

ASOSIASI PROFESI WIDYAISWARA INDONESIA



JAMUR

PENYEBAB HAWAR PELEPAH PADI

ASPEK MORFOLOGI DAN MOLEKULER

PRATIWI HAMZAH, S. SI, M. BIOTECH

Jamur Penyebab Hawar Pelepah Padi

Aspek Morfologi dan Molekuler

Pratiwi Hamzah, S.Si., M. Biotech.



JAMUR PENYEBAB HAWAR PELEPAH PADI
ASPEK MORFOLOGI DAN MOLEKULER

Penulis:

Pratiwi Hamzah, S.Si., M. Biotech.

ISBN:

978-623-5275-47-5

Editor:

Mardawiah

Disain Sampul dan Tata Letak:

Tim BPPD APWI

Penerbit:

ASOSIASI PROFESI WIDYAIWARA INDONESIA

IKAPI: Nomor Anggota 599/Anggota Luar Biasa/DKI/2021

Redaksi:

Gedung Atmodarminto, BPPK Kementerian Keuangan

Jl. Purnawarman No.99, Kebayoran Baru, Jakarta Selatan.

Email : bppdapwi@gmail.com

Website : <https://www.bppdapwi.com>

Whatsapp : 083840572182

Cetakan pertama, Mei 2023

Hak cipta dilindungi Undang Undang

Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk dan cara apapun tanpa ijin tertulis dari penerbit sesuai Undang-undang No. 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta Pasal 1

Prakata

Alhamdulillah Robbil 'aalamin. Segala puji bagi Allah SWT atas segala Rahmat dan pertolongan-Nya-lah sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian hingga penyusunan buku ini. Buku ini adalah sebuah 'catatan' penelitian yang disusun untuk menjadi referensi bagi mahasiswa, penyuluh, praktisi hingga akademisi dalam mempelajari jamur *Rhizoctonia solani* pada padi, baik dari aspek morfologi hingga aspek molekulernya.

Jamur *R. solani* adalah jamur yang kisaran inangnya sangat luas dan jenis yang sangat banyak. Tanaman padi sendiri umumnya diserang oleh *R. solani* jenis AG1-IA. Pada satu jenis *R. solani*, ternyata dapat memiliki morfologi yang berbeda bahkan pada tingkat molekulernya memiliki perbedaan pada beberapa basa nukleotidanya.

Penulis menyajikan beberapa hasil penelitian yang diharapkan dapat menjadi referensi bagi siapa pun yang ingin mengkaji jamur ini dengan lebih dalam, serta sebagai dasar ilmu untuk mengambil kebijakan dalam pengendalian jamur *R. solani* pada padi. Akhirnya, melalui kesempatan ini pula penulis mengharapakan kritik dan saran dari pembaca demi perbaikan karya ini dan selanjutnya.

Semoga buku ini dapat bermanfaat....

Gowa, 11 Mei 2023

Penulis

Daftar Isi

| | |
|---|-----|
| Prakata..... | iii |
| Daftar Isi | iv |
| 1. <i>Rhizoctonia solani</i> Penyebab Hawar Pelepah Padi..... | 1 |
| Penyakit yang Menyerang Tanaman Padi | 1 |
| Patogen Penyebab Hawar Pelepah Padi..... | 2 |
| 2. Penyakit Hawar Pelepah Padi..... | 7 |
| 3. <i>Rhizoctonia solani</i> , Si Jamur Patogen..... | 11 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA dan Variabilitas Morfologinya..... | 13 |
| 4. Metode Isolasi DNA Jamur..... | 25 |
| 5. Aspek Molekuler <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA..... | 31 |
| Variabilitas Molekuler <i>Rhizoctonia solani</i> AG1-IA..... | 34 |
| Gen yang Diduga Terkait Patogenesitas..... | 43 |
| 6. Variabilitas <i>Rhizoctonia solani</i> dalam Penelitian..... | 53 |
| Daftar Pustaka..... | 55 |
| Profil Penulis..... | 62 |

“

*“Bagaikan padi, semakin berisi semakin
runduk. Jangan menjadi ilalang, semakin lama
semakin tinggi, tetapi tak berisi”*

”

Peribahasa “Bagaikan padi, semakin berisi semakin runduk. Jangan menjadi ilalang, semakin lama semakin tinggi, tetapi tak berisi” mengingatkan kita pada hamparan sawah yang padinya telah menguning. Padinya merunduk dan hampir rebah karena berisi. Tetapi tidak jarang kita melihat hamparan sawah yang hijau, namun padinya terlihat rebah. Tentu saja berbeda antara padi yang rebah dan berisi dengan padi yang hijau dan rebah, tetapi tidak berisi.

Mengapa demikian?

Kita akan membahas penyebabnya dalam buku ini.

1

Rhizoctonia solani **Penyebab Hawar** **Pelepah Padi**

Penyakit yang Menyerang Tanaman Padi

Beras merupakan makanan pokok bagi sebagian besar penduduk Indonesia. Meski makanan lain bisa tergantikan dengan nasi, bagi orang yang biasa makan nasi, nasi memiliki nilai tersendiri dan tidak bisa dengan mudah tergantikan oleh makanan lain. Padi merupakan penghasil beras di mana peningkatan produksi komoditi padi berbanding terbalik dengan pertumbuhan penduduk Indonesia.

Padi (*Oryza sativa* L) merupakan komoditas strategis nasional dengan permintaan ketersediaannya terus bertambah, bahkan delapan tahun lalu, Dirjen Pangan telah memperkirakan kesenjangan antara produksi padi dengan pertambahan jumlah penduduk untuk 10 tahun ke depan.

Diperkirakan jumlah penduduk Indonesia akan meningkat menjadi sekitar 300 juta jiwa dalam periode 2015-2025. Di dalam kondisi tersebut, semakin sulit untuk mencapai, mempertahankan, dan meningkatkan kualitas ketahanan pangan yang berkelanjutan, karena jumlah beras yang sangat besar. Untuk memenuhi kebutuhan beras dalam negeri, pemerintah telah menetapkan target produksi beras sebanyak 73.400.000 ton beras kering set gabah giling tahun 2015 (Dirjen Pangan, 2015).

Oleh karena itu, upaya peningkatan produksi padi perlu terus dilakukan agar kebutuhan penduduk yang jumlahnya terus meningkat dapat terpenuhi. Akan

tetapi peningkatan produksi padi ternyata masih mengalami banyak kendala. Kendala itu bisa berupa penyakit yang menyerang padi.

Beberapa penyakit terpenting yang menyerang tanaman padi berasal dari golongan virus seperti penyakit tungro dan penyakit kerdil padi. Virus yang menyerang tanaman padi biasanya dibawa dan ditularkan oleh serangga vektor seperti wereng hijau (Hemiptera: *Nephotettix virescens*) dan wereng cokelat (Hemiptera: *Nilaparvata lugens*).

Kompleksnya serangan virus dan serangga dengan sifat yang berbeda, lingkungan/cuaca yang tidak aman dan kurangnya pengendalian hama oleh petani dapat mengakibatkan kerusakan tanaman yang lebih parah bahkan gagal panen.

Selain itu, ditemukan pula serangan penyakit yang disebabkan oleh patogen. Serangan patogen dapat menurunkan produksi padi baik dari segi kualitas maupun kuantitasnya.

Penyakit yang masih dijumpai pada pertanaman padi di Indonesia yaitu penyakit hawar pelepah. Penyakit tersebut berkembang baik di semua lokasi penanaman padi, baik pada ekosistem padi dataran tinggi maupun dataran rendah (Nuryanto, 2014).

Patogen Penyebab Hawar Pelepah Padi

Hawar pelepah adalah salah satu penyakit yang ditemukan pada padi. Penyakit tersebut disebabkan oleh jamur patogen *R. solani*. Hawar pelepah menjadi penyakit endemis di lahan pertanian padi yang intensif dan dengan cepat dapat berkembang parah menjadi faktor utama penentu keberhasilan panen (Nuryanto, 2003; Nuryanto, 2011).

Penyakit hawar pelepah pada varietas rentan dapat mengurangi hasil hingga 40% (Groth, 2008). Penyebab rebahnya tanaman padi yang bahkan belum menguning salah satunya dikarenakan penyakit hawar pelepah padi tersebut.

Jamur *R. solani* memiliki karakteristik morfologi, patogenisitas dan kisaran inang yang beragam (Duncan et al., 1993). Variabilitas yang tinggi menjadi kendala dalam proses pengendalian jamur tersebut karena memberikan peluang yang besar pada munculnya strain yang mampu bertahan hidup dengan baik dan virulensi yang tinggi (Ou, 1985).

Informasi mengenai *R. solani* diperlukan, terutama mengenai identifikasi dan klasifikasi berdasarkan karakteristik tertentu diantaranya morfologi hifa, warna koloni, sklerotia, gejala yang ditimbulkan, patogenisitas, dan interaksinya dengan tanaman serta berdasarkan kemampuan hifa jamur tersebut melakukan fusi yang disebut anastomosis.

Kemiripan morfologi antar strain menyulitkan identifikasi dan klasifikasi patogen ini. Begitu pula dengan identifikasi berdasarkan anastomosis grup (AG) tidak lagi akurat sebab isolat yang berasal dari grup AG1-IA diketahui tetap bisa melakukan fusi dengan isolat yang berasal dari grup AG1 lainnya (Khodayari *et al.*, 2009; Ogoshi, 1987).

Meskipun identifikasi dan klasifikasi berdasarkan morfologi dan anastomosis grup tetap menjadi acuan, tetapi cara molekuler saat ini lebih diutamakan. Teknik dengan marka molekuler (*molecular markers*) lebih efisien, ketepatannya tinggi, dan lebih terpercaya dibanding marka fenotipe sehingga banyak dimanfaatkan dalam analisis variabilitas hingga tingkat genetik suatu organisme.

Selain identifikasi secara molekuler, pemahaman mengenai aspek molekuler patogenesis *R. solani* dalam interaksinya dengan inang akan memungkinkan

pengelolaan yang lebih baik untuk penyakit yang disebabkan oleh patogen ini (Rioux *et al.*, 2011). Oleh karena itu, informasi mengenai variabilitas dan aspek molekuler yang berkaitan dengan patogenesis *R. solani* masih terus dikaji.

Pada bahasan selanjutnya akan dipaparkan mengenai penyakit hawar pelepah pada padi, jamur *R. solani*, cara isolasi DNA jamur, gen yang diduga terkait patogenesis, serta beberapa penelitian luar negeri yang terkait dengan variabilitas jamur tersebut. Informasi yang dipaparkan ini diharapkan dapat menjadi sumbangan besar dalam perumusan strategi yang paling tepat termasuk pengembangan ke arah rekayasa genetik dalam melakukan pengendalian jamur *R. solani* penyebab penyakit hawar pelepah padi di Indonesia.

Ada perbedaan antara penyebutan 'hama' dan 'penyakit' untuk menyebut organisme pengganggu tanaman. Hama adalah organisme pengganggu tanaman yang berupa hewan, pada umumnya serangga dan hewan pengerat. Sedangkan penyakit, merujuk pada mikroorganisme yang mengganggu tanaman, baik berupa jamur, bakteri maupun virus.

2

Penyakit Hawar Pelepah Padi

Penyakit penting yang disebabkan oleh salah satu jamur yaitu hawar pelepah. Penyakit yang ditemukan pada tanaman padi tersebut, menyebabkan kerusakan padi pada beberapa daerah di Indonesia yang disebut juga hawar upih daun dan busuk batang.

Penyakit hawar upih tersebut disebabkan oleh jamur *R. solani*. Jamur yang dapat menginfeksi tanaman padi dimasukkan ke dalam sub grup AG1-IA. Namun ditemukan pula pada subgrup lain yaitu AG1-IB dan AG 2-2IIIB (Garcia *et al.*, 2006).

Penyakit ini merusak pelepah sehingga untuk menemukan dan mengenali penyakit, perlu dibuka kanopi pertanaman. Penyakit ini menyebabkan tanaman menjadi mudah rebah, semakin awal terjadi kerebahan, semakin besar kehilangan yang diakibatkannya.

Jika terdapat persawahan yang padinya masih hijau, tetapi nampak rebah, kemungkinan terkena penyakit ini. Selain itu, penyakit ini menyebabkan gabah kurang terisi penuh atau bahkan hampa. Hawar pelepah terjadi umumnya pada saat tanaman mulai membentuk anakan sampai menjelang panen. Namun demikian, penyakit ini juga dapat terjadi pada tanaman muda (Jia *et al.*, 2007).

Semangun (1991) menjelaskan gejala tanaman padi yang terinfeksi jamur tersebut ditandai dengan adanya bercak-bercak dengan tepi tidak beraturan, berbentuk jorong dengan tepi berwarna coklat kemerahan, sedangkan pusat

bercak berwarna seperti jerami atau kuning kehijauan. Bercak sering ditemukan terdapat dekat dengan lidah daun. Jika keadaan lembab tumbuh benang-benang hifa berwarna putih atau cokelat muda.



Gambar 1. Gejala Hawar Pelepah Padi
(Sumber: <https://nuansatani.com/hawar-pelepah-dan-busuk-batang/>)

Perkecambahan propagul jamur *R. solani* menjadi awal dari perkembangan penyakit hawar pelepah padi. Selanjutnya terjadi infeksi pada bagian pelepah daun padi, lalu berkembang ke dalam bagian batang tanaman padi.

Kerusakan pada ruas batang tersebut menyebabkan terjadinya penghambatan air dan nutrisi serta batang padi yang mudah rebah (Inagaki, 2001). Saat terjadi infeksi lebih lanjut, jamur dapat menimbulkan hawar yang meluas hingga daun bendera bahkan merusak seluruh bagian daun.

Di lapangan, rebahnya pertanaman padi merupakan fenomena perkembangan penyakit hawar pelepah karena disebabkan oleh rapuhnya batang

padi karena infeksi. Kerebahan yang terjadi saat tanaman padi berada pada stadium pengisian malai mengakibatkan pengisian tidak sempurna dan banyak terbentuk gabah hampa (Nuryanto, 2003).

Semakin lama usia penyakit, maka pada gejala tersebut akan terbentuk sklerotia yang ketika disentuh akan mudah lepas dan jatuh ke sekitar pertanaman padi. Sklerotia merupakan agregasi hifa yang cukup padat yang dibentuk dalam ukuran dan morfologi yang khas sebagai adaptasi morfologis struktur tubuh dalam menghadapi keadaan lingkungan yang kurang menguntungkan bagi jamur fitopatogenik pada umumnya.

