

Isolasi dan Identifikasi Molekuler Jamur Patogen pada Sarang Penyu Lekang (*Lepidochelys Olivacea L.*) dari Tiga Pantai di Provinsi Bali

*Isolation and Molecular Identification of Fungal Pathogens in The Nests of Lekang Turtles (*Lepidochelys olivacea L.*) From Three Beaches in Bali Province*

¹Ni Luh Putu Wina Ewiantini, ²I Gede Widhiantara, ³I Wayan Rosiana, ⁴*Putu Angga Wiradana

^{1,2,3,4}Program Studi Biologi, Fakultas Kesehatan dan Sains, Universitas Dhyana Pura, Jl. Raya Padang Luwih, Dalung, Kuta Utara, Dalung, Kec. Kuta Utara, Kabupaten Badung, Bali 80351

^{*}Email: angga.wiradana@undhirabali

ABSTRAK

Pasir merupakan tempat dan media bertelur yang menjadi salah satu faktor keberhasilan penetasan telur penyu lekang. Penyebab potensial kegagalan penetasan telur penyu secara alami karena pertumbuhan mikroba patogen termasuk jamur yang terjadi saat pemindahan telur dari sarang alami ke sarang semi alami di tempat penangkaran. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik isolat jamur patogen yang diisolasi pada sarang Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea L.*) di tiga pantai berbeda di Provinsi Bali. ITS Gen Sequence 1 dan 4 berkerabat dengan spesies jamur yang berhasil diisolasi dari pasir sarang Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea L.*) yang gagal menetas menggunakan analisis pohon filogenetik. Hasil penelitian menunjukkan bahwa identifikasi makroskopis pada pasir sarang semi alami Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea L.*) yang gagal menetas dari tiga pantai berbeda di Provinsi Bali ditemukan jamur dengan permukaan koloni pada media PDA di cawan Petri berwarna kuning kecoklatan dan terdiri dari beberapa serat tipis dengan koloni berbentuk bulat atau semi bulat. Hasil elektroforesis produk PCR menunjukkan bahwa Kura-kura Lekang (*Lepidochelys olivacea L.*) teridentifikasi menggunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dan ditemukan pita pada 550 bp. Hasil sekuensing DNA pada BLAST di situs NCBI isolat jamur pada penelitian ini berkerabat dengan spesies *Aspergillus niger* dan *Fusarium solani*.

Kata Kunci: Penyu lekang, Jamur patogen, PCR, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*.

ABSTRACT

*Sand is a place and medium for laying eggs which is one of the factors for the success of hatching olive ridley turtle eggs. Potential causes of failure of natural hatching of turtle eggs are due to the growth of pathogenic microbes including fungi that occur when eggs are transferred from natural nests to semi-natural nests in breeding areas. This study aims to determine the characteristics of pathogenic fungal isolates isolated from Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea L.*) nests on three different beaches in Bali Province. ITS Gen Sequence 1 and 4 are related to fungal species that were successfully isolated from the sand of Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea L.*) nests that failed to hatch using phylogenetic tree analysis. The results of the study showed that macroscopic identification of semi-natural Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea L.*) nest sand that failed to hatch from three different beaches in Bali Province found fungi with a colony surface on PDA media in a Petri dish that was brownish yellow and consisted of several thinfibers with round or semi-round colonies. The electrophoresis results of PCR products showed that the Olive Ridley Turtle (*Lepidochelys olivacea L.*) was identified using the PCR (*Polymerase Chain Reaction*) method and a band was found at 550 bp.*

The results of DNA sequencing on BLAST on the NCBI site of fungal isolates in this study were related to the species *Aspergillus niger* and *Fusarium solani*.

Keywords: Olive Ridley, Pathogenic fungi, PCR, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani*

PENDAHULUAN

Penyu merupakan salah satu hewan reptil yang dapat bermigrasi jarak jauh di sepanjang kawasan Samudera Hindia, Samudera Pasifik dan Asia Tenggara. Tujuan migrasi penyu adalah untuk kawin, mencari lokasi bertelur (*breeding ground*) maupun untuk mencari makan (Akira et al., 2012). Penyu lekang merupakan salah satu spesies penyu yang memiliki sebaran yang luas dan melimpah. Penyu ini memiliki morfologi tubuh yang lebih kecil dibandingkan dengan spesies lainnya, dengan berat antara 50 hingga 75 kg dan panjang 150 cm (Bahri et al., 2018; Cáceres-Farias et al., 2022).

Pasir merupakan tempat yang mutlak diperlukan untuk penyu bertelur. Semua jenis penyu, termasuk yang hidup di perairan Indonesia akan memilih daerah tempat bertelur yang khas. Pantai dengan fraksi pasir halus sampai kasar merupakan tempat ideal dari pertumbuhan mikroba yang dapat mempengaruhi proses penetasan telur penyu. Meskipun pori-pori penting untuk kelangsungan hidup embrio, tetapi juga berpotensi terinfeksi bakteri dan jamur karena mikroba dapat masuk melalui pori-pori dan mengkontaminasi telur tersebut (Al-Bahry et al., 2011).

Meninjau populasi penyu yang semakin berkurang setiap tahunnya, diperlukan kegiatan konservasi atau pelestarian melalui kegiatan monitoring. Keberadaan *Turtle Conservation and Education Center* (TCEC) berfungsi sebagai tempat konservasi penyu, tempat penetasan semi alami dari telur-telur penyu yang diambil dari sarang alaminya yaitu dipinggir pantai agar telur tersebut dapat menetas dengan selamat tanpa harus terganggu oleh predator ataupun manusia. TCEC juga dijadikan sebagai sarana pendidikan dan tempat wisata agar masyarakat lokal maupun turis asing dapat mengenal lebih dekat tentang penyu serta diharapkan timbulnya kesadaran untuk menjaga kelestarian penyu laut dari ancaman kepunahan.

Konservasi merupakan salah satu kegiatan yang diharapkan dapat mencegah

punahnya habitat penyu, mencegah adanya pemanfaatan penyu demi kepentingan komersial seperti penjualan telur, daging, maupun cangkang dan dapat menjadi sarana berbagi ilmu atau edukasi kepada masyarakat secara luas demi menjaga habitat penyu di Indonesia agar tidak punah (Ario et al., 2016). Upaya konservasi yang dilakukan untuk melindungi telur penyu dari ancaman atau predator habitat alami yaitu dilakukan pembuatan sarang semi alami.

