

**TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT BLAS (*Pyricularia oryzae* Cav.)
DAN ANALISIS GEN TERKAIT VIRULENSI MENGGUNAKAN METODE
SCAR (SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION)**

**SEVERITY LEVEL OF BLAST DISEASE (*Pyricularia oryzae* Cav.) AND
ANALYSIS OF VIRULENCY RELATED GENES USING SCAR
(SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION) METHOD**

GILANG KURRATA



**PROGRAM MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT BLAS (*Pyricularia oryzae* Cav.)
DAN ANALISIS GEN TERKAIT VIRULENSI MENGGUNAKAN METODE
SCAR (SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

Program Studi

Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Disusun dan diajukan oleh

GILANG KURRATA

kepada

**PROGRAM MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

TESIS**TINGKAT KEPARAHAN PENYAKIT BLAS (*Pyricularia oryzae* Cav.) DAN
ANALISIS GEN TERKAIT VIRULENSI MENGGUNAKAN METODE
SCAR (SEQUENCE CHARACTERIZED AMPLIFIED REGION)**

Disusun dan diajukan oleh

GILANG KURRATA

Nomor Pokok G022181008

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 10 Juni 2020

dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc.

Ketua

Dr. Ir. Untung Surapati T., M.Sc.

Anggota

Ketua Program Studi
Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Prof. Dr. Ir. Nur Amin, Dipl.Ing.Agr.

Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Sc. Ir. Baharuddin

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Gilang Kurrata
Nomor Pokok : G022181008
Program Studi : Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Juni 2020

Yang menyatakan,

Gilang Kurrata

PRAKATA

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْسَّلَامُ عَلَيْكُمْ وَرَحْمَةُ اللَّهِ وَبَرَكَاتُهُ

Alhamdulillah atas segala nikmat iman, Islam, kesehatan, kekuatan dan kesempatan yang telah diberikan Allah *Subhanahuwata'ala* sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini. Shalawat serta salam kepada tuntunan dan suri tauladan Rasulullah Muhammad *Shallallahu'alaihiwasallam* beserta keluarga dan sahabat beliau yang senantiasa menjunjung tinggi nilai-nilai Islam yang sampai saat ini dapat dinikmati oleh seluruh umat manusia di penjuru dunia.

Terselesainya tesis ini tidak terlepas dari bantuan beberapa pihak. Oleh karena itu dari lubuk hati yang paling dalam penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada :

1. Teristimewa, kedua orang tua, Ibunda tersayang Waliem Ummi dan Ayahanda tercinta Abdul Manaf yang telah memberikan doa, pengorbanan, cinta dan kasih sayang kepada penulis yang tidak ternilai harganya serta kepada seluruh keluarga besar terima kasih atas bantuan dan dorongannya hingga penulis dapat menjalankan tugas belajar yang penuh perjuangan ini.
2. Terkhusus pada suami penulis Abi Julianto dan kedua buah hati tersayang, Kalila Rifda Shaliha dan Syakira Faiha Shaliha yang telah memberikan izin, pengertian, pengorbanan, semangat, do'a dan kasih

sayang yang begitu tulus dan juga setia menunggu hingga akhir studi untuk bisa bersama kembali di Mataram Lombok.

3. Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc. sebagai ketua pembimbing penelitian dan Bapak Dr. Ir. Untung Surapati T., M.Sc. sebagai sekretaris pembimbing penelitian atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan mulai dari pengembangan minat terhadap permasalahan penelitian ini, penyusunan proposal, pelaksanaan penelitian hingga penulisan tesis ini.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Nur Amin, Dipl.Ing.Agr., Ibu Dr. Sri Aminah Ngatimin, S.P. M.Si dan Ibu Dr. Ir. Melina, M.Si. selaku anggota panitia seminar hasil penelitian dalam memberikan saran dan arahan yang sangat berguna dalam penyempurnaan tesis.
5. Bapak dan Ibu dosen pengampu mata kuliah Program Magister Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin atas ilmu, didikan, dukungan dan motivasi yang diberikan kepada penulis dalam menempuh pendidikan Strata 2.
6. Badan Penyuluhan dan Pengembangan SDM Pertanian Kementerian Pertanian yang telah memberikan kesempatan kepada penulis dan teman-teman yang penulis banggakan dalam mengembangkan ilmu, kompetensi, profesionalitas dan pengalaman melalui pemberian tugas belajar PNS Kementan tahun 2018.
7. Para pegawai Fakultas Pertanian, staf laboratorium dan administrasi Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Pak Kama, Pak

Ardan, Pak Ahmad, Ibu Asriani, Ibu Tia atas dukungan dan arahannya selama ini.