Penyakit hawar pelepah dapat terjadi jika pada lahan budidayanya memiliki jenis tanah yang dipupuk nitrogen tinggi, varietas rentan, dan didukung lingkungan yang panas dan lembab. Penyakit ini juga dapat berkembang dengan baik jika pada lahan mengandung pupuk fosfat yang tinggi, tetapi perkembangan penyakit dapat dihambat dengan pemberian pupuk kalium.

Variabilitas jamur *R. solani* pada padi baik secara morfologi, patogenisitas dan genetiknya juga telah banyak dilakukan di berbagai negara seperti India (Guleria, 2007), China (Shu, 2014), Vietnam (Matsumoto & Chuong, 2014), Bangladesh (Moni *et al.*, 2016), Malaysia (Nadarajah, 2014), dan lain-lain. Beberapa penelitian akan dibahas pada bahasan lainnya dalam buku ini.

“
Jamur R. solani tidak hanya menyerang tanaman padi melainkan juga tanaman lainnya, setidaknya 188 spesies yang telah dilaporkan. Jenis ini bersifat tular tanah sekaligus tular benih yang berarti dapat tetap hidup di tanah maupun benih sehingga penularannya menjadi cepat dan tak terkontrol.
”

3

***Rhizoctonia solani*, Si Jamur Patogen**

Jamur *R. solani* (Teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) merupakan salah satu jenis patogen yang menyerang setidaknya 188 spesies tumbuhan tingkat tinggi termasuk tanaman sereal, sayur-sayuran, tanaman hias, pepohonan hutan dan rerumputan (Garcia, 2006).

Pada awalnya, jamur jenis ini dideskripsikan oleh Julius Kuhn pada pertanaman kentang pada tahun 1858. Semula jamur ini dimasukkan ke dalam kelas *Deuteromycetes* dengan ordo *Agonomycetales*, tetapi hasil penelitian yang terakhir menunjukkan bahwa *R. solani* merupakan stadium “imperfect” jamur *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, sehingga masuk ke dalam kelas *Basidiomycetes* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Taksonomi lengkap jamur *R. solani* (Mycobank, 2017), yaitu:

- Fungi
- Basidiomycota
- Agaricomycotina
- Agaricomycetes
- Cantharellales
- Ceratobasidiaceae
- Rhizoctonia

Jamur *R. solani* dikenal sebagai patogen yang dapat bertahan hidup di dalam tanah dalam bentuk sklerotium atau miselium dorman. Dapat juga bertahan hidup pada biji dan umbi. Dengan demikian *R. solani* merupakan patogen yang bersifat tular tanah (*soil borne*) dan tular benih (*seed borne*) (Walker, 1975).

Jamur *R. solani* dianggap sebagai spesies kompleks dengan pengelompokan yang didasarkan pada reaksi fusi hifa anastomosisnya (Ogoshi, 1987). Anastomosis merupakan salah satu cara reproduksi aseksual yaitu terjadinya fusi antara hifa yang bersentuhan dan kompatibel. Peleburan antara hifa hanya terjadi di antara isolat *R. solani* yang sama dalam satu kelompok anastomosis (Agrios, 1997; Hawksworth *et al.*, 1983).

Bruehl (1987) selanjutnya menyatakan bahwa antara isolat yang berbeda kelompok anastomosisnya selain tidak akan terjadi anastomosis juga tidak akan terjadi pertukaran genetik. Adanya pengelompokan berdasarkan anastomosis tersebut adalah untuk dapat mengetahui spesialisasi kisaran inang yang berbeda, epidemiologi dan sensitivitasnya terhadap pestisida.

Setidaknya sampai saat ini telah ditemukan 14 kelompok anastomosis (AGs) dari *R. solani* yaitu AG1 sampai AG13 serta AG-BI (Carling, 1996; Stodart, 2007). Pengelompokan tersebut masing-masing masih dibedakan ke dalam subgrup seperti AG1-IA yang menginfeksi padi, AG2-1 pada tembakau, AG-1- 1D yang menginfeksi kopi (Priyatmojo *et al.*, 2001) dan lain-lain.

Jamur *R. solani* dapat diidentifikasi dari karakter hifa yang khas, yaitu memiliki sekat, tidak memiliki sambungan apit atau *clamp connection*, tidak terdapat spora atau konidia, memiliki sel moniloid dan sudut percabangan yang tegak lurus yang membedakannya dengan jamur lain.

Firmansyah (2005) menjelaskan bahwa kondisi hifa *R. solani* yang bersifat multinukleat memberikan kemungkinan terbentuknya heterokariosis. Hal inilah

yang mengakibatkan jamur ini mempunyai variabilitas genetik yang sangat besar. Variabilitas yang besar berkaitan erat dengan patogenitas, daya tahan dalam tanah, juga ekobiologi jamur tersebut.

Penelitian mengenai variabilitas genetik jamur *R. solani* telah banyak dilakukan di berbagai negara dengan berbagai jenis inang, baik berdasarkan morfologi maupun molekuler. Di antaranya variabilitas genetik *R. solani* pada kentang dan tembakau di North Carolina menggunakan marka *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) (Ceresini *et al.*, 2002), variabilitas genetik *R. solani* yang menginfeksi rerumputan di USA menggunakan *Universally Primed PCR* (UP-PCR) (Amaradasa *et al.*, 2013), serta variabilitas *R. solani* AG-1- IE dan AG-1-IF dengan primer ITS (Gonzalez, 2012) dan lain lain.

***Rhizoctonia solani* AG1-IA dan Variabilitas Morfologinya**

Telah dijelaskan sebelumnya bahwa salah satu cara pengelompokan jamur *R. solani* adalah dengan melihat anastomosisnya. Berdasarkan beberapa penelitian, subgroup *R. solani* yang menyerang tanaman padi adalah jenis AG1-IA.

Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan Hamzah (2018), di mana sebanyak 50 isolat jamur yang diisolasi dari tanaman padi bergejala di beberapa daerah di Indonesia (Tabel 1), menunjukkan bahwa seluruh isolat tersebut merupakan jenis AG1-IA berdasarkan identifikasi molekulernya.

Tabel 1. Informasi kode dan daerah asal isolat

| Provinsi | Kabupaten | Kode Isolat |
|------------------|-----------|-------------|
| Sulawesi Selatan | Maros | MRS A2 |
| | | MRS A3 |
| | Pangkep | PKP A1 |
| | | PKP A2 |
| | Barru | BRU A1 |
| | | BRU A2 |
| | | BRU A3 |

| | | | | | | |
|------------------|--------------|-------------------------|--------------------------------------|--|--|--|
| D. I. Yogyakarta | Pare Pare | PAR A1 PAR A2 | | | | |
| | Soppeng | SPG A1 SPG A2 | | | | |
| | Sidrap | SDP A1 SDP A2 | | | | |
| | Gunung Kidul | GK A1 GK A2 GK A3 | | | | |
| | | Sleman | SLE A1 SLE A2 SLE A3 SLE B1 | | | |
| | | | Bantul | BAN A1 BAN A2 BAN A3 BAN B1 | | |
| | Kulonprogo | | | KP A3 KP A4 KP B1 KP B2 KP C1 KP D1 | | |
| | | Jawa Tengah | | Semarang | SMG A1 SMG A2 SMG A4 SMG A6 SMG A7 SMG A8 SMG B1 | |
| | | | | | Magelang | MAG A1 MAG A2 MAG B2 MAG C2 MAG C3 |
| | | | Klaten | | | KLA A1 KLA A3 KLA B1 KLA B3 KLA C1 KLA D1 KLA D2 KLA D3 |

Sebelum membahas mengenai aspek molekuler dari jamur ini, sebaiknya kita mengenal aspek morfologinya terlebih dahulu. Ada beberapa karakteristik utama pada hifa *R. solani* yang dapat diamati melalui mikroskop.

Karakteristik tersebut di antaranya hifa yang bersekat, tidak memiliki sambungan apit, tidak terdapat spora, dan adanya sel monilloid serta sudut percabangan yang tegak lurus. Hasil isolasi dari tanaman padi bergejala penyakit hawar pelepah didapatkan total 50 isolat jamur yang diduga *R. solani*. Sebanyak 13 isolat dari Provinsi Sulawesi Selatan, 17 isolat dari D.I Yogyakarta, 20 isolat dari Provinsi Jawa Tengah. Provinsi tersebut merupakan tiga dari sepuluh provinsi yang menjadi sentra produksi beras terbesar di Indonesia (BPS, 2011).

Identifikasi awal dilakukan berdasarkan karakter morfologi. Pengamatan lebih jauh secara mikroskopis menunjukkan bahwa kelima puluh isolat memiliki hifa dengan percabangan yang tegak lurus, mempunyai sekat, adanya sel monilioid, tidak ditemukan struktur reproduksi seksual dan tidak ada sambungan apit (*clamp connection*). Oleh karena itu, kelima puluh isolat yang telah diisolasi teridentifikasi sebagai *R. solani* berdasarkan karakter morfologinya.

Karakter morfologi tersebut ditunjukkan pada gambar 2 di bawah ini:



Gambar 2. Koloni *R. solani* secara makroskopis (kiri) dan mikroskopis (kanan). Sklerotia (a), sel monilioid (b), percabangan hifa (c) dan sekat (d) (Hamzah, 2018)

Jika dijabarkan lebih detail, maka karakteristik morfologi jamur *R. solani* dapat teramati secara kualitatif. Pengamatan kualitatif dilakukan setelah 15 hari inkubasi. Karakteristik yang diamati dari miselium yaitu warna depan dan belakang, kualitas aerial miselium, serta keberadaan hifa di bagian penutup petri.

Selain miselium, diamati pula delapan karakteristik sklerotia yang terbentuk berupa warna, bentuk, eksudat di permukaan sklerotia, keberadaan sklerotia di tutup cawan petri, kualitas, tipe serta pola dan kepadatan penyebaran sclerotia.

Hasil pengamatan dapat dijadikan acuan untuk melihat variabilitas morfologi *R. solani* dengan dianalisis menggunakan software NTSYS pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System) program UPGMA (unpaired group method of analysis) untuk dibuat dendrogram.

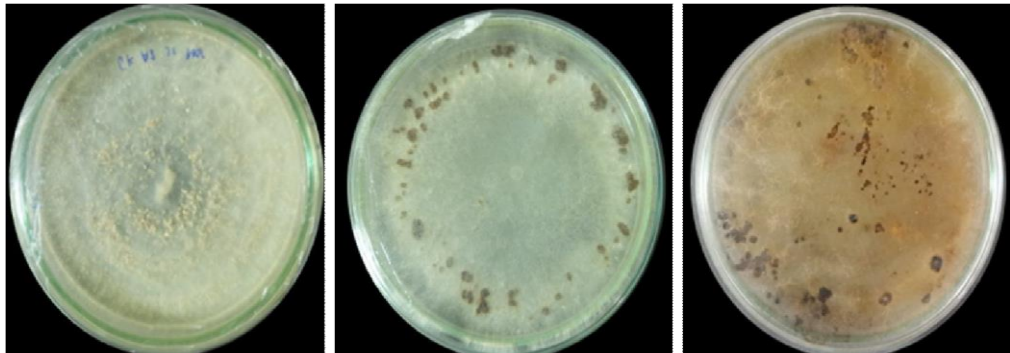
Setelah dilakukan inkubasi selama 15 hari, isolat jamur *R. solani* menunjukkan variabilitas yang cukup tinggi. Koloni isolat-isolat jamur tampak depan dan belakang memiliki lima ragam warna yaitu bening, krem, coklat muda, coklat dan cokelat tua. sebagian besar isolat berwarna krem dan coklat tampak depan, sedangkan tampak belakang berwarna krem dan cokelat muda. Seluruh isolat memiliki aerial miselium. Kualitas aerial miselium sebagian besar isolat terisi penuh dan tebal, serta ada di tutup cawan petri.

Sklerotia yang terbentuk juga memiliki variabilitas yang tinggi. Tipe sklerotia yang terbentuk pada isolat-isolat yang diamati ada tiga tipe yaitu tipe mikro, makro dan keduanya. Sedangkan warnanya beragam mulai dari krem, coklat muda, coklat hingga coklat tua. Bentuk sklerotia ada yang superfisial (dangkal) dan ada yang tidak beraturan dengan permukaan berbintik.

Pola penyebaran sklerotia dibedakan ke dalam kategori scattered (acak), centrally concentrated (terkumpul di tengah), concentrated at rim (berkumpul di

tepi), concentris rings (membentuk cincin) dan ring toward periphery (cincin di tepi).

Sedangkan kepadatannya dibedakan menjadi sparse (jarang) dan enourmous (padat) (Jayaprakashvel & Mathivanan, 2012). Contoh perbedaan morfologi *R. solani* dapat dilihat pada Gambar 3 di bawah ini:



Gambar 3. Perbedaan morfologi koloni *R. solani*. kiri ke kanan: GK A1, MAG B2 dan KP A3 (Hamzah, 2018)

Berdasarkan hasil penelitian, 27 isolat menghasilkan sklerotia tipe makro, 7 isolat menghasilkan tipe mikro, 15 menghasilkan keduanya dan 1 isolat tidak membentuk sklerotia yaitu KLA D3. Sebagian besar isolat memiliki tipe sklerotia makro, berwarna coklat, berbentuk tidak beraturan dengan permukaan berbintik serta memiliki eksudat di permukaannya.

Sklerotia juga terbentuk di bagian atas tutup cawan petri. Pola dan kepadatan penyebaran sklerotia juga beragam, namun sebagian besar tersebar acak dan jarang. Beberapa isolat juga menghasilkan sklerotia tipe mikro dimana pola dan kepadatan penyebarannya membentuk cincin di tengah dan padat.

Karakteristik morfologi tersebut selanjutnya dianalisis kluster menggunakan software NTSYS pc dengan program UPGMA menghasilkan dendrogram (Gambar 4).