Metode deteksi cepat berbasis molekuler telah lama dikembangkan untuk mengenali spesies yang akan diujikan pada skala lapang. Metode ini mengandalkan deteksi basa nukleat melalui teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Melalui PCR, DNA dari jamur pathogen yang berhasil diisolasi dari sarang semi alami akan diamplifikasi oleh primer spesifik dan akan divisualisasi. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) adalah metode bioteknologi yang digunakan untuk mengamplifikasi (menggandakan) sejumlah kecil fragmen DNA menjadi jumlah yang cukup besar untuk analisis lebih lanjut (Widowati, 2013). Hasil penelitian ini dapat menjadi rujukan dalam upaya memonitoring kesehatan telur penyu terutama dari kontaminasi mikroba pathogen seperti jamur oleh otoritas terkait

METODE PENELITIAN

Lokasi sampling

Sampel media pasir yang digunakan sebagai sarang penetasan telur penyu lekang dikumpulkan dari tiga lokasi berbeda yaitu Pantai Seminyak, Pantai Serangan dan Pantai Watu Klootok. Sampel pasir dari masing – masing pantai kemudian dimasukkan ke dalam plastic bag steril ukuran 10×10 cm dan disimpan dalam *cooler box* selama proses perjalanan. Kegiatan identifikasi jamur pathogen dilakukan selama 4 bulan meliputi tahap persiapan, sampling, isolasi jamur, karakterisasi, dan identifikasi molekuler.

Isolasi jamur patogen

Isolasi jamur dilakukan di Laboratorium Sains Dasar, Universitas Dhyana

Pura. Sampel pasir yang berisikan telur penyu lekang digunakan dalam penelitian ini untuk mengetahui keberadaan cemaran jamur yang berasal dari tiga pantai berbeda di Provinsi Bali yaitu Pantai Seminyak (Kabupaten Badung), Serangan (Kota Denpasar) dan Watu Klotok (Kabupaten Klungkung). Total sampel yang dikumpulkan adalah sebanyak 15 sampel (5 sampel pasir di setiap pantai) yang dikumpulkan dengan teknik random sampling untuk tiap pantai.

Isolasi jamur patogen dilakukan dengan metode pour plate dengan ditimbang sebanyak 10 g sampel pasir secara aseptis dan dimasukkan ke dalam 9 ml air steril, lalu dihomogenkan. Sampel kemudian dipipet sebanyak 1 ml menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah diisi 9 ml air steril, divortex dan memperoleh pengenceran 10^{-1} . Pengenceran dilakukan hingga mencapai faktor pengenceran 10^{-5} . Masing – masing faktor pengenceran (10^{-1} – 10^{-5} CFU/ml) kemudian dipipet sebanyak 250 μ l dan dimasukkan ke dalam cawan Petri steril, ditambahkan sekitar 15 ml media PDA, dihomogenkan hingga memadat, dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 7 hari.

Seleksi dan pemurnian isolat jamur

Seleksi jamur yang berhasil tumbuh pada cawan Petri selama 7 hari masa inkubasi ditentukan berdasarkan warna, bentuk, sebalik koloni, pinggiran koloni, tekstur, dan pusat dalam koloni. Koloni yang menunjukkan karakteristik berbeda di tiap faktor pengenceran dan pantai kemudian dimurnikan ke media PDA steril secara aseptis menggunakan jarum ose. Cawan Petri dilengkapi dengan label sesuai dengan nama spesimen dan lokasi pantai kemudian diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 30°C.

Identifikasi molekuler

Identifikasi molekuler dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana. Identifikasi molekuler dilakukan pada jamur patogen yang menunjukkan karakteristik berbeda pada tiap Pantai dengan tahapan sebagai berikut:

Ekstraksi DNA

Metode ekstraksi DNA pada penelitian ini mengikuti prosedur dari Jena *Bioscience*

Yeast DNA Preparation – Column Kit sebagai berikut Pertama, kultur cair diambil sebanyak 500 μ l, lalu dimasukkan ke dalam *microcentrifuge tube* 1,5 ml, disentrifugasi pada 8.000 g selama 1 menit. Selanjutnya, supernatant dibuang, ditambahkan *Resuspension buffer* sebanyak 100 μ l dan enzim lyticase sebanyak 1 μ l pada pellet. Dilanjutkan dengan divortex selama 10 detik kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Kemudian, disentrifugasi kembali dengan kekuatan 10.000g selama 1 menit, dibuang supernatant lalu ditambahkan *Lysis buffer* sebanyak 300 μ l dan RNase sebanyak 2 μ l pada pellet, vortex selama 10 detik. Ditambahkan Proteinase K sebanyak 8 μ l ke dalam lisat, dicampurkan menggunakan mikropipet lalu diinkubasi selama 10 menit pada suhu 60°C. Sampel kemudian didinginkan pada es selama 5 menit, dan divortex hingga homogen. Selanjutnya, disentrifugasi dengan kekuatan 10.000 g selama 5 menit. Dimasukkan *spin column* pada *collection tube* 2 ml, dimasukkan sebanyak 100 μ l *Activation buffer* ke dalam *spin column* dan disentrifugasi dengan kekuatan 10.000 g selama 1 menit. Kemudian, dipipet supernatant ke dalam *spin column* yang sudah disiapkan, sentrifugasi dengan kekuatan 10.000 g selama 1 menit, dan supernatant dibuang.

Dilanjutkan dengan mencuci DNA dengan *Washing buffer* sebanyak 500 μ l ke dalam *spin column*, disentrifugasi dengan kekuatan 10.000 g selama 30 detik, supernatant kembali dibuang. Diulangi sebanyak 2x selanjutnya, dipindahkan *spin column* ke *Elution tube* 1,5 ml, ditambahkan *Elution buffer* sebanyak 40 μ l ke dalam *spin column*, diinkubasi selama 1 menit, disentrifugasi dengan kekuatan 10.000 g selama 2 menit. Lalu, disimpan DNA pada suhu 4°C atau deep freezer sebelum digunakan.