8. Teman-teman seperjuangan Magister Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan angkatan 2018 terima kasih atas kebersamaan, kerjasama dan persahabatan yang telah terjalin. Semoga komunikasi tetap terjaga. InsyaAllah kenangan indah serta suka duka akan membekas selamanya dalam hati penulis.
9. Kepala Instalasi Pengamatan Peramalan Pengendalian Organisme Pengganggu Tanaman (IP3OPT) Wilayah IV Maros Bapak Yumarto, S.P., M.Si. dan seluruh staf yang penulis tidak dapat sebutkan yang telah membantu penulis selama pengamatan di lapangan. Terima kasih juga atas ilmu lapangan yang diberikan.
10. Staf Bidang Penelitian Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin, Staf Laboratorium Mikrobiologi Ibu Ridha Wahyu, S.T. dan Staf Laboratorium Riset FKM Bapak Zulkifli abdullah S.Si., M.Kes terima kasih atas waktu dan kerjasamanya.
11. Serta semua pihak yang namanya tidak tercantum tetapi telah banyak membantu penulis dalam proses pelaksanaan penelitian dan penulisan tesis ini. Semoga kebaikan seluruh bapak, ibu dan handai taulan diterima dan mendapat balasan dari Allah SWT yang berlipat ganda.

Dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan adanya saran dan kritik yang bersifat konstruktif demi kesempurnaan tesis ini. Penulis bermunajat dan berdo'a kepada Allah SWT semoga tesis ini

bermanfaat bagi kemaslahatan ummat, bagi pengembangan ilmu pertanian dan bernilai ibadah kepada Allah SWT.

Makassar, Juni 2020

Penulis

ABSTRAK

GILANG KURRATA. Tingkat Keparahan Penyakit Blas (*Pyricularia oryzae* Cav.) dan Analisis Gen Terkait Virulensi Menggunakan Metode SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) (dibimbing oleh **Tutik Kuswinanti** dan **Untung Surapati T.**).

Padi (*Oryza sativa* L., Poaceae) adalah tanaman sereal terpenting di dunia dan sumber pati primer untuk lebih dari setengah populasi dunia. Penyakit blas padi yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* (teleomorph: *Magnaporthe oryzae*) merupakan salah satu penyakit penting pada pertanaman padi di dunia. Tidak dipungkiri bahwa menanam varietas tahan merupakan cara penanggulangan penyakit blas yang murah, efisien dan aman dari risiko pencemaran pestisida. Namun ketahanan suatu varietas padi terhadap penyakit blas hanya dapat dimanfaatkan beberapa tahun saja disebabkan oleh kompleksitas patogen yang dengan mudah dapat mematahkan ketahanan varietas terutama bila ketahanan varietas ditentukan oleh hanya satu gen dominan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keparahan penyakit blas dan variasi genetik dari isolat-isolat *P. oryzae* dari Kabupaten Maros. Pengamatan keparahan penyakit blas menggunakan *Standard Evaluation System for Rice* IRRI (2013). Analisis keragaman genetik menggunakan primer spesifik penyandi gen virulensi (*Pwl2*, *Erg2* dan *Cut1*). Terdapat perbedaan tingkat keparahan penyakit di tiap lokasi pengamatan. Tingkat keparahan blas tertinggi diamati pada varietas Mekongga sebesar 42,12% di Kecamatan Simbang dan 23,33% di Kecamatan Maros Baru. Di Kecamatan Tanralili (varietas Inpari 7) dan Kecamatan Mandai (varietas Ciherang) tingkat keparahan hanya 7,6% dan 7,88%. Sebanyak lima belas isolat *P. oryzae* diperoleh dari delapan kecamatan di Kabupaten Maros. Analisis keragaman genetik menggunakan tiga primer menunjukkan adanya lima haplotipe yang berbeda yaitu haplotipe A-000 (empat isolat), C-011 (tiga isolat), D-111 (dua isolat), F-110 (tiga isolat) dan G-100 (tiga isolat).