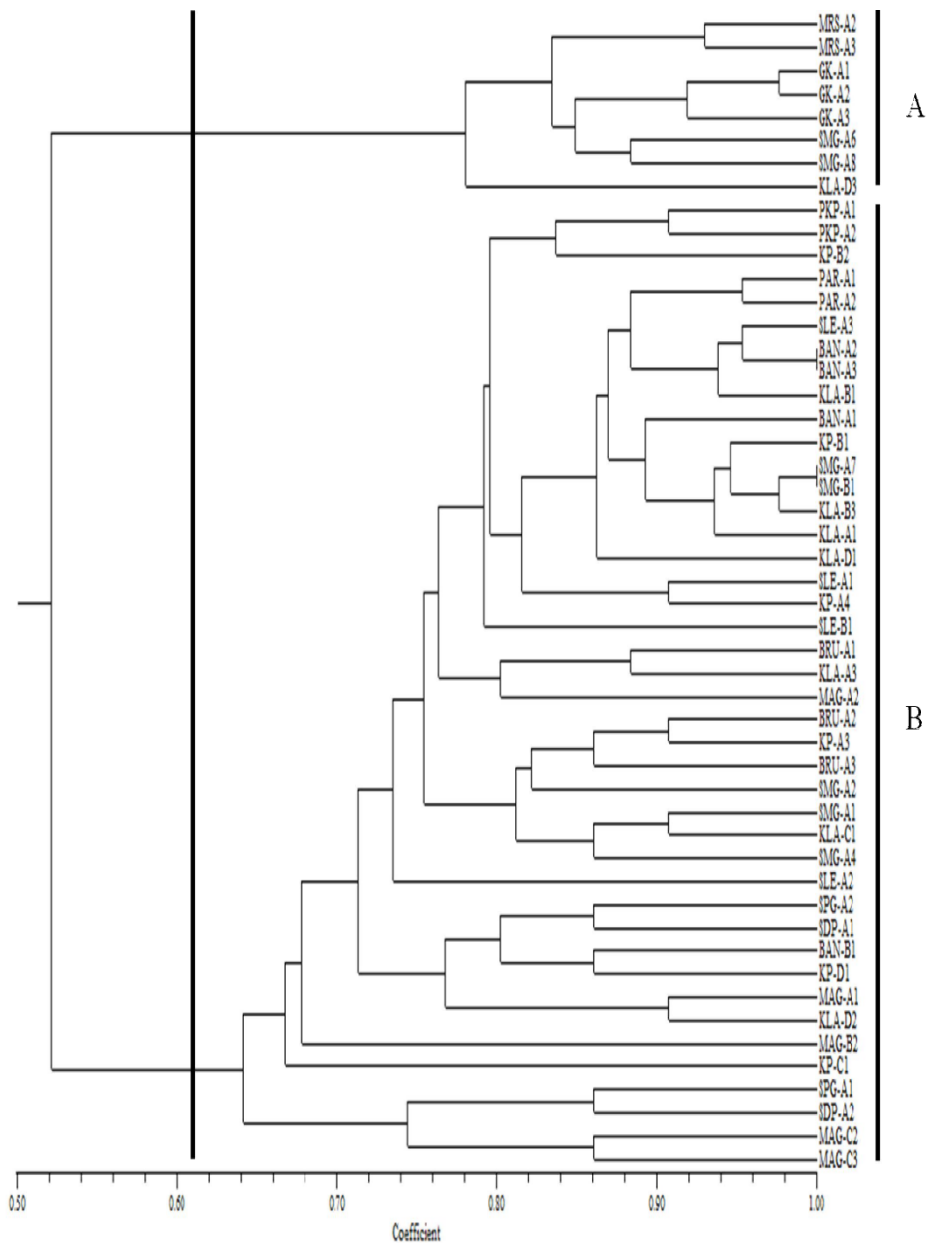
Dendrogram tersebut menunjukkan bahwa berdasarkan variabilitas morfologi koloni, 50 isolat *R. solani* AG1-IA terkelompok pada koefisien similaritas dengan kisaran 0,52-1,00. Semakin tinggi nilai koefisien similaritas maka semakin banyak pengelompokan yang terjadi.

Pengelompokan pada nilai koefisien similaritas sebesar 0,61 dapat mengelompokkan isolat *R. solani* menjadi dua klaster utama.

Kelompok A terdiri dari dua isolat yang berasal dari Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan; tiga isolat dari Gunung Kidul, D.I Yogyakarta; dua isolat dari Kabupaten Semarang, dan satu isolat dari Klaten, Jawa Tengah.

Sedangkan kelompok B terdiri dari 42 isolat lainnya. Berdasarkan morfologi, dua isolat yaitu BAN A2 dan BAN A3 dari Bantul serta isolat SMG A7 dan SMG B1 dari Semarang memiliki koefisien kesamaan 100%. Hal tersebut

mengindikasikan bahwa isolat tersebut ada kemungkinan merupakan isolat yang sama.



Gambar 4. Dendrogram variabilitas morfologi *R. solani* AG1-IA berdasarkan analisis kluster menggunakan software NTSYSpc dan metode kluster UPGMA pada koefisien similaritas 0,61

Selain pengamatan secara kualitatif, morfologi *R. solani* juga teramati secara kuantitatif berupa pengukuran diameter koloni, diameter hifa serta perhitungan laju pertumbuhan. Pengamatan kuantitatif mengikuti metode yang dilakukan Guleria et al (2007) dengan sedikit modifikasi. Isolat *R. solani* yang berumur tujuh hari dipotong bagian tepi menggunakan bor gabus ukuran 0,5 mm, kemudian dipindahkan ke tengah cawan petri yang berisi media PDA baru.

Diameter koloni diukur menggunakan penggaris setelah inkubasi 24, 48 dan 72 jam pada suhu 25°C. Laju pertumbuhan perhari dihitung berdasarkan nilai diameter koloni pada 72 jam dibagi jumlah hari pengamatan yaitu tiga hari.

Pengamatan tiap isolat dilakukan tiga kali ulangan kemudian dianalisis statistik ANOVA dengan uji lanjut DMRT dengan taraf kepercayaan 95% menggunakan software SPSS. Hifa diamati dengan mikroskop dan diameternya diukur menggunakan software *Optilab* dan *Imageraster*.

Hasil pengamatan pengukuran diameter koloni, laju pertumbuhan menunjukkan hasil yang beragam. Guleria *et al.* (2007), menggolongkan laju pertumbuhan jamur *R. solani* berdasarkan diameter koloni menjadi tiga grup, yaitu:

- Grup pertama yaitu isolat-isolat yang pertumbuhannya lambat dengan laju kurang dari 16 mm/hari.
- Grup kedua yaitu isolat yang pertumbuhannya sedang dengan laju antara 16-21 mm/hari.
- Grup ketiga yaitu isolat dengan pertumbuhan cepat ditandai dengan laju lebih dari 21 mm/hari.

Berdasarkan penggolongan tersebut, hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat pada penelitian ini terbagi menjadi tiga kelompok. Isolat MRS A2 dari Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan merupakan isolat dengan laju pertumbuhan

terendah yaitu sebesar 15,44 mm/hari sehingga digolongkan ke dalam grup pertama.

Isolat yang tergolong grup kedua dengan laju pertumbuhan sedang, teramati pada 7 isolat dengan laju pertumbuhan antara 18,00 dan 20,78 mm/hari. Isolat tersebut adalah MRS A3 dari Maros, GK A1, GK A2 dan GK A3 dari Kabupaten Gunung Kidul, D.I. Yogyakarta, SMG A6 dan SMG A8 dari Kabupaten Semarang serta KLA D3 dari kabupaten Klaten, Jawa Tengah.

Sebanyak 42 isolat lainnya digolongkan ke grup ketiga karena laju pertumbuhannya yang tinggi yaitu antara 27,22 dan 30 mm/hari. Sebanyak 25 dari 42 isolat yang tergolong grup 3 tersebut merupakan isolat dengan laju pertumbuhan tertinggi yaitu sebesar 30mm/hari. Hal tersebut dikarenakan miselium dari dua puluh lima isolat tersebut telah memenuhi permukaan media di cawan petri pada hari ke-3 atau setelah 72 jam.

Hasil pengamatan diameter hifa jamur *R. solani* yang telah diisolasi menunjukkan bahwa hifa jamur tersebut memiliki diameter antara 4,2 hingga 10,31 μm . Diameter hifa terkecil yaitu isolat MAG A2 dari kabupaten Magelang, Jawa Tengah dengan diameter 4,2 μm , sedangkan yang paling besar yaitu isolat PAR A1 dari Kabupaten Pare-Pare, Sulawesi Selatan dengan diameter 10,30 μm . Data diameter koloni, laju pertumbuhan dan diameter hifa disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Diameter koloni, laju pertumbuhan dan diameter hifa dengan tiga kali pengulangan, angka dengan huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata berdasarkan DMRT 5%

| No | Kode Isolat | Diameter koloni (mm) Setelah | | | Laju Pertumbuhan (mm/hari) | Diameter hifa (μm) |
|----|-------------|------------------------------|--------|--------|----------------------------|---------------------------------|
| | | 24 jam | 48 Jam | 72 Jam | | |
| 1 | MRS A2 | 15,67 | 26,33 | 46,33 | 15,44 ^a | 8,03 |
| 2 | MRS A3 | 14,67 | 32,00 | 54,00 | 18,00 ^{bc} | 7,13 |
| 3 | PKP A1 | 15,33 | 42,33 | 86,67 | 28,89 ^d | 7,37 |
| 4 | PKP A2 | 21,33 | 68,00 | 88,67 | 29,56 ^d | 8,33 |
| 5 | BRU A1 | 23,67 | 78,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,73 |
| 6 | BRU A2 | 17,33 | 58,00 | 88,33 | 29,44 ^d | 9,77 |

| | | | | | | |
|----|--------|-------|-------|-------|---------------------|------|
| 7 | BRU A3 | 22,00 | 79,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 8,53 |
| 8 | PAR A1 | 25,33 | 81,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 10,3 |
| 9 | PAR A2 | 27,67 | 74,67 | 88,33 | 29,44 ^d | 8,06 |
| 10 | SPG A1 | 36,67 | 82,33 | 88,33 | 29,44 ^d | 7,30 |
| 11 | SPG A2 | 22,67 | 73,67 | 89,00 | 29,67 ^d | 6,47 |
| 12 | SDP A1 | 23,67 | 82,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 8,90 |
| 13 | SDP A2 | 35,00 | 89,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 9,13 |
| 14 | GK A1 | 15,00 | 39,33 | 59,67 | 19,89 ^{bc} | 5,30 |
| 15 | GK A2 | 17,33 | 39,33 | 56,33 | 18,78 ^{bc} | 6,67 |
| 16 | GK A3 | 14,33 | 37,00 | 55,00 | 18,33 ^{bc} | 7,33 |
| 17 | SLE A1 | 19,33 | 53,67 | 87,00 | 29,00 ^d | 6,63 |
| 18 | SLE A2 | 23,67 | 78,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,03 |
| 19 | SLE A3 | 24,33 | 62,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 7,13 |
| 20 | SLE B1 | 26,67 | 73,33 | 88,33 | 29,44 ^d | 5,70 |
| 21 | BAN A1 | 31,67 | 86,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 7,63 |
| 22 | BAN A2 | 30,00 | 82,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,83 |
| 23 | BAN A3 | 19,00 | 45,33 | 86,00 | 28,67 ^d | 7,90 |
| 24 | BAN B1 | 19,33 | 55,00 | 86,33 | 28,78 ^d | 9,10 |
| 25 | KP A3 | 24,67 | 76,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 8,63 |
| 26 | KP A4 | 26,67 | 79,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,77 |
| 27 | KP B1 | 25,00 | 74,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 5,27 |
| 28 | KP B2 | 21,00 | 71,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 7,26 |
| 29 | KP C1 | 29,33 | 78,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 9,87 |
| 30 | KP D1 | 21,33 | 67,67 | 86,67 | 28,89 ^d | 8,57 |
| 31 | SMG A1 | 23,33 | 76,33 | 88,33 | 29,44 ^d | 7,23 |
| 32 | SMG A2 | 16,67 | 65,33 | 86,67 | 28,89 ^d | 5,13 |
| 33 | SMG A4 | 21,67 | 69,33 | 88,33 | 29,44 ^d | 9,37 |
| 34 | SMG A6 | 17,67 | 42,00 | 62,33 | 20,78 ^c | 5,36 |
| 35 | SMG A7 | 15,67 | 72,00 | 81,67 | 27,22 ^d | 7,00 |
| 36 | SMG A8 | 13,33 | 32,00 | 55,33 | 18,44 ^{bc} | 6,60 |
| 37 | SMG B1 | 30,67 | 81,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 7,80 |
| 38 | MAG A1 | 20,67 | 80,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,63 |
| 39 | MAG A2 | 31,67 | 82,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 4,20 |
| 40 | MAG B2 | 18,67 | 40,67 | 82,00 | 27,33 ^d | 4,73 |
| 41 | MAG C2 | 25,00 | 74,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,00 |
| 42 | MAG C3 | 13,67 | 57,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,00 |
| 43 | KLA A1 | 22,67 | 58,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 5,20 |
| 44 | KLA A3 | 16,33 | 42,67 | 81,67 | 27,22 ^d | 7,03 |
| 45 | KLA B1 | 23,33 | 74,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 4,86 |
| 46 | KLA B3 | 32,33 | 73,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 6,63 |
| 47 | KLA C1 | 16,33 | 71,33 | 90,00 | 30,00 ^d | 7,80 |
| 48 | KLA D1 | 28,33 | 76,00 | 90,00 | 30,00 ^d | 4,70 |
| 49 | KLA D2 | 28,33 | 74,67 | 90,00 | 30,00 ^d | 5,80 |

Klaster A terdiri dari isolat yang menghasilkan sklerotia tipe mikro dan isolat yang tidak menghasilkan sklerotia sedangkan klaster B terdiri dari isolat yang menghasilkan tipe makro dan atau keduanya.

Berdasarkan dendrogram tersebut terlihat pula bahwa isolat yang berasal dari provinsi yang sama, belum tentu memiliki karakter morfologi yang sama pula sebab isolat dari ketiga provinsi, tersebar di kedua klaster. Bahkan isolat yang berasal dari kabupaten yang sama, belum tentu memiliki karakter morfologi yang sama pula. Misalnya isolat yang berasal dari Semarang dan Klaten, dengan kode SMG dan KLA yang tersebar di kedua klaster.

Berdasarkan dendrogram tersebut dapat dikatakan bahwa variabilitas morfologi terutama tipe sklerotia berkorelasi dengan laju pertumbuhan, namun variabilitas morfologi pada *R. solani* tidak selalu sesuai dengan daerah geografis asal isolat tersebut.

Hal serupa dikemukakan oleh Singh *et al.* (1999) yang menyatakan tidak ada hubungan antara isolat dengan lokasi geografi. Isolat yang dikumpulkan dari lokasi tertentu tidak terkelompok ke dalam klaster yang sama berdasarkan morfologi dan patologinya. Bintang *et al.* (2017) juga menyatakan bahwa isolat *R. solani* dapat menunjukkan variasi morfologi bahkan yang berasal dari inang yang sama.