Amplifikasi dengan gen sekuens ITS

Identifikasi molekuler isolat jamur dilakukan dengan amplifikasi PCR Konvensional. Proses amplifikasi menggunakan primer set *Internal Transcribed Spacer* (ITS) *Forward primer* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT GCGG-3') dan *Reverse primer* ITS4 (5' TCCTCCGCTTATT GATATGC 3') (Tamura *et al.*, 2021). Amplifikasi pada mesin PCR dari Mix PCR

menggunakan Taq DNA *polymerase*, H₂O, Primer *Forward* dan *Reverse*. Disiapkan PCR tube 0,2 ml. dan dimasukkan primer set ITS 1 dan ITS 4 masing-masing sebanyak 2 μ l, DNA

template sebanyak 2 μ l, Go Taq® Green Master Mix 2X sebanyak 12,5 μ l dan ddH₂O sebanyak 20 μ l. Pengaturan profil mesin PCR ditampilkan pada tabel dibawah ini:

Tabel 1. Profil Mesin PCR Konvensional yang digunakan untuk amplifikasi

Pre-denaturasi	Denaturasi	Annealing	Extention	Final extention
95 °C 1 kali siklus 2 menit	95 °C 30 kali siklus 30 detik	54 °C 30 kali siklus 1 menit	72 °C 30 kali siklus 1 menit	72 °C 1 kali siklus 5 menit

Elektroforesis

Elektroforesis dilakukan dengan mengambil 3 μ l hasil amplifikasi dari mesin PCR lalu *diloading* pada gel agarose 1,2%, pada tegangan 50 volt selama 60 menit. Sampel DNA jamur dan larutan *loading dye* kemudian dimasukkan kedalam lubang sumuran pada gel agarose dengan perbandingan (1:1) Gel agarose yang telah berisi buffer TAE kemudian diletakkan pada *chamber* elektroforesis, dengan posisi sumur pada muatan (-). Selanjutnya elektroda dihubungkan dengan *power supply* dan dinyalakan hingga 50 menit, pada voltase 220V. Kemudian, gel direndam dalam larutan *ethidium bromide* sebanyak 2 μ l/500 ml selama 10 menit, dan dilanjutkan direndam dalam H₂O selama 10 menit. Gel lalu dipindai dalam mesin *UV transilluminator* dan didokumentasikan menggunakan *Gel Doc*.

Sekuensing

Hasil PCR yang diperoleh kemudian disequensing menggunakan DNA *sequencer*. Sampel dikirim ke Makrogen Indonesia untuk dibaca urutan nukleotidanya kemudian hasil pembacaan dapat diunduh dalam bentuk file *Qual* dan *Seq*. Data hasil sekuensing yang didapat kemudian dikomparasi dengan data sekuen yang terdapat pada GenBank menggunakan metode bioinformatika *Basic Local Allignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) secara

online dengan membandingkan urutan sekuen DNA jamur yang tersedia pada database *Nucleotide National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Analisis tingkat kekerabatan tiap sampel jamur dikontruksi pohon filogenetik menggunakan program MEGA11

Analisis data

Data karakteristik jamur dan identifikasi molekuler pada penelitian ini diolah secara deskriptif dan ditampilkan dalam bentuk Grafik, Gambar, dan Tabel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Jamur yang Berhasil Diisolasi pada Pasir Sarang Semi Alami

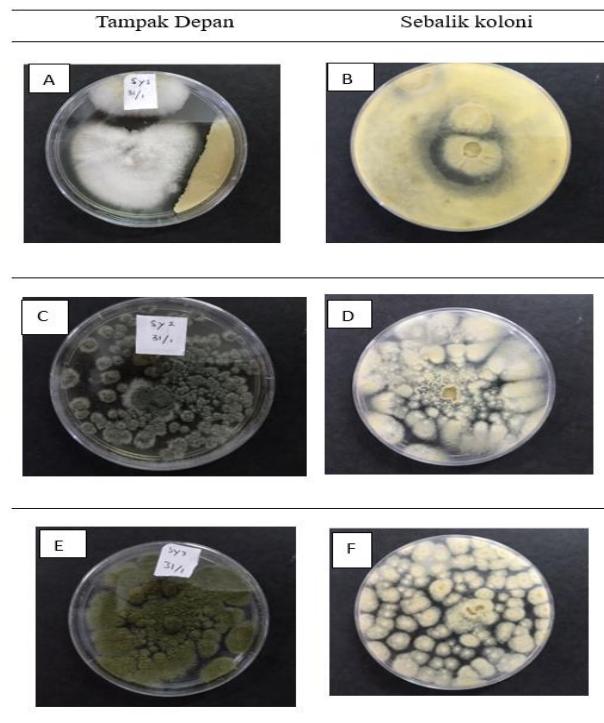
Hasil penelitian inventarisasi jamur pada sarang semi alami Penyu Lekang yang gagal menetas yang berasal dari 3 pantai berbeda di Provinsi Bali yaitu, pantai Seminyak, pantai Serangan dan pantai Sanur yang terdapat di TCEC berjumlah 9 isolat (Tabel 2). Sebanyak 4 isolat memperlihatkan adanya perbedaan secara makroskopik yaitu bentuk koloni dan warna koloni sehingga isolate ini akan dilanjutkan untuk dilakukan pengujian secara molekuler. Primer yang digunakan adalah primer universal yaitu DNA *Internal Transcribed Spacer* (ITS) sebagai target, urutan DNA yang diamplifikasi dianalisis untuk mengidentifikasi jamur yang ada dalam spesimen.

