam NaOCl 1% selama 1 menit dan dibilas 3 kali menggunakan air steril selama 1 menit. Inokulasi *Fusarium* sp. dilakukan dengan perendaman benih kedelai dalam suspensi massa konidium *Fusarium* sp dengan kerapatan  $10^8$  sel  $\text{mL}^{-1}$  selama 0, 5, 10, 15 dan 20 menit, kemudian dikeringanginkan sampai kadar airnya mencapai 10%. Benih kedelai dieksitasi dengan sinar laser violet (405 nm) untuk menentukan pendaran emisi cahaya dari metabolit cendawan. Panjang gelombang emisi fluoresens metabolit *Fusarium* sp. pada benih kedelai diukur menggunakan spektrofлуorometer USB 4000-FL.

### Aplikasi Spektroskopi Fluoresens untuk Deteksi *Fusarium* sp. pada Benih Tanpa Inokulasi Buatan

Benih kedelai dimasukkan ke dalam 10 mL medium LDK pada konsentrasi 0%, 25%, 50%, dan 100%; lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang sambil digoyang dengan kecepatan 120 rpm. Suspensi medium disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit untuk mendapatkan

supernatan metabolit cendawan target. Supernatan disaring 2 kali menggunakan *syringe filter* berturut-turut dengan ukuran 0.45  $\mu\text{m}$  dan 0.2  $\mu\text{m}$ . Sebanyak 1 mL metabolit yang dihasilkan digunakan untuk pengukuran dalam spektrofлуorometer USB 400-FL pada panjang gelombang eksitasi 405 nm.

## HASIL

### Kesehatan Benih Kedelai

Uji kesehatan benih kedelai varietas Grobogan menghasilkan 7 jenis cendawan dengan tingkat infeksi berbeda. Infeksi paling tinggi ialah *Fusarium* sp. (Tabel 1). Selanjutnya *Fusarium* sp. digunakan sebagai cendawan model untuk uji lanjut.

### Panjang Gelombang Emisi Metabolit *Fusarium* sp.

Metabolit *Fusarium* sp. pada medium LDK menghasilkan panjang gelombang emisi 504 nm (Gambar 1) dan memiliki spektrum warna *cyan*, sedangkan medium LDK kontrol menghasilkan emisi pendar hijau (*green fluorescence*) pada panjang gelombang emisi 502 nm (Gambar 2).

Pengenceran berseri metabolit *Fusarium* sp. dilakukan untuk mengetahui panjang gelombang emisi fluoresens pada batas minimum konsentrasi metabolit. Panjang gelombang metabolit pada pengenceran berseri  $10^{-1}$ – $10^{-6}$  menghasilkan panjang gelombang emisi 504 nm; sedangkan pada pengenceran  $10^{-7}$ – $10^{-10}$  menghasilkan panjang gelombang emisi 476–502 nm (Gambar 3). Tidak semua konsentrasi metabolit yang

Tabel 1 Tingkat infeksi beberapa cendawan pada benih kedelai varietas Grobogan.

Jenis Cendawan	Tingkat infeksi (%)
<i>Fusarium</i> sp.	49
<i>Aspergillus niger</i>	36
<i>Aspergillus flavus</i>	28
<i>Rhizopus</i> sp.	16
<i>Trichoderma</i> sp.	10
<i>Curvularia</i> sp.	3
<i>Penicillium</i> sp.	3

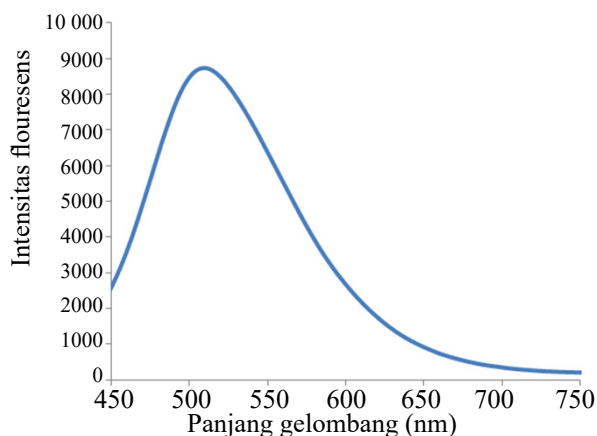
diencerkan mempunyai panjang gelombang emisi yang sama dengan metabolit *Fusarium* sp. dibandingkan dengan sebelum dilakukan pengenceran (504 nm).