Elektroforesis gel agarose adalah metode analisis semi kuantitatif untuk mengetahui hasil isolasi DNA. Hasil analisis yang ditampilkan berupa visualisasi pita pada ukuran basepair (bp) tertentu.

4

Metode Isolasi DNA Jamur

Sebelum membahas analisis molekuler, ada baiknya kita terlebih dahulu mengenal metode isolasi jamur dan isolasi DNA-nya, dalam hal ini jamur *R. solani*.

Pada penelitian Hamzah (2018), jamur *R. solani* diisolasi dari tanaman bergejala hawar pelepah padi, yang dikumpulkan dari beberapa sawah di tiga belas kabupaten yang tersebar di tiga provinsi yaitu Sulawesi Selatan, D.I Yogyakarta dan Jawa Tengah.

Pelepah yang menunjukkan gejala di sawah diambil dengan alat pemotong seperti pisau atau gunting, kemudian dikemas dengan baik untuk dibawa ke laboratorium untuk segera dianalisis. Di Laboratorium, isolasi jamur dilakukan secara aseptik, untuk menghindari adanya kontaminasi jamur lain selain target maupun mikroorganisme lainnya seperti bakteri.

Bagian pelepah dipotong seukuran 15 mm dengan mengambil setengah bagian yang bergejala, dan yang setengah bagian lagi tidak bergejala atau sehat. Kemudian direndam dalam larutan NaOCl 1% selama 1 menit, lalu dipindahkan ke alkohol 70% selama 1 menit, kemudian dibersihkan dengan akuades steril dua kali dengan perendaman masing-masing 1 menit lalu dikeringkan di atas tisu steril dan terakhir diletakkan di atas cawan petri yang sudah berisi media *Potato Dextrose Agar* (PDA) steril.



Gambar 5. Proses isolasi jamur dilakukan secara aseptik menggunakan Bunsen Sumber gambar: Youtube.com

Setelah tiga hari, perhatikan media, jika sudah tampak hifa, pindahkan sebagian kecil menggunakan bos gabus ke media PDA lainnya. Dilakukan seperti itu hingga mendapatkan koloni *R. solani* yang murni untuk selanjutnya dilakukan isolasi DNA.

Masih dengan menggunakan bor gabus, jamur yang tumbuh di PDA padat dipindahkan ke media cair. Perbanyak isolat dilakukan pada media cair yaitu media potato dextrose broth (PDB). Isolat sebanyak 0,5 g yang telah ditumbuhkan selama 5-7 hari dalam media PDB disaring dengan kertas saring, kemudian digerus dengan N_2 cair hingga halus, lalu ditambahkan 700 μ L CTAB 2%.

Ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam tube 1,5 mL lalu diinkubasi di waterbath 65°C selama 30 menit, setiap 10 menit digojog selama 1 menit. Selanjutnya disentrifugasi 5000 rpm selama 5 menit, lalu diambil supernatannya, dipindahkan ke tube baru lalu tambahkan *Chloro Isoamyl Alcohol* (CIAA) hingga penuh, lalu disentrifugasi 12.000 rpm selama 10 menit.

Lapisan teratas dipindahkan ke tube baru, lalu ditambah alkohol absolut hingga separuh tabung. Disimpan di dalam kulkas -20°C sepanjang malam. Selanjutnya disentrifugasi 12.000 rpm selama 1 menit. Supernatan dibuang lalu ditambah alkohol 70% hingga tabung penuh.

Lalu gojog 1-3 menit. Kemudian disentrifugasi kembali 12.000 rpm 10 menit. Alkohol 70% dibuang, pelet dikeringanginkan di LAF, lalu dilarutkan dengan buffer TE 10-50 μL dan disimpan pada suhu -20°C untuk digunakan dalam analisis selanjutnya (Subandiyah, 2003).

Untuk mengecek kemurnian DNA yang telah diisolasi, bisa menggunakan alat berupa spektrofotometer atau nanodrop. DNA murni hasil isolasi dilihat nilai absorbansinya pada panjang gelombang 260 nm, di mana DNA menyerap cahaya paling kuat.

Perhitungan kemurnian yang paling umum adalah dengan menentukan rasio absorbansi dari panjang gelombang 260 nm dibagi dengan absorbansi dari panjang 280 nm atau A_{260}/A_{280} . DNA dikatakan murni jika rasionya berkisar 1,8-2,0. Jika nilai rasio A_{260}/A_{280} kurang dari 1,8, berarti isolat DNA yang dihasilkan masih mengandung kontaminan seperti fenol atau pelarut yang digunakan terlalu banyak. Sedangkan jika melebihi 2,0 kemungkinan DNA yang diisolasi masih terkontaminasi protein.

Selain itu, uji kemurnian juga dapat dicek menggunakan visualisasi hasil elektroforesis. Semakin jelas pita yang terlihat, semakin murni DNA tersebut. Namun jika terdapat smear, maka kemungkinan DNA yang telah diisolasi masih memiliki kontaminan yang konsentrasinya cukup besar.

Saat ini, semakin berkembangnya teknologi, isolasi DNA genom suatu organisme semakin dimudahkan dengan adanya berbagai jenis dan merk kit atau alat dan bahan bantu yang lengkap dan siap pakai. Penggunaan kit dapat

menghasilkan DNA genom yang lebih murni dan tentunya lebih mengefisienkan waktu kerja di laboratorium. Namun kekurangannya, biasanya harga kit terbilang cukup mahal.

”

Ada banyak sekali jenis primer yang bisa digunakan untuk analisis molekuler berbasis PCR. Bahkan jika diketahui genomnya, kita bisa mendesain sendiri primer yang ingin digunakan dengan bantuan berbagai jenis bioinformatic tools yang semakin berkembang.

”

5

Aspek Molekuler *Rhizoctonia solani* AG1-IA

Metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) merupakan teknik kunci dalam analisis molekuler. Metode ini digunakan untuk melipatgandakan (amplifikasi) potongan DNA dalam waktu singkat secara *in vitro* dan hanya menggunakan sedikit dari potongan DNA untuk analisis, sehingga memiliki efisiensi yang sangat tinggi dalam menggandakan potongan DNA tertentu dalam jumlah besar (Bintang, 2010).

Kegunaan tersebut membuat PCR menjadi salah satu teknik yang paling utama digunakan oleh para peneliti bidang biologi molekuler.

Komponen-komponen lain yang dibutuhkan selain DNA cetakan yang akan digandakan diantaranya enzim taq DNA polimerase, primer, *deoxynucleoside triphosphate* (dNTP), buffer dan ion Mg^{2+} .

Tahapan reaksi PCR terdiri atas tahap pra-denaturasi (*pre-denaturation*), kemudian 3 tahapan berulang yaitu denaturasi, tahap penempelan (*annealing*), tahap pemanjangan (*extention*) dan diakhiri tahap post extention. PCR banyak diaplikasikan untuk berbagai macam kebutuhan, seperti identifikasi, isolasi gen, DNA *sequencing*, DNA *fingerprinting*, forensik, dan dignostik (Weissensteiner, 2003).

Hasil PCR divisualisasikan dengan menggunakan elektroforesis agarose dan lampu UV. Elektroforesis merupakan teknik pemisahan suatu molekul dalam suatu

campuran di bawah pengaruh medan listrik. Molekul terlarut dalam medan listrik bermigrasi dengan kecepatan yang ditentukan oleh rasio muatan dan massa. Elektroforesis ini merupakan metode standar untuk pemisahan, identifikasi dan pemurnian DNA.

Media rambat yang digunakan adalah agarosa maupun poliakrilamid. Selanjutnya gel agarose divisualisasi menggunakan lampu UV sehingga terlihat pita DNA dengan jumlah pita dan ukuran tertentu.

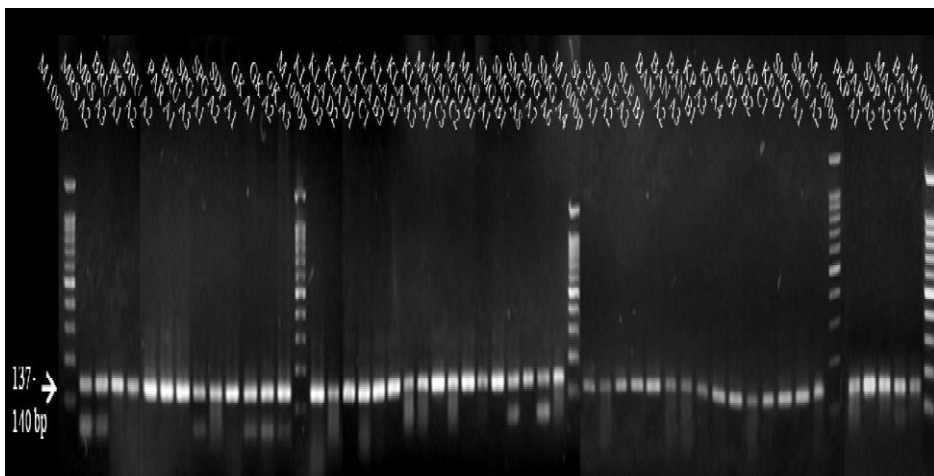
Identifikasi molekuler menjadi hal penting yang bisa dilakukan untuk mengkonfirmasi bahwa jamur yang telah diisolasi adalah benar termasuk dalam sub grup anastomosis AG1-IA.

Pada penelitian Hamzah, (2018) digunakan primer yang mengacu pada penelitian Sayler & Yang (2007). Detail metode amplifikasi DNA genom hasil isolasi menggunakan PCR yaitu dengan komponen berupa 2 µl template DNA genom masing-masing isolat, 2 µl masing-masing primer, dengan primer spesifik *R. solani* AG1-IA Rs1F (*forward*) (5'-GCCTTTTCTACCTTAATTTGGCAG-3') dan Rs2R (*reverse*) (5'-GTGTGTAAATTAAGTAGACAGCAAATG-3'), 12.5µl mix PCR, dan ddH₂O hingga volume campuran menjadi 25 µl pada tube 0,2 ml. Reaksi PCR dilakukan dengan prosedur predenaturasi 95°C selama 15 menit, 40 siklus denaturasi 95°C selama 15 detik, penempelan 52°C selama 30 detik, pemanjangan 72°C selama 15 detik, dan pemanjangan akhir 72°C selama 5 menit (Sayler & Yang, 2007).

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 1,5%. Untuk membuat gel agarose 1,5% ditimbang sebanyak 0,6 gr kemudian dilarutkan dengan 40 mL TBE 1x. Larutan dipanaskan hingga mendidih. Setelah hangat ditambahkan 5 µl SYBRsafedye kemudian dikocok hingga rata. Larutan dituang ke dalam cetakan elektroforesis kemudian ditunggu hingga beku.

Setelah membeku gel agarose dan cetakannya dimasukkan ke dalam tray kemudian ditambahkan buffer TBE hingga gel agarose terendam. Sebanyak 4-6 μ l produk PCR dicampur dengan 1 μ l loading dye pada parafilm kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel agarose. Selanjutnya dilakukan running elektroforesis dengan tegangan 100 volt selama 30 menit. Setelah 30 menit, gel agarose diambil dari chamber untuk divisualisasi dengan lampu UV lalu diamati apakah ada pita yang terbentuk pada ukuran 137-140 bp (Sayler & Yang, 2007). Ladder 100 bp digunakan sebagai marka ukuran amplikon.

Berdasarkan hasil amplifikasi tersebut, dapat dikonfirmasi bahwa seluruh isolat yang dikumpulkan pada penelitian tersebut merupakan *R. solani* subgroup AG1-IA. Hal tersebut dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Visualisasi hasil amplifikasi dengan primer spesifik *R. solani* AG1-IA

Hasil elektroforesis menunjukkan bahwa kelima puluh isolat menghasilkan pita DNA pada ukuran 137-141bp (Gambar 6). Berdasarkan hasil tersebut dapat dikatakan bahwa seluruh isolat merupakan *R. solani* subgrup AG1-IA.

Menurut Jayaprakashvel & Mathivanan (2012), *R. solani* penyebab hawar pelepah pada padi diklasifikasi ke dalam subgrup AG1-IA sehingga untuk

identifikasi, digunakan primer spesifik *R. solani* AG1-IA. Sayler & Yang (2007) mendesain primer Rs1F dan Rs2R yang spesifik terhadap *R. solani* AG1-IA.

Primer tersebut didesain berdasarkan perbedaan sekuen 18-28S ribosomal DNA (r)DNA daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) pada *R. solani* AG1-IA dengan sekuen *R. oryzae*, *R. oryzae sativa* dan *R. solani* yang tergolong subgrup lain. Pita hasil PCR untuk subgrup AG1-IA akan tampak pada ukuran 137-141 bp sedangkan selain *R. solani* AG1-IA tidak membentuk pita DNA (Syler & Yang, 2007).

Variabilitas Molekuler *Rhizoctonia solani* AG1-IA

Setiap mikroorganisme memiliki sekuen berulang (*repetitive sequence*) dengan jumlah dan ukuran yang sangat bervariasi yang secara alami tersebar secara acak pada kromosom. Sekuen repetitif inilah yang dapat digunakan sebagai dasar sidik jari DNA (*DNA fingerprinting*).

Sidik jari DNA merupakan suatu teknologi DNA untuk melihat keragaman individu, dapat untuk membedakan individu yang dekat kekerabatannya sekalipun (Farida, 2009). Rep-PCR adalah metode amplifikasi fragmen DNA dengan menggunakan primer yang berkomplemen dengan sekuen berulang yang terdapat pada bakteri (Lisek *et al.*, 2011). Primer rep-PCR berupa BOXA1R, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*-PCR (ERIC-PCR) dan *Repetitive Extragenic Palindromic*-PCR (REP-PCR) awalnya didesain untuk mengamplifikasi sekuen tertentu yang berulang pada genom prokaryot namun ternyata primer tersebut mampu mengkarakterisasi isolat eukaryot seperti jamur.

Rep-PCR sering digunakan sebagai salah satu metode penapisan (*screening*) awal isolat-isolat yang tidak beraturan dengan pola amplifikasi yang berbeda. Pola amplifikasi yang berbeda ini mengindikasikan variabilitas genetik.

Penapisan biasanya dilakukan sebelum identifikasi lebih lanjut seperti sekuensing gen 16S rRNA pada bakteri atau sekuen internal transcribed spacer (ITS) pada jamur. Metode Rep-PCR ini mampu membedakan isolat hingga tingkatan spesies, subspecies dan strain. Prosedur ini cukup sensitif, mudah digunakan dan dapat diaplikasikan terhadap strain yang banyak (Farida, 2009; Pathomaree, 2006).