Tabel 2. Karakteristik jamur patogen yang diamati secara makroskopik pada penelitian ini

No	Nama Pantai	Kode Isolat	Warna Koloni		Pinggiran Koloni	Pusat Dalam Koloni	Bentuk Koloni	Tekstur
			Tampak Depan	Tampak Belakang				
1	Pantai Seminyak	SY1	Putih	Kuning	Putih	Putih	Bundar	Kapas
2	Pantai Seminyak	SY2	Hijau	Putih	Putih	Hijau	Bundar	Bubuk
3	Pantai Seminyak	SY3	Hijau	Putih	Hijau	Hijau	Bundar	Bubuk
4	Panatai Serangan	SG1	Hijau	Krem	Hijau	Hijau	Bundar	Bubuk
5	Panatai Serangan	SG2	Hitam	Krem	Putih	Hitam	Bundar	Kapas
6	Panatai Serangan	SG3	Hitam	Krem	Putih	Hitam	Bundar	Kapas
7	Pantai Sanur	SR1	Hitam	Krem	Putih	Hitam	Bundar	Kapas
8	Panatai Sanur	SR2	Hijau	Krem	Hijau	Hijau	Bundar	Bubuk
9	Pantai Sanur	SR3	Coklat	Coklat	Coklat Tua	Coklat Tua	Tidak Teratur	Kapas

Isolat Jamur yang berasal dari 3 pantai yang berbeda dari sarang semi alami penyu lekang mempunyai ciri-ciri yang beragam bergantung dari kondisi lingkungan lokasi sampling. Karakteristik tersebut meliputi tampak depan, tampak belakang (Sebalik koloni), pinggiran koloni, pusat dalam koloni, bentuk koloni, tekstur. Dilihat dari hasil (Tabel 5) bahwa tampak depan pada koloni yang berwarna Hijau sebanyak 44,4 %, tampak depan koloni berwana

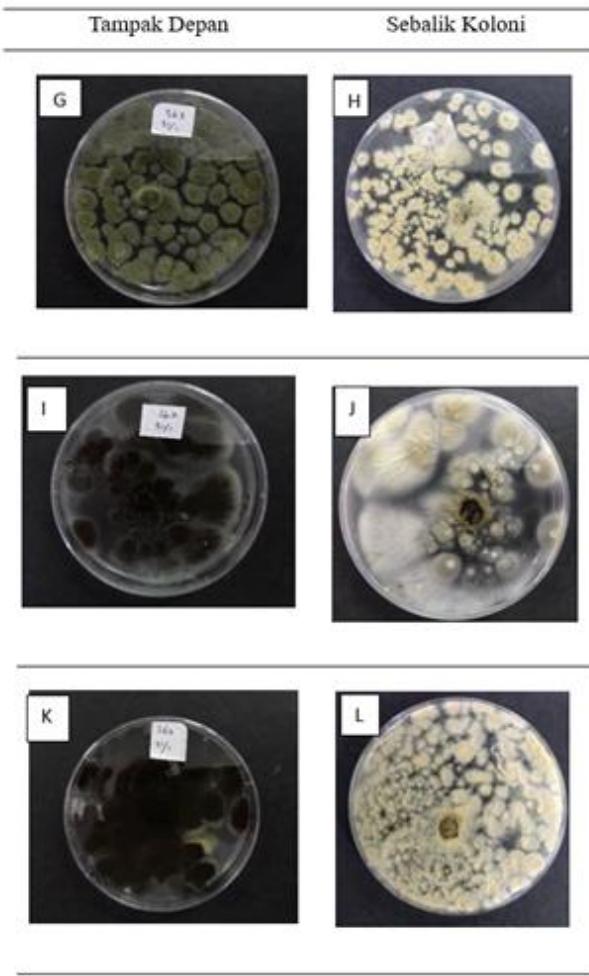
Hitam sebanyak 33,3 %, tampak depan koloni berwana Putih sebanyak 11,1 % dan tampak depan koloni berwana Coklat sebanyak 11,1 %. Tampak belakang pada koloni yang berwana Kuning sebanyak 11,1 %, Tampak belakang pada koloni yang berwana Putih sebanyak 22,2 %, tampak belakang pada koloni yang berwana Krem sebanyak 55,5 %, tampak belakang pada koloni yang berwana Coklat sebanyak 11,1 %.



Gambar 1. Kenampakan jamur patogen secara makroskopik yang diisolasi dari pasir penetasan telur penyu Lekang di Pantai Seminyak. Keterangan (A) Tampak depan isolate 1 Pantai Seminyak, (B) Sebalik koloni 1 Pantai Seminyak, (C) Tampak depan isolate 2 Pantai Seminyak, (D) Sebalik koloni 2 Pantai Seminyak, (E) Tampak depan isolate 3 Pantai Seminyak, (F) Sebalik koloni 3 Pantai Seminyak

Data hasil makroskopik yang telah dilakukan, pada Gambar 1 menunjukkan isolat dari tiga pantai berbeda di Provinsi Bali memiliki berbagai karakteristik yang berbeda. Permukaan koloni pada media PDA di cawan Petri berwarna kuning kecoklatan dan terdiri dari beberapa serabut-serabut tipis dengan bentuk koloni berbentuk bulat atau juga semi bulat. Secara makroskopik, *Aspergillus niger* mempunyai koloni berbentuk bulat, tekstur lembut, tepi koloni rata serta berwarna coklat atau coklat kehitaman. Hal ini sesuai dengan laporan

dari Praja & Yudhana (2018) bahwa warna miselium dari *Aspergillus niger* ditunjukkan dengan warna hitam. Penelitian dari Wahdania dkk., (2016) juga melaporkan bahwa morfologi isolat *Aspergillus niger* secara makroskopis berwarna coklat kehitaman serta tepi merata dan agak kasar, untuk koloni berbentuk bulat. Secara mikroskopis, koloni *Aspergillus niger* yang memiliki ciri khas berupa lapisan konidiofor yang padat serta rapat berwarna coklat tua sampai hitam dan berwarna putih atau kuning.