Panjang gelombang emisi metabolit *Fusarium* sp. pada benih kedelai yang diinokulasi buatan dengan perendaman menggunakan suspensi massa konidium *Fusarium* sp. selama 15 menit dan 20 menit menghasilkan panjang gelombang emisi sebesar 504 nm. Begitu pula pada benih kedelai tanpa inokulasi buatan yang diinkubasi pada medium LDK selama 24 jam hasilnya sama (Gambar 4). Panjang gelombang emisi metabolit *Fusarium* sp. pada benih kedelai yang diinokulasi buatan, benih kedelai tanpa inokulasi buatan, dan metabolit *Fusarium* sp. yang belum diencerkan atau telah diencerkan sebagai dasar kalibrasi menunjukkan panjang gelombang emisi yang sama dan konsisten.

**PEMBAHASAN**

Cendawan yang paling dominan menginfeksi benih kedelai varietas Grobogan ialah *Fusarium* sp. dengan tingkat infeksi 49%. *Fusarium* sp. dapat menyebabkan penyakit rebah semai yang dicirikan kedelai akan membusuk sebelum muncul di tanah atau pangkal dan batang yang muncul di permukaan tanah akan membusuk sehingga tanaman akan rebah.

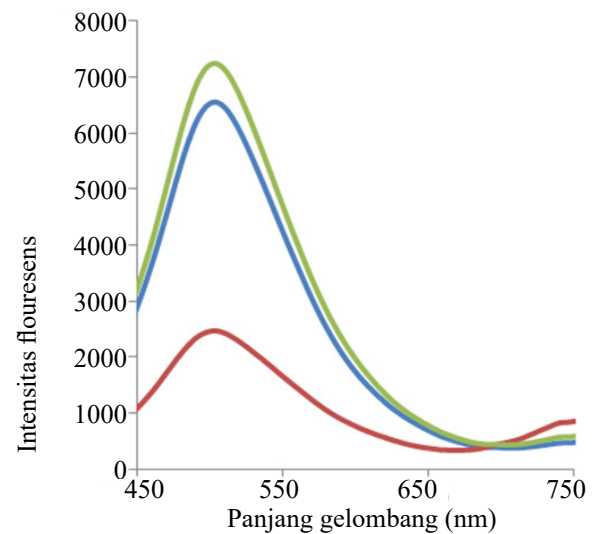
Intensitas fluoresens adalah jumlah foton yang diemisikan per unit waktu (s) per unit



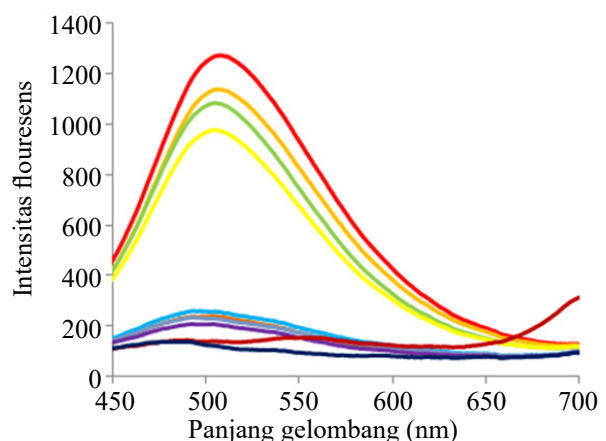
Gambar 1 Spektrum emisi fluoresens metabolit yang dihasilkan *Fusarium* sp.

volume larutan (L) yang dinyatakan dalam mol atau ekuivalensinya dalam Einstein, jika 1 Einstein itu sama dengan 1 foton mol. Deteksi dan identifikasi metabolit *Fusarium* sp. menggunakan medium LDK menghasilkan intensitas fluoresens yang bervariasi, yaitu antara 2000 dan 28 000 mol.