Beberapa jamur patogen yang telah analisis secara molekuler menggunakan Rep-PCR diantaranya *Magnaporthe grisea*, *Leptosphaeria maculans*, *Stemphylium solani* (George *et al.*, 1998; Jedryczka *et al.*, 1999; Mehta *et al.*, 2002), termasuk analisis variabilitas *R. solani* penyebab penyakit hawar pelepah padi asal India, Myanmar, Jepang dan Vietnam (Toda *et al.*, 1999; Linde *et al.*, 2005; Aye, 2010; Matsumoto, 2013; Matsumoto & Cuong, 2014).

Pada penelitian Hamzah (2018), Variabilitas genetik dengan Rep-PCR menggunakan primer BOXAIR (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') dan ERIC2 (5-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') secara terpisah. Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan PCR dengan komponen mix sebanyak 25 µl yang terdiri atas 2µl masing-masing DNA template, 12,5µl mix PCR, dan ddH₂O hingga volume campuran menjadi 25µl pada tube PCR 0,2ml.

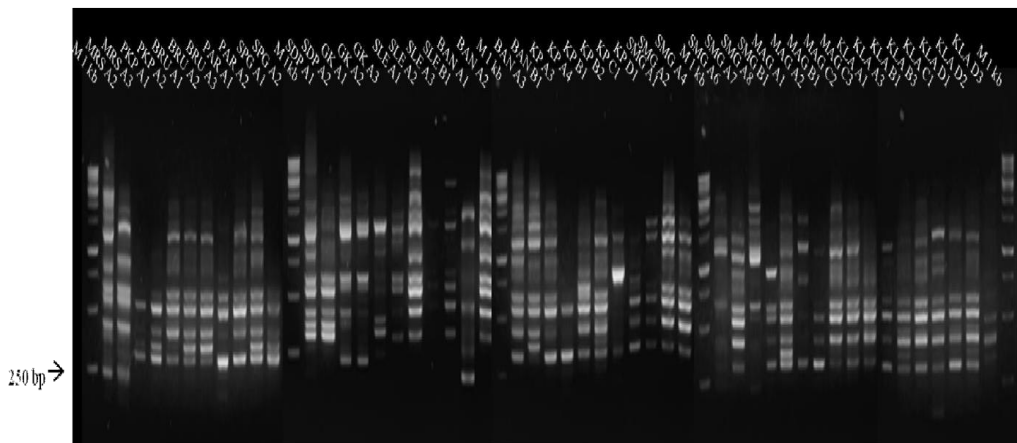
Amplifikasi dilakukan dengan mengacu pada Aye & Matsumoto (2010) yaitu predenaturasi 95°C selama 7 menit, diikuti 30 siklus denaturasi 94°C selama 1 menit, penempelan 52°C selama 1 menit dan pemanjangan 72°C selama 8 menit, dilanjutkan dengan pemanjangan akhir 72°C selama 16 menit. Selanjutnya produk PCR dielektroforesis di gel agarose 1,5%, dengan tegangan 100 V, selama 30 menit kemudian diamati di sinar UV.

Pita DNA yang terbentuk kemudian digunakan untuk tes perbandingan kesamaan (*similarity comparison tests*). Pola pita yang muncul dianalisis dengan

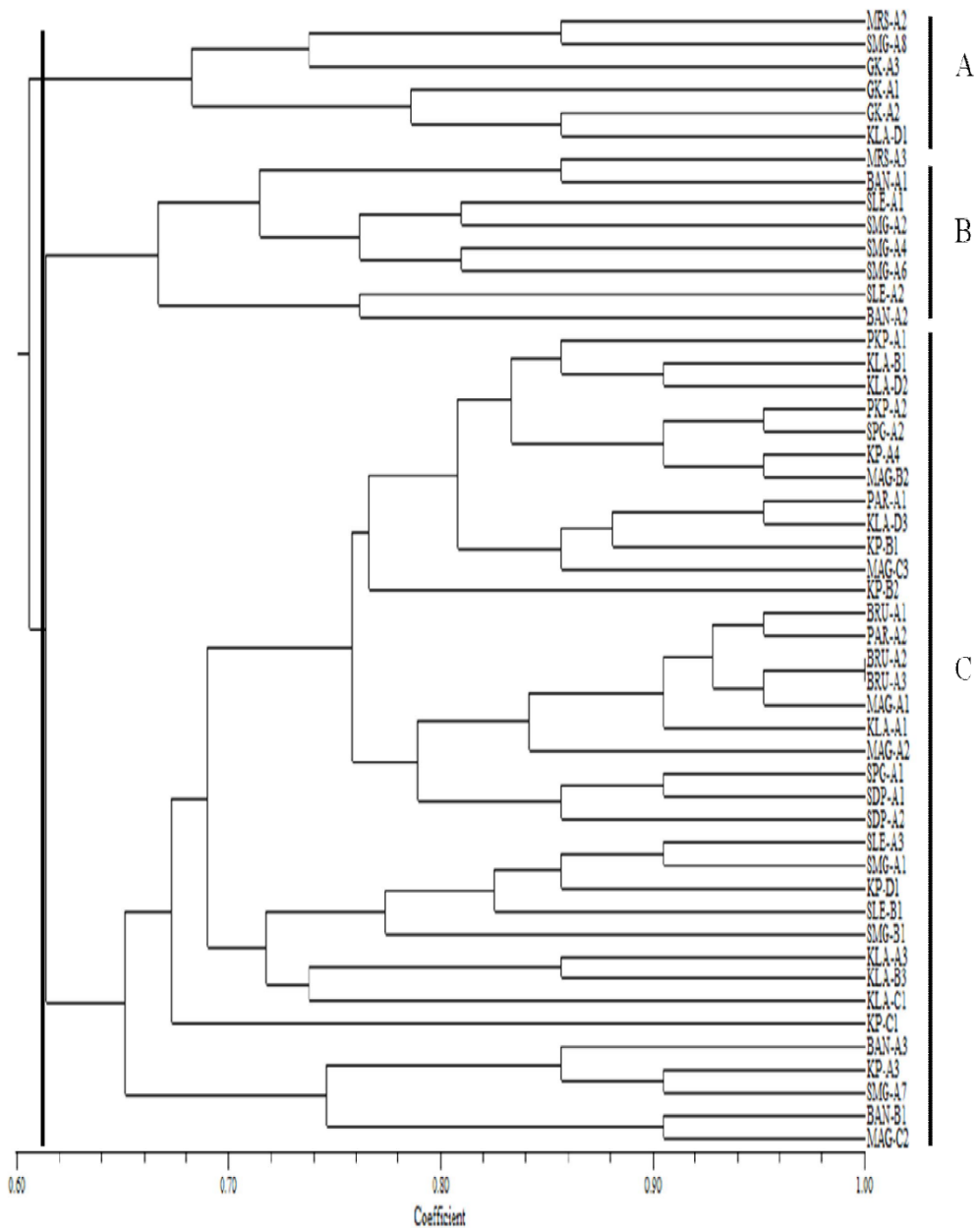
software GelAnalyzer2010 untuk menentukan ukuran tiap pita DNA yang terbentuk, lalu diterjemahkan ke dalam data biner dengan scoring.

Selanjutnya diolah menjadi dendrogram atau disebut dengan pohon filogenetik dengan menggunakan software *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* (NTSYS pc) dengan program *Unpaired Group Method Of Analysis* (UPGMA) untuk dibuat hirarki klasteringnya (Aye & Matsumoto, 2010).

Berdasarkan elektroforesis hasil PCR menggunakan primer BOXA1R, menunjukkan bahwa setiap isolat menghasilkan tiga hingga sebelas pita DNA. Terdapat 21 jenis pita DNA berdasarkan ukurannya yang berkisar antara ± 165 bp hingga ± 2787 bp. Hasil amplifikasi menggunakan primer BOXA1R ditampilkan pada Gambar 7. Pola pita DNA yang didapat dari hasil elektroforesis tersebut dianalisis kluster menggunakan software NTSYS dengan program UPGMA untuk dibuat dendrogram (Gambar 8).



Gambar 7. Hasil amplifikasi 50 isolat *R. solani* AG1-IA dari Provinsi Sulawesi Selatan, DI Yogyakarta dan Jawa Tengah menggunakan primer BOXA1R



Gambar 8 Dendrogram hasil analisis kluster lima puluh isolat *R. solani* AG1-IA berdasarkan primer BOXA1R pada koefisien similaritas 0,61

Menurut Nur *et al.* (2017) kisaran koefisien similaritas genetik yang besar menunjukkan variabilitas yang tinggi karena seluruh genotipe yang diuji menyebar dari rendah hingga tinggi.

Berdasarkan dendrogram hasil amplifikasi dengan primer BOXA1R tersebut, lima puluh isolat *R. solani* AG1-1A terkelompok pada koefisien similaritas dengan kisaran 0,61-1,00. Semakin tinggi nilai koefisien similaritas maka semakin banyak pengelompokan yang terbentuk. Pengelompokan pada nilai koefisien similaritas sebesar 0,61 mengelompokkan isolat *R. solani* menjadi tiga klaster utama.

Klasterisasi menunjukkan bahwa variasi genetik berdasarkan primer BOXA1R tidak selalu sesuai dengan letak geografis asal isolat, baik provinsi maupun kabupaten asal. Seluruh isolat tersebar secara acak di semua klaster. *R. solani* yang berasal dari provinsi bahkan kabupaten yang sama tidak selalu terkelompokkan ke dalam klaster yang sama secara genetik berdasarkan primer BOXA1R.

Isolat pada klaster A berdasarkan dendrogram menggunakan primer BOXA1R menunjukkan ada sedikit kesamaan dengan isolat pada klaster A berdasarkan dendrogram morfologi. Lima dari enam isolat pada klaster A berdasarkan primer BOXA1R merupakan isolat yang ada di klaster A berdasarkan morfologi.

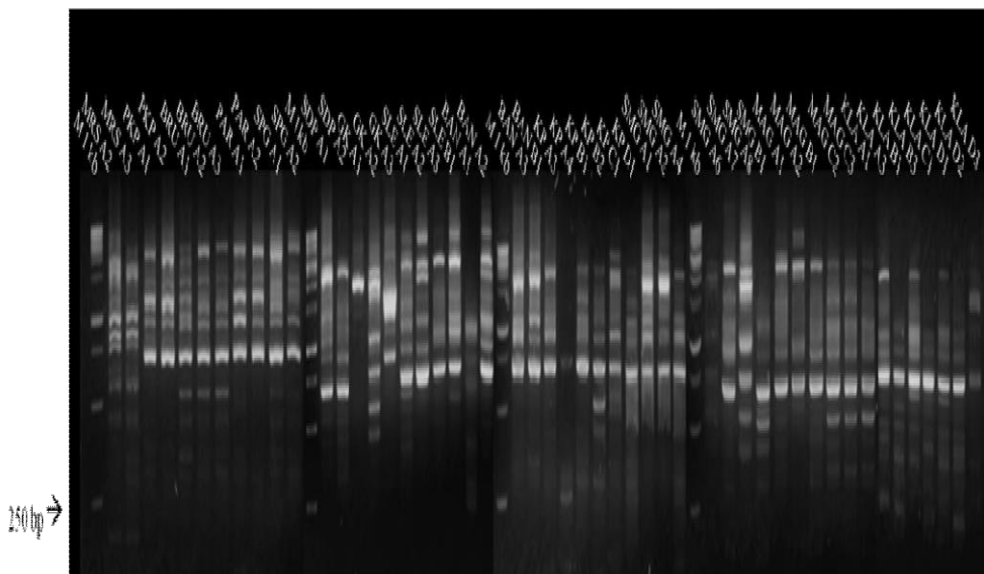
Isolat tersebut adalah MRS A2, SMG A8, GKA1, GKA2 dan GKA3 secara berurutan berasal dari Kabupaten Maros, Semarang dan Gunung Kidul. Hanya isolat KLA D1 yang tidak ada pada klaster A berdasarkan morfologi.

Pada Klaster C terdapat isolat yang berdasarkan pola pita DNA memiliki koefisien similaritas 100% yaitu BRU A2 dan BRU A3. Hal tersebut dapat mengindikasikan bahwa isolat tersebut kemungkinan adalah sama, namun tidak demikian pada klasterisasi berdasarkan morfologi. Hal tersebut mengindikasikan bahwa meski secara genetik kemungkinan sama, morfologi yang ditampilkan bisa berbeda.

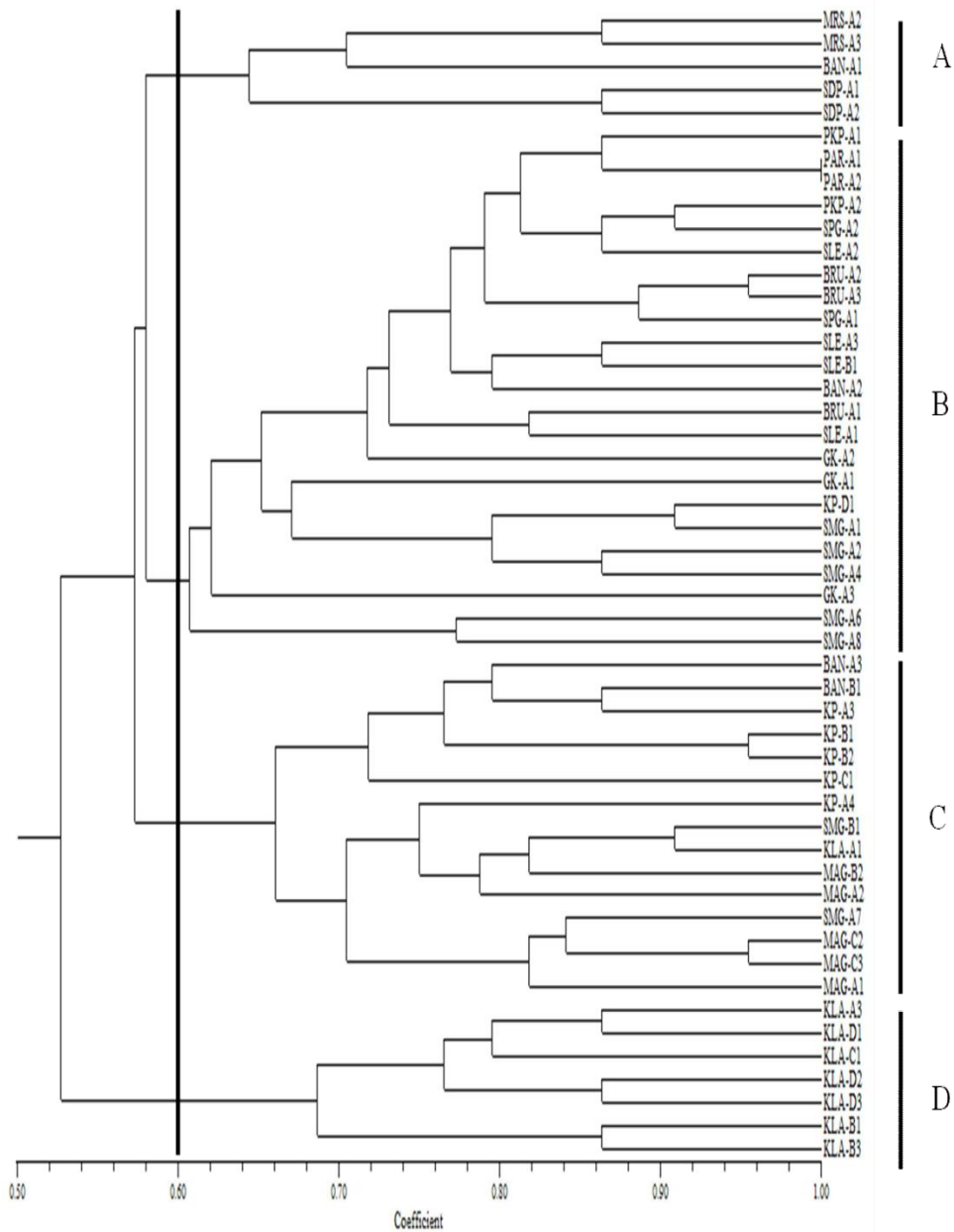
Karakter morfologi adalah karakter yang dihasilkan dari ekspresi genetik, namun selain itu juga dipengaruhi oleh keadaan lingkungan sehingga karakter morfologi bisa sangat bervariasi (Singh *et al.*, 2015).