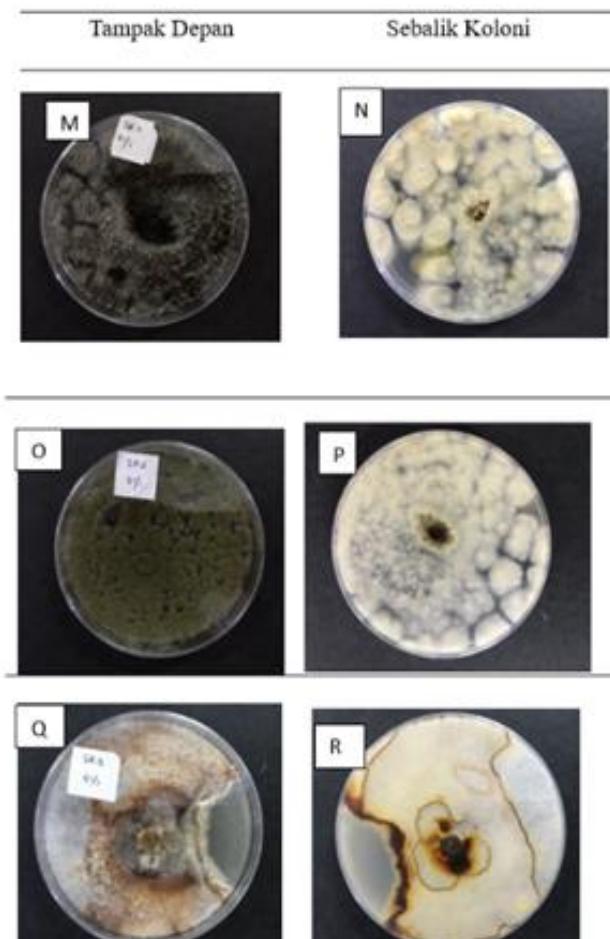
Gambar 2. Kenampakan jamur patogen secara makroskopik yang diisolasi dari pasir penetasan telur penyu Lekang di Pantai Serangan. Keterangan (G) Tampak depan isolate 1 Pantai Serangan, (H) Sebalik koloni 1 Pantai Serangan, (I) Tampak depan isolate 2 Pantai Serangan, (J) Sebalik koloni 2 Pantai Serangan, (K) Tampak depan isolate 3 Pantai Serangan, dan (L) Sebalik koloni 3 Pantai Serangan

Ciri makroskopis dari jamur *Fusarium sp.* pada media PDA pada awal masa pertumbuhan, menunjukkan koloni berwarna putih, tetapi seiring dengan lama

masa inkubasi, koloni akan berubah berwarna krem atau kuning pucat dan dalam keadaan tertentu berwarna merah muda agak ungu. memiliki koloni melingkar dan

menyebar ke segala arah dengan lambat. Permukaan atas dan bawah koloni berwarna putih, akan tetapi pada bagian bawah lama kelamaan berwarna kekuningan. Hasil identifikasi yang diperoleh sesuai dengan hasil yang ditemukan oleh Sunarmi (2010) dimana koloni cendawan yang ditemukan

berbentuk bulat telur atau lonjong, terbentuk secara tunggal atau berangkai-rangkai, membentuk massa yang berwarna putih atau merah jambu. Kemudian ditengah medium pada cawan petri terdapat warna putih agak kekuningan dengan warna bagian dasar koloni putih.



Gambar 3. Kenampakan jamur patogen secara makroskopik yang diisolasi dari pasir penetasan telur penyu Lekang di Pantai Sanur. Keterangan (M) Tampak depan isolate 1 Pantai Sanur, (N) Sebalik koloni 1 Pantai Sanur, (O) Tampak depan isolate 2 Pantai Sanur, (P) Sebalik koloni 2 Pantai Sanur, (Q) Tampak depan isolate 3 Pantai Sanur, (R) Sebalik koloni 3 Pantai Sanur

Jika dibandingkan dengan kejadian infeksi jamur di lokasi lain di Indonesia menunjukkan jenis jamur yang menginfeksi penyu sisik dan penyu hijau di Pelestarian Penyu Pulau Kelapa Dua, Taman Nasional Laut Kepulauan Seribu, DKI Jakarta adalah yang paling sedikit, yaitu hanya ditemukan dari genus *Fusarium*. Hasil penelitian Nursyam dkk. (2016) di pantai Serang,

Blitar, Jawa Timur, diperoleh jenis-jenis jamur yang menginfeksi penyu lekang (*L. olivacea*) yang masuk dalam 4 genus yaitu *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Fusarium*, dan *Geotrichum*.

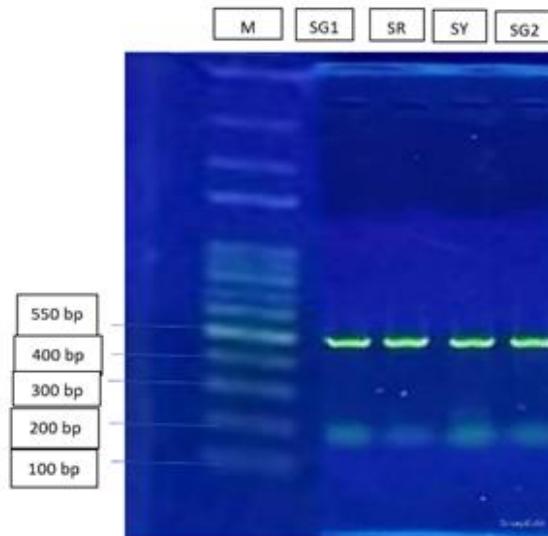
Pada jenis penyu yang sama di *Turtle Conservation And Education Center* Bali, Ayuningtyas dkk. (2019) memperoleh 4 genus jamur yaitu *Aspergillus*, *Fusarium*,

Pythophthora dan *Trichoderma*. Berdasarkan dari hasil penelitian jamur yang menginfeksi beberapa jenis penyu dan lokasi yang berbeda tersebut menunjukkan bahwa *Fusarium* merupakan jamur yang seringkali ditemukan menginfeksi penyu. Hasil penelitian Cafarchia dkk. (2020) terhadap 74 penyu tempayan (*C. caretta*) hasil penyelamatan diperoleh bukti bahwa *Fusarium* merupakan jamur yang paling sering ditemukan di penyu dengan lesi makroskopik. Spesies *Fusarium* juga telah diisolasi dari abses jaringan kutaneus (Williams dkk., 2012), lesi kutaneous atau

pneumonik dan bronkopneumonia pada penyu (Sarmiento-Ramírez dkk., 2014).

Hasil deteksi jamur secara molekuler berdasarkan sekuen gen ITS

Hasil deteksi terhadap Jamur yang ada pada sarang penyu semi alami yang gagal menetas dengan menggunakan uji PCR Konvensional. Hal ini menunjukkan bahwa PCR Konvensioanl yang digunakan mampu mendeteksi produk DNA yang telah diekstraksi dengan ditandai Band pita yang merupakan hasil amplifikasi produk DNA jamur yang sesuai dengan primer ITS 1 dan ITS 4, utuh, dan jelas dengan panjang pita DNA 550 bp (Gambar 4).



Gambar 4. Hasil elektroforesis produk DNA dari masing – masing sampel jamur patogen pada penelitian ini berdasarkan sekuen gen ITS.