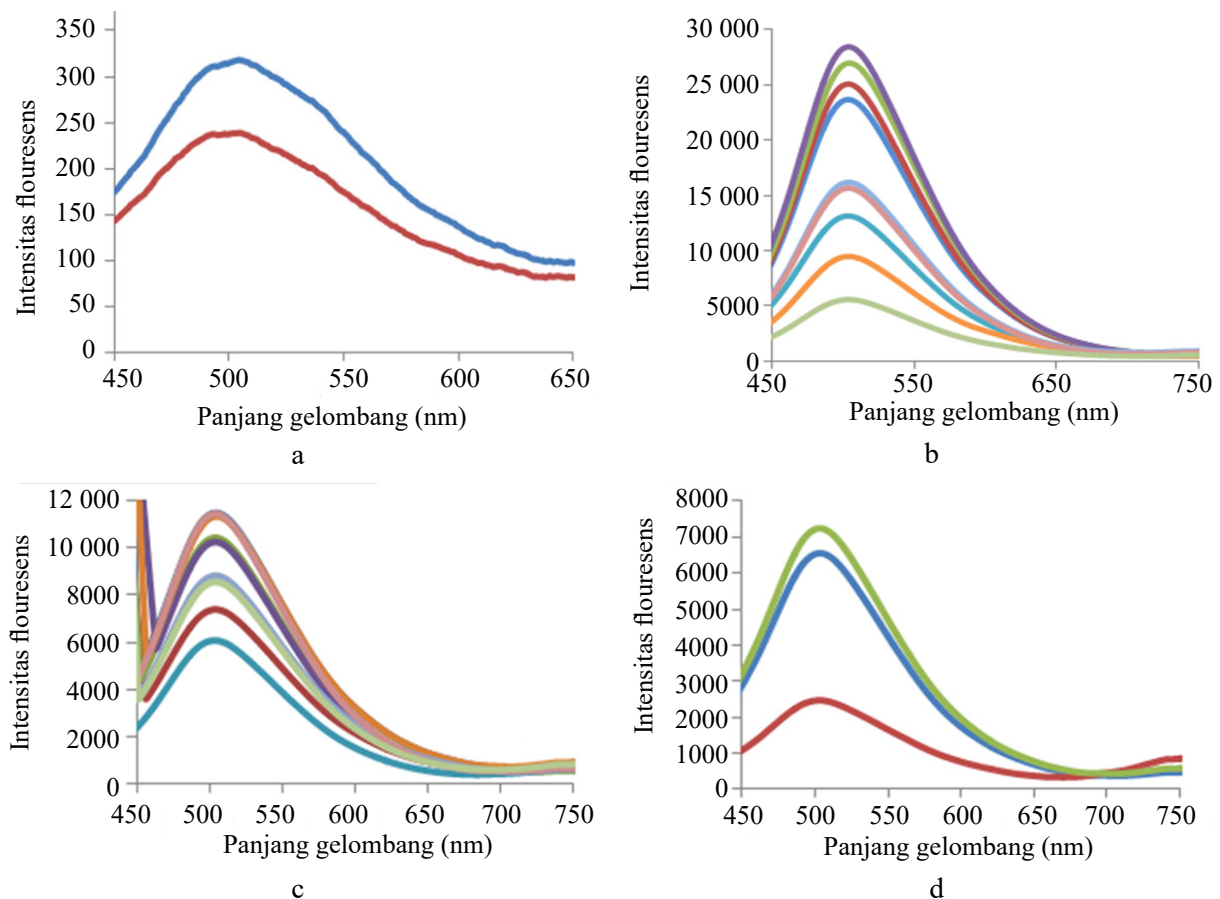
Intensitas fluoresens yang terukur pada saat pengukuran panjang gelombang emisi metabolit *Fusarium* sp. memberikan gambaran



Gambar 2 Spektrum emisi fluoresens medium larutan dekstrosa kentang pada konsentrasi 25% (—), 50% (—), dan 100% (—).