Analisis variabilitas genetik *R. solani* AG1IA juga dilakukan dengan menggunakan primer ERIC2. Elektroforesis hasil PCR dengan primer ERIC2 menunjukkan bahwa setiap isolat terbentuk dua hingga sembilan pita DNA.

Terdapat 20 jenis pita DNA berdasarkan ukurannya yang berkisar antara ± 200 bp hingga ± 2750 bp (Gambar 9). Selanjutnya pita-pita DNA tersebut juga dianalisis kluster dengan software NTSYS hingga terbentuk dendrogram (Gambar 10).



Gambar 9. Hasil amplifikasi 50 isolat *R. solani* AG1-IA dari Provinsi Sulawesi Selatan, DI Yogyakarta dan Jawa Tengah menggunakan primer ERIC2



Gambar 10. Dendrogram hasil analisis kluster lima puluh isolat *R. solani* AG1-IA berdasarkan primer ERIC2 pada koefisien similaritas 0,60

Hasil analisis kluster menunjukkan bahwa seluruh isolat terkelompok pada koefisien similaritas dengan kisaran 0,52-1,00. Pada nilai similaritas 60% terbagi menjadi empat kluster utama. Jika dibandingkan dengan persebaran daerah asal

isolat, dendrogram berdasarkan primer ERIC2 ini menunjukkan bahwa isolat yang berasal dari kabupaten yang sama, cenderung terkelompok dalam satu klaster.

Sebagian besar isolat dari Kabupaten di Sulawesi Selatan tergabung ke dalam klaster A dan B, isolat dari kabupaten Semarang tergabung dalam klaster B dan C. Isolat dari kabupaten Magelang tergabung dalam klaster C, isolat dari Kabupaten Klaten tergabung dalam klaster D. Isolat dari provinsi D. I Yogyakarta tersebar di klaster A, B dan C.

Variabilitas genetik menggunakan primer ERIC2 juga tidak sesuai dengan variabilitas morfologi. Pada klaster B berdasarkan primer ERIC2, isolat PAR A1 dan PAR A2 dari Kabupaten Pare-Pare, Sulawesi Selatan memiliki koefisien similaritas sebesar 100%. Namun tidak demikian pada pengelompokan berdasarkan morfologi.

Hal tersebut berarti pengelompokan secara genetik menggunakan primer ERIC2 tidak selalu sesuai dengan pengelompokan berdasarkan morfologi.

Morfologi merupakan sifat fenotipe yang terlihat sebagai hasil dari ekspresi genotipe. Morfologi yang beragam menggambarkan sifat genetik yang beragam pula. Namun perbedaan pengelompokan secara morfologi dan genetik juga dapat dipengaruhi oleh keadaan lingkungan sehingga karakter morfologi menjadi sangat bervariasi (Singh, 2015).

Hasil klasterisasi menggunakan primer ERIC2 dan BOXA1R menampilkan pola berbeda dan tidak menunjukkan korelasi hal ini disebabkan perbedaan daerah yang diamplifikasi oleh kedua primer tersebut.

Primer BOXA1R dan ERIC2, telah banyak digunakan dalam mengkarakterisasi isolat *R.solani*., Matsumoto (2013) menggunakan primer BOXA1R dan ERIC2 untuk menganalisis distribusi dan struktur populasi *R. solani* AG1-IA di Jepang. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa *R. solani* AG1-

IA terbagi menjadi empat variasi genotipe yang berkorelasi dengan tinggi dataran lokasi pengambilan sampel.

Primer ERIC2 dan BOXA1R memiliki keunggulannya masing-masing. Primer ERIC2 menghasilkan pola pita DNA yang lebih sederhana sedangkan primer BOXA1R memiliki pita yang lebih jelas dan menghasilkan pita lebih banyak namun keduanya dapat digunakan dalam karakterisasi *R. solani* (Aye & Matsumoto 2010; Matsumoto *et al.*, 2013).

Rep-PCR baik ERIC2 maupun BOXA1R memiliki persentase polimorfisme yang lebih besar dan lebih efisien dibanding teknik lain seperti ISSR dan RAPD (Toda *et al.*, 1999; Khodayari *et al.*, 2009).

Suhu annealing yang tinggi, sekuen primer yang cukup panjang, membuat penanda yang dihasilkan oleh Rep-PCR lebih tahan, reproduisibel dan spesifik daripada ISSR PCR (Kang *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2005).

Analisis variabilitas morfologi dan genetik juga dilakukan oleh Moni *et al.* (2016), dimana variabilitas genetik isolat *R. solani* dari Bangladesh menggunakan AFLP tidak memiliki korelasi dengan variabilitas morfologinya.

Begitu juga dengan penelitian Lal *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa variabilitas genetik menggunakan primer RAPD tidak berkorelasi secara langsung dengan variabilitas morfologi, namun diduga berkaitan dengan virulensi jamur *R. solani*. Mishra *et al.* (2014), menyatakan bahwa adanya korelasi antara ukuran sklerotia dengan virulensi patogen. semakin besar sklerotia yang dihasilkan, semakin besar nilai insidensinya..

Hal yang serupa juga dikemukakan oleh Basu *et al.* (2004) bahwa ukuran dan jumlah sklerotia menentukan virulensi *R. solani* namun tidak berkorelasi dengan pertumbuhan miselium.

Wamishe *et al.* (2007) juga mengemukakan bahwa agresivitas dan gejala penyakit (bercak) yang dihasilkan lebih besar oleh isolat yang memiliki laju pertumbuhan lebih tinggi dibandingkan dengan yang laju pertumbuhannya rendah.

Meskipun dalam penelitian ini, tidak dilakukan analisis virulensi namun hasil analisis variabilitas morfologi dan genetik berdasarkan literatur memperlihatkan dugaan besar bahwa ada kaitan dengan virulensi *R. solani*, yang mungkin dapat menjadi tujuan penelitian selanjutnya.

Gen yang Diduga Terkait Patogenesitas

Suatu patogen menyerang inang dengan melibatkan beberapa tahapan. Menurut Rioux *et al.* (2011) tahapan penting suatu patogen dalam menginfeksi inang dapat dikelompokkan menjadi tiga yaitu kontak awal dengan inang dan infiltrasi, penyesuaian dengan lingkungan inang, dan proliferasi patogen melalui jaringan nekrotik. Pengelompokan tersebut didasarkan pada keterkaitan antara profil ekspresi gen-gen yang diduga terkait dengan patogenesitas.

Gen-gen yang diduga terkait patogenesitas jamur *R. solani* mengkodekan beragam protein yang termasuk kelompok protein sekresi, enzim metabolisme primer dan sekunder, carbohydrate-active enzymes (CAZymes), dan transporter (Zheng *et al.*, 2013). Beberapa protein yang diduga terlibat dalam mekanisme patogenesitas jamur *R. solani* AG11A diantaranya *Glycosyl-Transferase* (GTF), *Pyruvate Carboxylase* (PC), AVR-Pita homolog (AP), *Common In Fungal Extracellular Membrane* (CFEM), protein G subunit α , E3 ubiquitin-protein ligase (Charoensopharat *et al.*, 2008; Rioux *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2013). Protein tersebut memiliki fungsi yang berbeda-beda namun diduga terkait dengan mekanisme patogenesitas jamur *R. solani*.

Masing-masing isolat yang mewakili kluster berdasarkan penanda rep-PCR kemudian dideteksi keberadaan gen yang diduga terkait patogenesisnya. DNA genom hasil isolasi diamplifikasi menggunakan PCR dengan komponen berupa 2µl template DNA genom masing-masing isolat, 2µl masing-masing primer (Tabel 3), 12,5µl mix PCR, dan ddH₂O hingga volume campuran menjadi 25µl pada tube 0,2ml.

Reaksi PCR dilakukan dengan prosedur predenaturasi 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit 35 siklus, penempelan 55°C selama 90 detik, pemanjangan 72°C selama 2 menit, dan pemanjangan akhir 72°C selama 10 menit (Charoensopharat *et al.*, 2007). Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dengan menggunakan gel agarosa 1,5% pada 100 Volt selama 30 menit. Ladder 100 bp digunakan sebagai marka ukuran ampikon.

Selanjutnya dilakukan sekuensing dan analisis bioinformatika. Produk PCR yang menunjukkan pita tunggal sesuai ukuran target dikirim ke 1st BASE (Malaysia) untuk proses perunutan nukleotida. Setelah hasil perunutan diketahui, data sekuen nukleotida tersebut disejajarkan antar sampel untuk melihat homologinya menggunakan situs bioinformatika <http://multalin.toulouse.inra.fr/> (Corpet, 1988).

Kemudian dilakukan analisis BLASTx untuk mensejajarkan nukleotida hasil sekuensing dengan protein di database GeneBank.

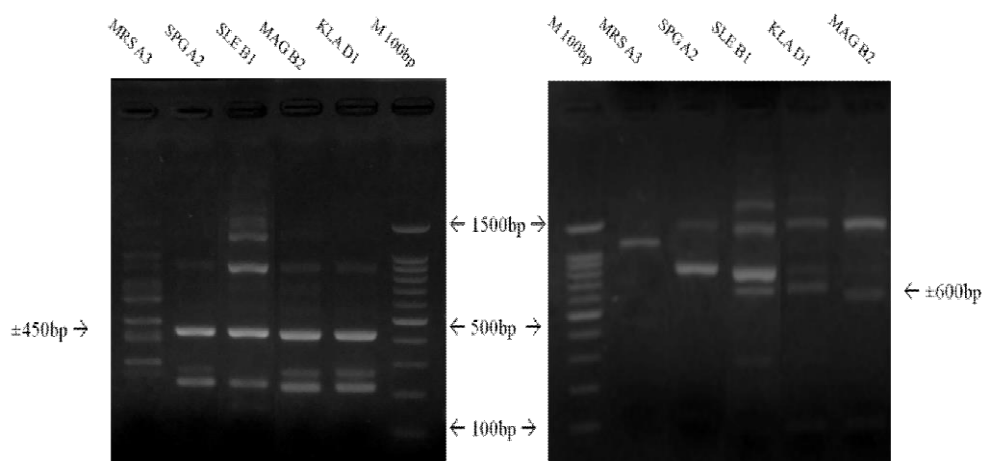
Lima isolat dipilih untuk digunakan sebagai sampel dalam deteksi gen yang diduga terkait patogenesis. Lima isolat tersebut yaitu KLA D1 dari Klaten, MAG B2 dari Magelang, Jawa Tengah; MRS A3 dari Maros, SPG A2 dari Soppeng, Sulawesi Selatan; dan SLE B1 dari Sleman, Yogyakarta. Lima isolat tersebut dipilih berdasarkan hasil klusterisasi dengan primer BOXA1R dan ERIC2.

Tiga isolat yang mewakili masing-masing kluster hasil amplifikasi primer BOXA1R yaitu isolat KLA D1, MRS A3 dan SLE B1 sedangkan berdasarkan hasil klusterisasi dengan primer ERIC2 dipilih empat isolat perwakilan yaitu MRS A3, SPG A2, MAG B2 dan KLA D1. Isolat KLA D1 dan MRS A3 merupakan isolat yang sama mewakili kedua primer rep-PCR.

Ada empat primer digunakan untuk mengamplifikasi gen yang diduga terkait patogenitas. Primer tersebut adalah primer untuk gen Rga1, AG1_AP, AG1_PC dan AG1_CFEM (Charoensopharat *et al.*, 2008; Rioux *et al.*, 2011).

Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa primer gen Rga1 dan AG1_AP tidak spesifik pada target sehingga menghasilkan banyak pita DNA dengan berbagai ukuran pada semua isolat yang digunakan. Pita DNA yang dihasilkan pada penelitian ini tidak sesuai dengan ukuran yang dinyatakan pada literatur.

Ukuran target ampikon Rga1 seharusnya adalah 514 bp sedangkan AG1_AP berukuran 104 bp. Hasil amplifikasi primer Rga1 dan AG1_AP disajikan pada Gambar 11.