Amplifikasi DNA Jamur dengan teknik PCR sering kali menggunakan pasangan primer ITS1/ITS4 yang akan mengamplifikasi daerah ITS DNA ribosom (rDNA). DNA ribosom (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom (rRNA). Gen ini banyak digunakan dalam filogenetika, klasifikasi, dan identifikasi untuk cendawan karena sifat keberadaannya yang universal, struktur sekuenya yang konservatif dan terdapat dalam jumlah banyak. Penemuan mengenai struktur DNA dikembangkan teknik identifikasi secara molekuler yang dilakukan untuk mengatasi masalah taksonomi fungi (Sandy dkk., 2015). Perbandingan sekuen pada gen penyandi ribosom DNA dapat

digunakan sebagai karakter untuk identifikasi molekuler suatu organisme karena gen ini memiliki sekuen yang terkonservasi maupun variabel (Deepthi dkk., 2018).

Hasil analisis filogenetik

Hasil identifikasi berdasarkan persamaan BLAST homology didapatkan kesamaan isolat Sampel 1 Jamur Pantai Serangan (SG1) dan Sampel Jamur Pantai Sanur (SR) memiliki persentase similaritas sebesar 98% terhadap *Fusarium solani*. Hal ini menunjukkan bahwa kesamaan basa yang dimiliki isolat dengan *Fusarium Solari* ini sangat mirip sehingga dapat dikatakan bahwa isolat ini adalah spesies *Fusarium*

Solani. Sedangkan isolat Sampel 2 yaitu Jamur Pantai Serangan (SG2) dan Sampel Jamur Pantai Seminyak (SY) memiliki persentase similaritas sebesar 91% terhadap *Aspergillus Niger* pembentukan cabang

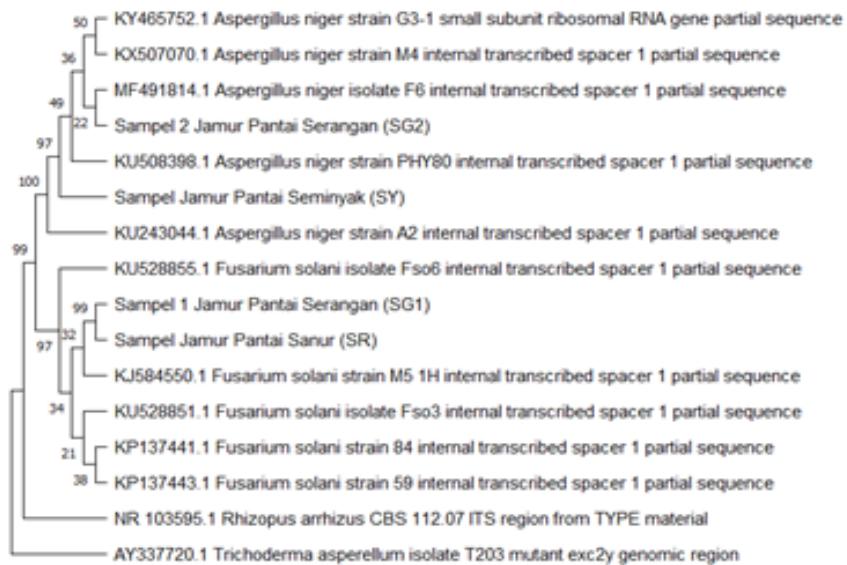
pohon filogenetik akan membentuk cabang yang sama. Konstruksi pohon filogenetik menggunakan *Rhizopus Arrhizus* (NR103595) dan *Trichoderma Asperellum* (AY337720) sebagai outgroup.

Tabel 3. Data spesies jamur yang berhasil di BLAST pada situs NCBI

NO	Nama Isolat	Isolat Genbank	ACC No	Similarity
1	Sampel Jamur 1 Pantai Serangan	<i>Fusarium solani</i> strain 87 internal transcribed spacer 1	KP137446	98 %
2	Sampel Jamur Pantai Sanur	<i>Aspergillus niger</i> strain PHY105 internal transcribed spacer 1	KU508400	91%
3	Sampel Jamur Pantai Seminyak	<i>Fusarium solani</i> strain 87 internal transcribed spacer 1	KP137446	98 %
4	Sampel Jamur 2 Pantai Serangan	<i>Aspergillus niger</i> strain PHY105 internal transcribed spacer 1	KU508400	91%

Pohon filogenetik dapat memberikan informasi tentang pengklasifikasian populasi berdasarkan hubungan evolusionernya (Dharmayanti, 2011). Konstruksi pohon filogenetik dapat dilakukan dengan metode neighbor-joining yang merupakan salah satu dari 2 kategori yang digunakan sebagai strategi untuk menghasilkan pohon filogenetik terbaik dengan cara memeriksa hubungan topologi lokal dari pohon dan mengkonstruksi pohon terbaik dengan langkah demi langkah (Dharmayanti, 2011). Genus *Fusarium* merupakan jenis jamur yang paling banyak ditemukan pada pasir sarang semi alami dikarenakan *Fusarium sp.* Mikrobiota umum pada tanah dan daerah deket pantai. Jamur *Fusarium* ditemukan juga pada isolate pasir sarang yang berhasil menetas, kejadian ini mengindikasikan jamur *Fusarium sp.* Terdapat dalam pasir dan ke dalam sarang sehingga mempengaruhi inkubasi dan daya tetas telur penyu (Praja dkk. 2018).

Hasil identifikasi yang menemukan spesies Jamur yang ada pada sarang penyu lekang yang gagal menetas kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor yaitu, mikroorganisme pada pasir dapat menginfeksi telur penyu melalui pori-pori dan menyebabkan kegagalan penetasan. Telur yang gagal menetas dan berbau busuk tersebut diduga karena embrio mengalami kematian yang terjadi pada saat pengumpulan telur atau pemindahan telur dari sarang alami ke sarang semi alami. Kemungkinan telur-telur tersebut sudah tidak berembrio dari sejak dikeluarkan oleh induknya akan tetapi telur-telur tersebut tetap ditanam tidak akan menetas sehingga akan memperkecil persentase penetasan. Keadaan ini akan bertambah buruk jika dalam satu sarang ditemukan beberapa telur yang infertil atau fertil tetapi tidak mampu berkembang sempurna sehingga dapat memicu kolonisasi jamur dan mengancam perkembangan seluruh telur.