Gambar 3 Spektrum emisi fluoresens metabolit *Fusarium* sp. hasil beberapa pengenceran berseri menghasilkan panjang gelombang 504 nm (—, 10<sup>-1</sup>; —, 10<sup>-2</sup>; —, 10<sup>-3</sup>; —, 10<sup>-4</sup>; —, 10<sup>-5</sup>; —, 10<sup>-6</sup>) dan panjang gelombang 476 – 502 nm (—, 10<sup>-7</sup>; —, 10<sup>-8</sup>; —, 10<sup>-9</sup>; —, 10<sup>-10</sup>).



Gambar 4 Spektrum emisi fluoresens pada benih kedelai. a, Benih direndam dalam suspensi *Fusarium* sp. selama 15 menit (—) dan 20 menit (—); b, benih direndam dalam LDK konsentrasi 100% (— sampel 2), (— sampel 4), (— sampel 5), (— sampel 6), (— sampel 7), (— sampel 8), (— sampel 10), (— sampel 15), (— sampel 16); c, Benih direndam dalam LDK konsentrasi 50% ( sampel 5), ( sampel 6), ( sampel 8), ( sampel 10), ( sampel 11), ( sampel 14), ( sampel 15), ( sampel 16), ( sampel 18); d, Benih direndam dalam LDK konsentrasi 25% (— sampel 5), (— sampel 13), (— sampel 19) selama 24 jam.

bahwa metabolit yang telah mengalami pengenceran mengalami penurunan intensitas fluoresens. Semakin sedikit kandungan metabolit maka semakin rendah intensitas fluoresens, tetapi panjang gelombang emisi fluoresens tetap konsisten. Intensitas fluoresens semakin kecil jika suatu molekul mengandung gas oksigen. Ini terjadi karena adanya proses oksidasi yang disebabkan oleh pengaruh cahaya (*fotokemically induced oxidation*). Pengurangan intensitas fluoresens disebut pemadaman sendiri (*quenching*). Fluoresens pada molekul dipengaruhi oleh beberapa kondisi fisik, antara lain polaritas, potensial listrik, suhu, tekanan, derajat keasaman (pH), jenis ikatan hidrogen, viskositas, dan *quencher* (penghambat de-eksitasi) (Bass 2000).

Deteksi dan identifikasi cendawan terbawa benih kedelai dengan metode spektroskopi fluoresens dilakukan dengan mengukur panjang gelombang emisi metabolit yang dihasilkan cendawan. Setiap metabolit yang dihasilkan cendawan terbawa benih dapat diukur panjang gelombang emisinya sampai pada panjang gelombang emisi pada titrasi dengan konsentrasi tertentu. Panjang gelombang emisi metabolit *Fusarium* sp. yang telah dititrasi masih terdeteksi pada titrasi ke- $10^{-6}$ . *Aspergillus niger* dan *F. solani* dapat terdeteksi dengan menggunakan spektroskopi fluoresens pada panjang gelombang emisi 424 nm dan 505 nm (Prasetya 2008, De Araujo *et al.* 2010). Senyawa yang dihasilkan oleh *Fusarium* spp.

ialah toksin T-2, *diacetoxyscirpenol*, solaniol, *cyclosporine A*, pigmen tipe naftaquinon, *fusalanipirone*, asam fusarat, moniliformin, dan beberapa racun kimia yang belum teridentifikasi (Ishii *et al.* 1971; Medentsev dan Akimenko 1998; Leslie dan Summerell 2006). *Fusarium* juga menghasilkan senyawa golongan naftaquinon yang berfungsi sebagai racun tanaman, insektisida, antibakteri, dan fungisida. *Javanicin* merupakan salah satu contoh senyawa golongan naftaquinon yang mempunyai panjang gelombang emisi 504 nm (Medentsev dan Akimenko 1998).