Gambar 11 Visualisasi hasil amplifikasi dengan primer Rga1 (kiri) dan AG1_AP (kanan) pada lima isolat *R. solani*

Gen Rga1 merupakan gen penyandi GTP-Binding protein (G-protein) yaitu salah satu protein penting dalam jalur transduksi yang mengatur variabilitas

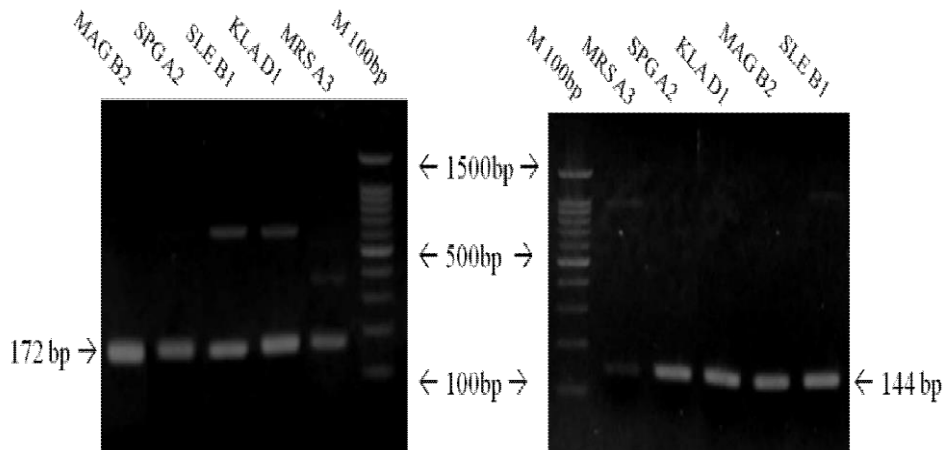
fungsi pada organisme eukaryotik (Loonphome *et al.*, 2004). Mutasi pada gen Rga1 ini mempengaruhi patogenesis jamur *R. solani*.

Oleh sebab itu, gen tersebut diduga sebagai salah satu gen yang terkait patogenesis pada jamur *R. solani* (Charoensopharat *et al.*, 2008).

AG1_AP merupakan primer yang didesain oleh Rioux *et al.* (2011). Primer tersebut mengamplifikasi gen homolog AVR_pita yang berperan sebagai efektor/gen avirulen homolog pada *M. oryzae*. Gen tersebut juga berperan dalam pasokan nutrisi patogen serta dalam proses host invasion (Rioux *et al.*, 2011).

Ada banyak hal yang dapat menyebabkan primer tidak mengamplifikasi secara spesifik, antara lain disebabkan oleh konsentrasi komponen PCR yang kurang sesuai, atau target gen yang memang tidak sesuai. Suhu annealing dan siklus yang tidak sesuai juga dapat mempengaruhi. Jika terlalu tinggi akan meningkatkan konsentrasi produk yang tidak spesifik, namun jika jumlahnya kurang akan mengurangi kuantitas produk yang diharapkan (Yuwono, 2006).

Primer selanjutnya yaitu primer AG1_PC dan AG_CFEM. Target ampikon untuk primer AG1_PC seharusnya 172bp dan untuk AG1_CFEM berukuran 144 bp. Berdasarkan hasil amplifikasi, pita DNA yang terbentuk sesuai dengan ukuran target yang disebutkan di literatur. Pada primer AG1_PC terdeteksi pula pita DNA lain kecuali pada isolat SPG A2 dan MAG B2. Hal yang sama juga terjadi pada primer AG1_CFEM dimana selain pita target, terbentuk pula pita ukuran lain pada isolat MRS A3 dan SLE B1 (Gambar 12).



Gambar 12. Visualisasi hasil amplifikasi dengan primer AG1_PC (kiri) dan AG1_CFEM (kanan) pada lima isolat *R. solani*

Menurut Rioux *et al.* (2011), primer AG1_PC merupakan primer yang mengamplifikasi gen penyandi enzim piruvat karboksilase yang berperan dalam proses metabolisme dan glukoneogenesis. Enzim tersebut diduga berperan penting dalam fase nekrotik pada patogenesis *R. solani* sedangkan primer AG1_CFEM merupakan penyandi common in fungal extracellular membrane (CFEM).

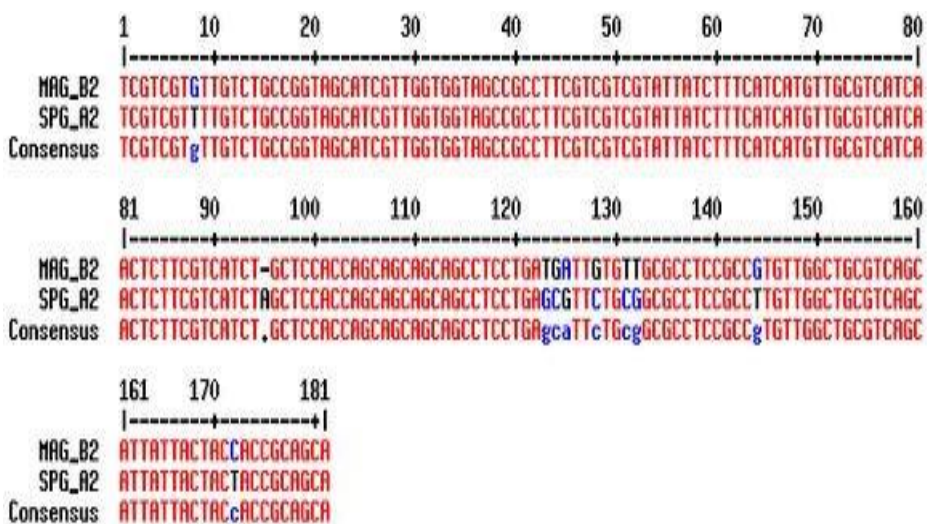
Zhang (2015) menyatakan gen CFEM ini hanya ada pada fungi tertentu. Fungsi gen ini masih terus diteliti namun diduga sebagai mediator dalam proses interaksi antara inang dan patogen dalam proses patogenesis. CFEM berperan dalam proses kontak dengan inang dan pembentukan apresorium (Rioux *et al.*, 2011).

Apresorium adalah kompleks hifa yang membengkak di bagian ujung yang berguna untuk menempelkan dan menembus inang oleh jamur (Taheri & Tarighi, 2011).

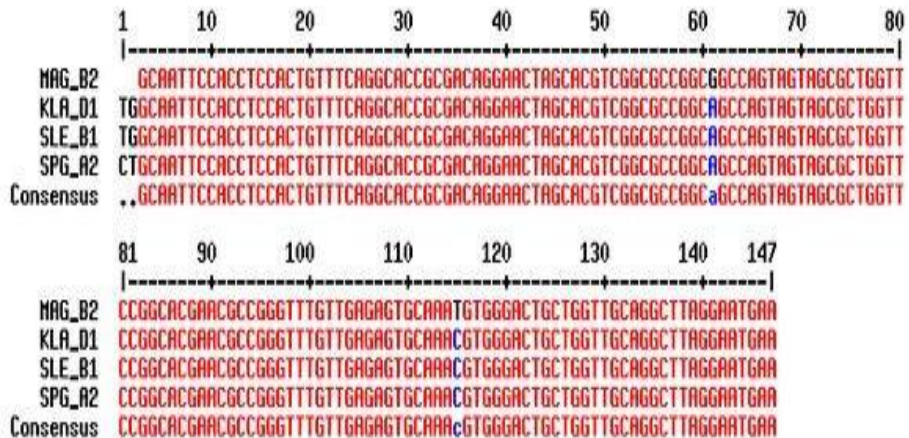
Sekuensing dilakukan pada isolat yang menunjukkan pita tunggal yaitu isolat MAG B2 dan SPG A2 dengan primer AG1_PC dan isolat MAG B2, KLA D1, SPG A2, dan SLE B1 dengan primer AG1_CFEM (Lampiran 3). Urutan

DNA tersebut disejajarkan menggunakan situs <http://multalin.toulouse.inra.fr/> (Corpet, 1988) untuk melihat perbedaan sekuen nukleotida antar sampel.

Hasil penyejajaran menunjukkan bahwa ada beberapa basa nuklotida yang berbeda pada kedua sampel yang diamplifikasi menggunakan primer AG1_PC (Gambar 12) dan pada tiga sampel yang diamplifikasi menggunakan primer AG1_CFEM (Gambar 13). Perbedaan sekuen pada tingkat basa nukleotida tersebut memperkuat hasil bahwa *R. solani* AG1-IA memiliki variabilitas genetik yang tinggi.



Gambar 13. Hasil penyejajaran sekuen basa nukleotida pada isolat MAG B2 dan SPG A2 yang diamplifikasi menggunakan primer AG1_PC



Gambar 14. Hasil penyandingan sekuen basa nukleotida pada isolat MAG B2, KLA D1, SLE B1 dan SPG A2 yang diamplifikasi menggunakan primer AG1_CFEM

Selanjutnya dilakukan analisis menggunakan tools BLASTx pada NCBI yaitu penyandingan nukleotida hasil sekuensing dengan data protein yang ada di database GeneBank.

Analisis menunjukkan bahwa dengan primer AG1_PC, sekuen pada isolat MAG B2 memiliki similaritas sebesar 100% dengan glycosyltransferase famili 2 protein *R. solani* AG1-IA sedangkan isolat SPG A2 memiliki similaritas 87% dengan E3-ubiquitin protein ligase.

Menurut Zheng *et al.* (2013) glycosyltransferase famili 2 protein *R. solani* AG1- IA dan E3-ubiquitin protein ligase merupakan gen yang diduga terkait patogenesis pada *R. solani* yaitu sebagai kandidat efektor yang menyebabkan nekrotik pada padi.

Hasil analisis BLASTx pada empat isolat yang diamplifikasi menggunakan primer AG1_CFEM menunjukkan bahwa keempatnya memiliki similaritas 100% dengan clathrin adaptor complex small chain domain.

Clathrin adalah protein yang berperan dalam pembentukan lapisan pada vesikel untuk transpor molekul antar sel. Clathrin harus berikatan dengan adaptor untuk melapisi vesikel dalam proses endositosis maupun eksositosis.

Jalur endositosis dapat digunakan oleh patogen untuk masuk ke sel selama infeksi (The European Bioinformatics Institute, 2007).

Berdasarkan hasil amplifikasi, dapat dikatakan bahwa dari empat primer yang digunakan untuk deteksi gen yang diduga terkait patogenesis, primer yang menghasilkan ampikon yang sesuai dengan ukuran yang disebutkan di literatur yaitu primer AG1_PC dan AG1_CFEM.

Primer tersebut menyandi protein yang diduga terkait dalam ekspresi patogenesis pada isolat-isolat yang digunakan pada penelitian ini yaitu Glycosyltransferase, E3 ubiquitin protein ligase dan clathrin protein .

Mekanisme patogenik *R. solani* tidaklah sederhana. Mekanisme tersebut tidak hanya menggunakan beberapa enzim litik dan degradatif untuk infeksi namun diduga melibatkan molekul lainnya kelompok enzim glycoside hydrolase (GH), metabolit sekunder dan beragam efektor untuk menekan pertahanan inang pada tahap awal infeksi.

Di samping itu, belum ada gen yang teridentifikasi bertanggung jawab penuh dalam proses patogenesis *R. solani* (Rioux *et al.*, 2011; Taheri & Tarighi, 2011).

Meskipun dalam penelitian ini tidak dilakukan analisis virulensi, namun hasil analisis variabilitas morfologi dan genetik berdasarkan literatur memperlihatkan dugaan besar bahwa ada kaitan antara variabilitas morfologi dan genetik *R. solani* AG1-IA dengan virulensinya, yang mungkin dapat menjadi tujuan penelitian selanjutnya. Deteksi gen yang telah dilakukan, diharapkan dapat menjadi

langkah awal dalam memahami aspek-aspek molekuler dan mekanisme patogenesis *R. solani* yang lebih baik.

”

Tak hanya di Indonesia! R. solani juga diteliti di berbagai negara lain seperti Jepang, India, dan Iran, dengan menggunakan berbagai marka.

”

6

Variabilitas *Rhizoctonia solani* dalam Penelitian

Analisis variabilitas *R. solani* secara morfologi maupun molekuler, dan gen yang diduga terkait patogenesis jamur tersebut telah diteliti di beberapa negara, diantaranya:

Guleria *et al.* (2007) meneliti variabilitas morfologi, patologi dan genetik 19 isolat jamur *R. solani* pada padi di India menggunakan marka RAPD dan ISSR dan menyimpulkan bahwa tidak ada kaitan antara variabilitas karakteristik morfologi dengan karakteristik patologi.

Khodayari *et al.* (2009) meneliti variabilitas morfologi dan genetik 25 isolat *R. solani* AG1-IA dari Iran. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa meski variabilitas ukuran sklerotia jamur berkorelasi dengan laju pertumbuhan, didukung oleh hasil amplifikasi dengan primer ERIC2, namun tidak ada korelasi antara variabilitas genetik dengan patogenesis dan daerah asal isolat.

Matsumoto (2013) meneliti analisis distribusi struktur populasi *R. solani* AG1IA di Jepang. Hasil penelitian menunjukkan keragaman genotip pada daerah dataran tinggi hingga rendah dengan menggunakan marka rep-PCR yaitu BOXA1R dan ERIC2.

Rioux *et al.* (2011) mendesain primer gen yang diduga terkait patogenesis *R. solani* untuk dikomparasi antara ekspresi gen pada subgrup AG1-IA dan AG3.

Matsumoto & Cuong (2014) meneliti karakterisasi genetik dan analisis sekuen *R. solani* AG1-IA dari Vietnam menggunakan rep-PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa marka rep PCR dapat mengelompokkan 46 isolat jamur tersebut ke dalam dua genotip yang dinamakan rep-Vet1 dan rep-Vet2. Genotip tersebut memiliki koefisien similaritas 75% berdasarkan database GenBank.

Berdasarkan hasil penelitian di atas maka penelitian mengenai variabilitas morfologi dan genetik *R. solani* penyebab hawar pelepah padi di beberapa daerah penghasil beras di Sulawesi Selatan, Yogyakarta dan Jawa Tengah menggunakan Rep-PCR, serta deteksi gen yang diduga terkait patogenisitas pada isolat *R. solani* tersebut memiliki peluang besar untuk diteliti karena belum pernah dilakukan.