Gambar 5. Hasil konstruksi pohon filogenetik dari isolat jamur pada penelitian ini dengan beberapa spesies terkait di NCBI.

Menurut penelitian dari Maulany dkk., (2012) jika suhu sarang penetasan lebih besar atau lebih tinggi dari 33°C selama tiga hari berturut-turut pada akhir masa inkubasi akan menurunkan persentase keberhasilan penetasan. Suhu media penetasan yang melebihi kisaran optimal akan menghambat perkembangan sistem gerak janin, sehingga gerakan janin akan berkurang dan tidak merangsang terhadap pemecahan cangkang telur, sehingga tukik tidak bisa mencapai permukaan sarang. Sebaliknya jika suhu di bawah 24 °C secara berturut-turut akan merusak dan menghambat pertumbuhan embrio. Laporan dari Benni dkk., (2018) mengatakan bahwa embrio telur dapat berkembang dengan baik pada kisaran suhu 24-33 °C. Hal ini juga didukung oleh pendapat dari Semboor (2021) bahwa suhu mempengaruhi perkembangan telur penyu dan mencegah terjadinya pembusukan telur.

Selain suhu, faktor lingkungan seperti kelembaban juga menjadi salah satu faktor yang mempengaruhi tingkat keberhasilan penetasan telur Penyu Lekang. Jika musim kemarau datang pasir sarang penetasan akan menjadi kering. Selain itu, vegetasi merupakan faktor lingkungan yang penting bagi habitat peneluran penyu. Tutupan tajuk serta naungan vegetasi

mempengaruhi kelembapan sarang peneluran karena radiasi matahari tidak langsung mengenai sarang (Benni dkk., 2017). Menurut penelitian dari Blechschmidt, (2020) juga menyatakan bahwa lebih banyak naungan didekat sarang dapat menurunkan suhu sarang serta juga dapat mencegah curah hujan ke sarang. Laporan dari Setiawan dkk., (2018) juga menyatakan bahwa kenaikan suhu sarang dipengaruhi oleh sinar matahari dan kurangnya tutupan vegetasi pada areal tersebut.

KESIMPULAN

Secara keseluruhan, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa secara makroskopik pada pasir sarang semi alami Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea* L.) yang gagal menetas yang berasal dari tiga pantai berbeda di Provinsi Bali ditemukan adanya jamur dengan koloni pada media PDA di cawan petri berwarna kuning kecoklatan dan terdiri dari beberapa serabut-serabut tipis dengan bentuk koloni berbentuk bulat atau juga semi bulat. Hasil sekruensing DNA di BLAST pada situs NCBI kekerabatan spesies jamur yang berhasil diisolasi dari pasir sarang semi alami Penyu Lekang (*Lepidochelys*

olivacea L.) yang gagal menetas menggunakan analisis *filogenetik tree* yaitu memiliki kekerabatan dengan jamur *Aspergillus niger* dan *Fusarium solani*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak Terimakasih kepada Kepala Balai Konservasi Sumber Daya Alam (BKSDA) yang telah memberikan izin dilakukan penelitian di TCEC (*Turtle Conservation and Education Center*) dan semua pihak dari TCEC (*Turtle Conservation and Education Center*) yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Akira, R., Wandia, I. N., & Adyana, I. W. (2012). Komposisi genetik penyu hijau (*Chelonia mydas*) hasil tangkapan liar dari Nusa Tenggara Barat (Bima dan Teluk Cempa). *Journal Indonesia Medicus Veterinus*, 1(1):22-36.
- Al-Bahry, S. N., I. Mahmoud, Y. Melghit and K. Al-Amri. 2011. Analysis of Elemental Composition of the Eggshell Before and After Incubation in the Loggerhead Turtle *Caretta caretta* in Oman. *Microscopy and Microanalysis*. (17): 1-9.
- Anwar, S., Febria, F.A., Nasir, N. (2014). Identifikasi Koleksi Jamur dari Cangkang dan Pasir Sarang Telur Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea* L.) di Penangkaran Pariaman. *Biologi Universitas Andalas*, 3(1), 46-50.
- Ario, R., Wibowo, E., Pratikto, I., Fajar, S. (2016). Pelestarian Habitat Penyu dari Ancaman Kepunahan di Turtle Conservation And Education Center (TCEC). *J. Kelautan Trop.*, 19(1), 60-66.
- Ario, R., Wibowo, E., Pratikto, I., & Fajar, S. (2016). Pelestarian habitat penyu dari ancaman kepunahan di turtle and education center (TCEC), Bali. *Jurnal Kelautan Tropis*, 19(1) :360-66
- Ayuningtyas, I., Kushartono, E.W. & Redjeki, S. (2019). Identifikasi Jamur Pada Tukik *Lepidochelys olivacea*, Eschscholtz, 1829 (Reptilia : Cheloniidae) Di Sea turtle Conservation And Education Center Bali. *Jurnal of Marine Research.*, 8(2):157-167.
- Bézy, V.S., Valverde, R.A., Plante, C.J. 2015. Olive Ridley Sea Turtle Hatching Success as a Function of the Microbial Abundance in Nest Sand at Ostional, Costa Rica. *PloS one*, 10(2), e0118579.
- Booth, D.T., Dunstan, A. 2018. A Preliminary Investigation into the Early Embryo Death Syndrome (EEDS) at The World's Largest Green Turtle Rookery. *PloS one*, 13(4), e0195462.
- Cappuccino, J.G. & Sherman N. (2014). *Manual Laboratorium Biologi*. Jakarta, Indonesia: EGC.
- Cafarchia, C., Paradies, R., Figueiredo, L.A., Iatta, R., Desantis, S., Di Bello, A.V.F., Nicola Zizzo, N. & van Diepeningen, A.D. 2020. *Fusarium spp. in Loggerhead Sea Turtles (Caretta caretta): From Colonization to Infection*. *Veterinary Pathology*. 57(1):139- 146. doi: 10.1177/0300985819880347
- Dharyamanti, I. N. L. P. (2011). Filogenetika Molekuler: Metode Taksonomi Organisme Berdasarkan Sejarah Evolusi. *Wartazoa*, 1(21), 1-10.
- Ganjar, Indrawati, dan Wellydzar Sjamsuridzal. 2006. *Mikologi : Dasar dan Terapan*. Jakarta: Yayasan Obor Indonesia.
- Guna, P. I. A., Suyadnya, I. M. A., & Agung, I. (2018). Sistem Monitoring Penetasan Telur Penyu Menggunakan Mikrokontroler NodeMCU ESP8266 dan Protokol MQTT dengan Notifikasi Berbasis Telegram Messenger. *J. Comput. Sci. Informatics Eng*, 2(2), 80.
- Hardiono, E. B., Sri Rejeki & Wibowo, E. (2012). Pengaruh pemberian udang ebi dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan

- tukik penyu lekang (*Lepidochelys olivacea*) di Pantai Samas, Bantul. *Jurnal Ilmu Kelautan*, 1(2):67-72.
- Harnino, T. Z. A. E., Parawangsa, I. N. Y., Sari, L. A., & Arsad, S. (2021). Efektifitas Pengelolaan Konservasi Penyu di Turtle Conservation and Education Center Serangan, Denpasar Bali. *Journal of Marine and Coastal Science* Vol, 10, 1.
- Haprabu, B.R.S. (2018). Isolasi dan Identifikasi Cemaran Bakteri *Escherichia coli* pada Telur Penyu Lekang yang Gagal Menetas di Sarang Semi Alami Pantai Boom Banyuwangi. [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga.
- Kurniarum, M., Prihanta, W., & Wahyuni, S. (2015). Pengetahuan dan Sikap Masyarakat Tterhadap Konservasi Penyu dan Ekowisata di Desa Hadiwarno Kabupaten Pcaitan Sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi ndonesia*, 1(2):124-137.
- Kurniarum, M., Prihanta, W., & Wahyuni, S. (2015). Pengetahuan dan Sikap Masyarakat Tterhadap Konservasi Penyu dan Ekowisata di Desa Hadiwarno Kabupaten Pcaitan Sebagai Sumber Belajar Biologi. *Jurnal Pendidikan Biologi ndonesia*, 1(2):124-137.
- Lestari, N., Sunardi, E. Y., Setiawan, T. B., & Trapsilasiwi, D. (2019). Etnomatematika pada proses penetasan telur penyu hijau semi alami di sukamade, taman nasional meru betiri sebagai bahan ajar siswa berbasis fraktal. *Jurnal Universitas Negeri Jember*. 21 (1), 61-70. <https://core.ac.uk/reader/297204320>
- Nursyam, H., Fajar, M., A'yunin, Q. & Arifin, N. B. 2016. Survey of fungus and Parasites content found in ridley Turtles (*Lepidochelys olivacea*) at serang Beach, Blitar regency, East Java. *Ecology, Environment and Conservation Journal*, 22(4):175-180.
- Praja, R.N., Yudhana, A., Haditanojo, W. 2018. Isolasi dan Identifikasi Jamur pada Cangkang Telur Penyu Lekang (*Lepidochelys olivacea*) Gagal Menetas di Pantai Boom Banyuwangi. *J. Med. Vet.*, 1(2), 11–15.
- Praja, R. N., & Yudhana, A. (2018). Isolasi Dan Identifikasi *Aspergillus* Spp pada Paru-Paru Ayam Kampung Yang Dijual di Pasar Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.20473/jmv.vol1.iss.1.2017.6.11>
- Ruthig, G.R., Gramera, A.E. 2019. Aggregations of Olive Ridley Sea Turtle (*Lepidochelys olivacea* Eschholtz, 1829) Nests is Associated with Increased Human Predation during an Arribada event. *Herpetolo. Notes*, 12, 1-7.
- Sujaya, I., Nocianitri, K., Aryantini, N., Nursini, W., Ramona, Y., Orikasa, Y., Kenji, F., Urashima, T., & Oda, Y. (2016). Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Isolat Susu Segar Sapi Bali (Identification And Characterization Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Bali Cattle's Raw Milk). *Jurnal Veteriner*, 17(2), 155–167. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.2.155>
- Sumarmin, R., Helendra, H., Putra, A.E. (2012). Daya Tetas Telur Penyu Sisik (*Eretmochelys imbricate* L.) pada Kedalaman Sarang dan Strata Tumpukan Telur Berbeda. *Eksakta*, 1(8), 70-77.
- Sunarmi, N. 2010. Isolasi dan Identifikasi Jamur Endofit dari Akar Tanaman Kentang Sebagai Anti Jamur (*Fusarium* sp, *Phytoptora infestans*) dan Anti Bakteri (*Ralstonia solanacaerum*). Skripsi. Universitas Islam Negeri Malang. Malang.
- Susan, Dewi dan Atik Retnowati. 2017. Catatan Beberapa Jamur Makro Dari Pulau Enggano: Diversitas Dan Potensinya". *Jurnal Berita Biologi*, 16(3): 243.
- Valverde, R.A., Wingard, S., Gómez, F., Tordoir, M.T., Orrego, C.M. 2010.

- Field Lethal Incubation
Temperature of Olive Ridley Sea
Turtle *Lepidochelys olivacea*
Embryos at A Mass Nesting
Rookery. Endangered Species Res.,
12(1), 77–86.
- Verweij, P.E., Brandt, M.E. 2007.
Aspergillus Fusarium, and Other
Opportunistic Moniliaceous
Fungi. In : Murray et al. (eds).
Manual of Clinical Microbiology.
Ch. 121. 9th ed. ASM Press.
Washington DC. 1802- 1838.
- Wahdania, I., Asrul, & Rosmini. (2016). Uji
Daya Hambat *Aspergillus niger*
Pada Berbagai Bahan Pembawa
Terhadap Phytopththora palmivora
Penyebab Busuk Buah Kakao
(*Theobroma cacao* L.). Jurnal
Agrotekbis, 4(5), 521–529.
- Wicaksono, M.A., Nurhasanah, F.,
Elfidasari, D. 2017. Cemaran
Mikroba Pada Telur Penyu Sisik
(*Eretmochelys imbricata*) di Pulau
Kelapa Dua, Taman Nasional Laut
Kepulauan Seribu, DKI Jakarta. J.
Al-Azhar Indon. Seri Sains Tek.,
4(2), 83-90.