Inkubasi *Fusarium* sp. pada medium LDK menghasilkan metabolit cendawan unik yang dapat diukur panjang gelombang emisi fluoresensnya. Aplikasi metode spektroskopi fluoresens dengan medium tumbuh LDK untuk mendeteksi keberadaan *Fusarium* sp. pada benih kedelai menghasilkan emisi fluoresens cyan pada panjang gelombang emisi 504 nm. Intensitas fluoresens yang terukur dipengaruhi oleh konsentrasi metabolit yang dihasilkan oleh cendawan terbawa benih. Metode spektroskopi fluoresens dapat digunakan sebagai metode deteksi yang spesifik, cepat, dan sederhana untuk mendeteksi keberadaan *Fusarium* sp. dengan mengukur panjang gelombang emisi fluoresens metabolit yang dihasilkan oleh cendawan pada inkubasi benih kedelai di medium LDK selama 24 jam.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Badan Karantina Pertanian, Kementerian Pertanian atas dukungan dana dan fasilitas penelitian.

### DAFTAR PUSTAKA

- Bass D. 2000. An introduction to fluorescence spectroscopy. <http://homepages.wmich.edu/rsung/files/introflour.pdf> [diakses 8 Mar 2016].
- [BPS] Badan Pusat Statistik. 2016. Produksi padi tahun 2015 naik 6.37 persen. *Berita Resmi Statistik*. Jakarta (ID): BPS.
- De Champrode M, Bazzicalupo P, De Napoli L, Montesarchio D, Di Fabio G. 2007. A new competitive fluorescence assay for the detection of patulin toxin. *Anal Chem.* 79(2):751–757. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac0618526>.
- De Araujo RE, Diego J, Rativa DJ, Rodrigues MAB, Marsden A, Filho LGS. 2010. Optical spectroscopy on fungal diagnosis. Di dalam: Domenico Campolo, Editor. *New Developments in Biomedical Engineering*. Rijeka (HR): InTech. Hlm 447-454. <http://www.intechopen.com/books/newdevelopments-in-biomedical-engineering/optical-spectroscopy-on-fungal-diagnosis> [diakses 4 Sep 2016].
- Ishii K, Sakai K, Ueno Y, Tsunoda H, Enomoto M. 1971. Solaniol, a toxic metabolite of *Fusarium solani*. *Appl Microbiol.* 22(4):718–720.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *Fusarium Laboratory Manual*. Iowa (US): Blackwell. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470278376>.
- Levic J, Stankovic S, Krnjaja V, Bocarov-Stancic A, Ivanovic D. 2012. Distribution frequency and incidence of seed-borne pathogens of some cereals and industrial crops in Serbia. *Pestic Phytomed.* 27(1):33–40. DOI: <https://doi.org/10.2298/PIF1201033L>.
- Margino S. 2008. Produksi metabolit sekunder (antibiotik) oleh isolat jamur endofit Indonesia. *Majalah Farmasi Indonesia.* 19(2):86–94.
- Mathur SB, Kongsdal O. 2003. *Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi*. Bassedorf (CH): International Seed Testing Association.
- Medentsev AG, Akimenko VK. 1998. Naphthoquinone metabolite of the fungi. *Pytochemistry.* 47(6):935–959. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)80053-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)80053-8).
- Prasetya A. 2008. Pengembangan metode deteksi cepat *Aspergillus flavus* Link. dan *Fusarium* sp. pada benih padi menggunakan laser-induced fluorescence [tesis]. Bogor (ID): Institut Pertanian Bogor.

- Ramesh BV, Hiremath V, Naik K, Amaresh S, Lokesh K, Vasudevan N. 2013. Study of seed mycoflora of soybean from north eastern Karnataka. *Karnataka J Agric Sci.* 26(1):58–62.
- Watanabe T. 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species*. Ed Ke-2. Florida (US): CRC Press LLC.