Daftar Pustaka

- Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. 4th Ed., 606 pp. Academic Press, New York.
- Alexopoulos, C.J., C. W. Mims & M. Blackwell. 1996. *Introductory Mycology*, John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Amaradasa BS, Hovart BJ, Lakshman DK and Warnke SE, 2013. "DNA fingerprinting and anastomosis grouping reveal similar genetic diversity in *Rhizoctonia* species infecting turfgrasses in the transition zone of USA." *Mycologia*,105(5), 2013, pp. 1190–1201.
- Aye, SS and Matsumoto M, 2010, "Genetic Characterization by Rep-PCR of Myanmar Isolates of *Rhizoctonia* Spp., Causal Agents of Rice Sheath Diseases". *Journal of Plant Pathology*, Vol. 92, No. 1 pp. 255-260.
- Basu, A., Podder, M. and Sengupta, P.K. 2004. Variability and anastomosis among the rice isolates of *Rhizoctonia solani*. *Indian Phytopath.* 57: 70-72.
- Bintang M. 2010. *Teknik Penelitian Biokimia*. Jakarta: Erlangga.
- Bintang., *et al.*, 2017. Morphological and Molecular Characterization of *Rhizoctonia solani* Isolates from Two Different Rice Varieties. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, Vol. 21, No. 2, 2017: 72–79.
- BPS. 2011. Provinsi Penghasil Beras Terbesar di Indonesia. www.bps.go.id.
- Bruehl G. W. 1987. *Soilborne Plant Pathogens*. MacMillan Publishing Company: New York.
- Carling, D. E. 1996. *Grouping of Rhizoctonia solani by hyphal anastomosis reaction*. In *Rhizoctonia species: Taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control*, edited by B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst. Kluwer Academic Publisher : Boston.
- Ceresini, P. C., Shew, H. D., Vilgalys, R. J., and Cubeta, M. A. 2002. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia* 94:437-449.

- Charoensopharat K, *et al.*, 2008. Targeted disruption of a G α protein subunit gene results in reduced growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. *World J Microbiol Biotechnol* 24:345–351.
- Corpet F. 1988. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988 Nov 25;16(22):10881-90.
- Duncan, Sean *et al.*, 1993. Analysis of variation in isolates of *Rhizoctonia solani* by random amplified polymorphic DNA assay. *Mycol. Res.* 97(9): 1075- 1082 .
- Farida, Yuyun. 2009. Metode Sidik Jari DNA dengan Rep-PCR. Prosiding seminar Nasional Penelitian dan penerapan MIPA. UNY.
- Feng *et al.* 2017. Survival of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the Causal Agent of Rice Sheath Blight, under Different Environmental Conditions. *J Phytopathol* 165 (2017) 44–52.
- Firmansyah MA, 2005, Mekanisme Infeksi dan Identifikasi Dua Isolat *Rhizoctonia* spp. Penyebab Hawar Daun pada *Toona sureni*. Tesis. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- García, González V. Portal Onco, M.A. Susan. 2006. Biology and systematics of the form 479 genus *Rhizoctonia*. *Span. J. Agric. Res.* 4, 55–79.
- George, R. J. Nelson, R. S. Zeigler, and H. Leung. 1998. Rapid Population Analysis of *Magnaporthe grisea* by Using rep-PCR and Endogenous Repetitive DNA Sequences. *The American Phytopathological Society* Vol. 88 3 : 223-229.
- Gonzales N, *et al.*, 2012. Assessing genetic diversity in the web blight pathogen *Thanatephorus cucumeris* (anamorph *Rhizoctonia solani*) subgroups AG-1- IE and AG-1-IF with molecular markers. *J Gen Plant Pathol* 78: 85.
- Groth D.E. .2008. Effects of cultivar resistance and single fungicide application on rice sheath blight, yield and quality. *Crop Protection*, 27: 1125–1130.
- Guleria S, R. Aggarwal, T. S. Thind and T. R. Sharma. 2007. Morphological and Pathological Variability in Rice Isolates of *Rhizoctonia solani* and Molecular Analysis of their Genetic Variability. *J. Phytopathology* 155, 654–661.

- Hamzah, P. 2018. Variabilitas Morfologi Dan Genetik *Rhizoctonia Solani* Penyebab Penyakit Hawar Pelepah Padi Di Provinsi Jawa Tengah, Yogyakarta Dan Sulawesi Selatan. Tesis. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Hawksworth D. L., Sutton B. C., dan Ainsworth G. C. 1983. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi. 7 th ed.* Commonwealth MycologicalInstitute. Kew Surrey.
- Inagaki, K. 2001. Outbreaks of Rice Sclerotium Diseases in Paddy Fields and Physiological and Ecological Characteristics of this Causal Fungi. *ScienceReplicationsAgricultures*, Meijo University. 37: 57-66.
- Jayaprakashvel M and N. Mathivanan, 2012, "Morphological and pathological variations of rice sheath blight inciting south Indian *Rhizoctonia solani* isolates", *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45:4, 455-467.
- Jedryczka, M., Rouxel, T. & Balesdent M, 1999, "Rep-PCR Based Genomic Fingerprinting of Isolates of *Leptosphaeria maculans* from Poland". *European Journal of Plant Pathology* 105: 813.
- Jia Y, Correa-VictoriaF, McClungA, ZhuL, LiuG, WamisheY, XieJ, Marchetti M, Pinson SRM, Rutger JN, Correl JC. 2007. Rapid determination of cultivar responses to the sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* using a micro- chamber screening method. *Plant Dis* 91: 485-489.
- Kang HW, Park DS, Go SJ, Eun MY. (2002) Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequences of Korean weedy rice. *Mol Cells* 13:281- 287.
- Khodayari *et al.*, 2009. Genetic Diversity of Iranian AG1-IA Isolates of *Rhizoctonia solani*, the Cause of Rice Sheath Blight, Using Morphological and Molecular Markers. *J Phytopathol* 157:708-714.
- Lal *et al.*, 2014. Diversity Analysis of *Rhizoctonia solani* Causing Sheath Blightof Rice in India. *Afr. J Biotechnol.* Vol 13(51), pp. 4594-4605.

- Linde, C. C., Zala, M., Paulraj, R. S. D., McDonald, B. A., and Gnanamanickam, S. 2005. Population structure of the rice sheath blight pathogen *Rhizoctoniasolani* AG-1IA from India. *Eur. J. Plant Pathol.* 112:113-121.
- Lisek A, Lidia SP, Michal O, Pawel T, Aleksandra B, Agnieszka K, dan Eligio M.2011. "Use of the rep-PCR technique for differentiating isolates of *Rhizobacteria*". *J. of Fruit and Ornamental Plant Research* 19 (1):5-12.
- Loonphome *et al.*, 2004. Partial Characterization of G-protein β subunit gene in *Rhizoctonia solani*. 15th Annual Meeting of BIOTEC.
- Matsumoto M and Chuong H.V. 2014. Genetic Characterization Of The Rice Sheath Blight Pathogen *Rhizoctonia Solani* AG1-IA In North Vietnam By Rep-PCR And Sequence Analysis. *Journal of Plant Pathology*, 96(2), 377- 380.
- Matsumoto M, 2013. Distribution analysis of population structures for *Rhizoctonia solani* AG-1 IA in Japanese paddyfield, using rep-PCR assay. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 47:9, 1082-1088.
- Mehta, Y., Mehta, A. & Rosato, Y. 2002, ERIC and REP-PCR Banding Patterns and Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer of rDNA of *Stemphylium solani* Isolates from Cotton. *Curr Microbiol* 44: 323.
- Mishra *et al.* 2014. Morpho-cultural and pathogenic variability in *Rhizoctonia solani* isolates from rice, maize and green gram. *Indian Phytopath.*67 (2) : 147-154.
- Moni, ZR, *et al.*, 2016. Morphological and Genetical Variability among *Rhizoctonia solani* Isolates Causing Sheath Blight Disease of Rice. *Rice Science*, 23(1): 42-50.
- Mycobank. 2017. *Rhizoctonia solani* Taxonomy. <http://www.mycobank.org/BioMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=24177&Fields=All>.
- Nadarajah, Kalaivani *et al.* 2014. Molecular Characterization and Screening for Sheath Blight Resistance Using Malaysian Isolates of *Rhizoctonia solani*. Vol 2014, Article ID 434257.

- Nur, Amin, Karlina Syahrudin, dan Marcia. 2017. Keragaman Genetik Populasi Gandum Hasil Persilangan Konvergen. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* Vol. 1 No. 2.
- Nuryanto, B. 2017. Penyakit Hawar Pelepah (*Rhizoctonia solani*) pada Padi dan Taktik Pengelolaannya
- Nuryanto, B, Priyatmojo A, dan B. Hadisutrisno. 2014. Pengaruh Tinggi Tempat dan Tipe Tanaman Padi terhadap Keparahan Penyakit Hawar Pelepah. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan* Vol. 33 No. 1.
- Nuryanto, Bambang, 2003, Pengelolaan Komponen Epidemik Untuk Menekan Hawar Pelepah Daun Padi (*Rhizoctonia solani* Kuhn.). Tesis. Institut Pertanian Bogor, Bogor. Hal 1.
- Nuryanto, Bambang. 2011. Varietas, Kompos dan Cara Pengairan sebagai Komponen Pengendali Penyakit Hawar Upih. Disertasi. Program Pascasarjana, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 126 p.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:125-143.
- Ou, S.H. 1985. *Rice diseases*. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey. 272-286 p.
- Pathom-aree, W., Stach, J.E.M., Ward, A.C., Horikoshi, K., Bull, A.T., Goodfellow, M., 2006, "Diversity of actinoycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench, Extremophiles" (2006)10:181-189.
- Priyatmojo, A., Escopalao, V. E., Tangonan, N. G., Pascual, C. B., Suga, H., Kageyama, K., and Hyakumachi, M. 2001. Characterization of a new subgroup of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 1 (AG-1-ID), causalagent of a necrotic leaf spot on coffee. *Phytopathology* 91:1054-1061.
- Rioux, R, Manmathan H, *et al.*, 2011. Comparative analysis of putative pathogenesis-related gene expression in two *Rhizoctonia solani* pathosystems. *Curr Genet* 57:391–340.
- Rustam. 2012. Potensi Bakteri Penghasil Senyawa Bioaktif Antijamur untuk Pengendalian Penyakit Hawar Pelepah Padi. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

- Saylor, R. J., and Yang, Y. 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. *Plant Dis.* 91:1663-1668.
- Semangun H. 1991. *Penyakit-penyakit Tanaman Pangan di Indonesia*. Yogyakarta: Gajah Mada University Press.
- Sharma *et al.*, 2005. Characterization of Variability in *Rhizoctonia solani* by Using Morphological and Molecular Markers. *J. Phytopathology* 153, 449– 456.
- Shu, Can-Wei, Cheng-Jia Zou, Jie-Ling Chen, Fang Tang, Run-Hua Yi & Er-Xun Zhou. 2014. Genetic diversity and population structure of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the causal agent of rice sheath blight, in South China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 36:2, 179-186.
- Singh A, Singh U S, Willocquet L, Savary S. 1999. Relationship among cultural morphological characteristics, anastomosis behavior and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Khun on rice. *J Mycol Plant Pathol*, 29: 306–316.
- Singh R, Murti S, Mehilalm, Tomer, Prasad. 2015. Virulence Diversity in *R. Solani* Causing Sheath Blight in Rice. *J Plant Pathol Microb* 6: 296.
- Sneh B., Burpee L., and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. American Phytopathological Society. APS Press. USA.
- Soenartiningih, *et al.* 2015. Cendawan Tular Tanah (*R solani*) Penyebab Penyakit Busuk Pelepah pada Tanaman Jagung dan Sorgum dengan Komponen Pengendaliannya. *Iptek Tanaman Pangan* Vol. 10 No 2 2015.
- Stodart, BJ *et al.*, 2007. Genetic variation and pathogenicity of anastomosis group 2 isolates of *Rhizoctonia solani* in Australia. *Mycological research* 111891–900.
- Subandiyah, S. 2003. Cara Kerja Ekstraksi DNA menggunakan CTAB. Workshop dan Training Course on Molecular Detection for Plant and Environmental Protection. Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.
- Taheri and Tarighi. 2011. Cytomolecular aspect of sheath blight caused by The *Rhizoctonia solani*. *Eur J Plant Pathol*, DOI 10.1007/s10658-010-9725-7

- The European Bioinformatics Institute. 2007. Clathrin and Clathrin Adaptors
https://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2007_4/Page1.htm
- Toda T, Hyakumachi M, Arora DK. 1999. Genetic relatedness among and within different *Rhizoctonia solani* anastomosis groups as assessed by RAPD, ERIC and REP-PCR. *Microbiol Res.* 154:247–258.
- Walker J. C. 1975. *Plant Pathology*. Mc. Graw-Hill Book Company Inc. New York.
- Wamishe, Y.A., Yulin, J.I.A., Singh, P. and Cartwright, R.D. (2007). Identification of field isolates of *Rhizoctonia solani* to detect quantitative resistance in rice under green house condition. *Front. Agric. China* 1: 361- 367.
- Weissensteiner T, Griffin HG, Griffin A. 2003. *PCR Technology Current Innovation*. London: CRC Pr.
- Yuwono T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction*. Yogyakarta :Andi.
- Zhang, Z.-N. *et al.* 2015. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi. *Sci. Rep.* 5, 13032; doi: 10.1038/srep13032.
- Zheng, A. *et al.* 2013. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheathblight pathogen. *Nat. Commun.* 4:1424 doi: 10.1038/ncomms2427.

Profil Penulis



Penulis bernama lengkap **Pratiwi Hamzah, S.Si, M.Biotech.**

Lahir di Ujung Pandang pada 30 Desember 1992 dari pasangan Hasmawati dan Hamzah, serta memiliki adik

bernama Mutiara Hamzah. Penulis menikah dengan Aswar

Rustam dan dikaruniai dua orang anak bernama Muhammad

Dihyah Ashshiddiq dan Ummu Nafiah Syahidah. Dosen Politeknik Pembangunan

Pertanian Gowa ini pernah menempuh pendidikan di SD Inpres 6 Bontoa Maros,

SMPN 2 Maros, SMA 1 Maros, Institut Pertanian Bogor (S1, Biokimia, 2010)

serta Universitas Gadjah Mada (S2, Bioteknologi, 2015). Sejak tahun 2019, penulis

aktif menjalankan Tri Dharma Perguruan Tinggi di Politeknik Pembangunan

Pertanian Gowa. Penulis dapat dihubungi melalui email

pratiwi.hamzah.92@gmail.com

JAMUR

PENYEBAB HAWAR PELEPAH PADI

ASPEK MORFOLOGI DAN MOLEKULER

Buku *Jamur Penyebab hawar Pelepah Padi Aspek Morfologi dan Molekuler* ini adalah sebuah "catatan" penelitian yang disusun untuk menjadi referensi bagi mahasiswa, penyuluh, praktisi, hingga akademisi dalam mempelajari jamur *Rhizoctonia solani* pada padi, baik dari aspek morfologi sampai molekulernya.

Jamur *R. solani* adalah jenis yang kisaran inangna sangat luas dan banyak. Padi umumnya diserang oleh jenis AG1-1A. Pada satu jenis *R. solani*, ternyata memiliki morfologi yang berbeda hingga tingkat molekulernya (basa nukleotida)

ISBN 978-623-5275-47-5



9 786235 275475