Kata kunci: padi, *Pyricularia oryzae*, tingkat keparahan, haplotipe, analisa molekuler

ABSTRACT

GILANG KURRATA. Severity Level of Blast Disease (*Pyricularia Oryzae* Cav.) and Analysis of Virulence Related Genes Using SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) Method (Supervised by **Tutik Kuswinanti** and **Untung Surapati T.**).

Rice (*Oryza sativa* L., Poaceae) is the most important cereal crop in the world and serve as primary source of starch for more than half of the world's population. Rice blast disease caused by the fungus *Pyricularia oryzae* (teleomorph: *Magnaporthe oryzae*) is one of the important diseases in rice cultivation in the world. It is undeniable that planting of resistant varieties is a way to deal with blast disease since it is cheap, efficient and safe from the risk of pesticide pollution. However, the resistance of a rice variety to blast disease can only be utilized for a few years due to the complexity of pathogens which can easily break down the resistance of a variety, especially if their resistance is determined only by one dominant gene. The aims of this research was to determine the severity of blast disease and genetic variation of *P. oryzae* isolates from Maros District. The severity of blast disease was observed using the *Standard Evaluation System for Rice* IRRI (2013). The pathogen's genetic diversity was determined using specific primers, coding the fungus virulence genes namely *Pwl2*, *Erg2* and *Cut1*. There was a different disease severity at each observed location. The highest leaf blast intensity was observed on Mekongga variety in Simbang sub-district (42.12%) and Maros Baru sub-district (23.33%). In Tanralili sub-district (Inpari 7 variety) and Mandai sub-district (Ciherang variety) leaf blast intensity were 7.6% and 7.88% respectively. A total of fifteen isolates of *P. oryzae* obtained from eight sub-districts in Maros. Analysis of genetic diversity showed found five different haplotypes, namely haplotype A-000 (four isolates), C-011 (three isolates), D-111 (two isolates), F-110 (three isolates) and G-100 (three isolates).

Keywords: rice, *Pyricularia oryzae*, blast intensity, haplotype, molecular analysis

DAFTAR ISI

| | halaman |
|---|----------------|
| PRAKATA | v |
| ABSTRAK | ix |
| ABSTRACK | x |
| DAFTAR ISI | xi |
| DAFTAR TABEL | xiv |
| DAFTAR GAMBAR | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN | xvi |
| DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN | xvii |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| A. Latar Belakang | 1 |
| B. Rumusan Masalah | 6 |
| C. Tujuan Penelitian | 7 |
| D. Kegunaan Penelitian | 7 |
| E. Hipotesis Penelitian | 8 |
| F. Kerangka Pikir Penelitian | 8 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 9 |
| A. Padi (<i>Oryza sativa</i> L.) | 9 |
| B. Patogen Penyebab Penyakit Blas (<i>Pyricularia oryzae</i> Cav.) | 12 |
| 1. Arti Ekonomis Penyakit Blas Padi | 12 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Sistematika <i>P. oryzae</i> | 14 |
| 3. Morfologi dan Biologi Blas Padi | 19 |
| 4. Gejala Penyakit Blas Padi | 22 |
| 5. Siklus Hidup dan Proses Infeksi <i>P. oryzae</i> | 25 |
| 6. Epidemiologi Penyakit Blas Padi. | 28 |
| 7. Inang Alternatif Penyakit Blas Padi..... | 34 |
| C. Interaksi Tanaman Padi dan Patogen <i>P. oryzae</i> | 35 |
| D. Analisis Molekuler | 38 |
| 1. Penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)..... | 38 |
| 2. Isolasi DNA | 41 |
| 3. Polymerase Chain Reaction (PCR) | 43 |
| 4. Elektroforesis Gel Agarosa | 48 |
| E. Gambaran Umum Kabupaten Maros Terkait Geografi..... | 49 |
| III. METODOLOGI PENELITIAN | 53 |
| A. Waktu dan Lokasi Penelitian | 53 |
| B. Bahan dan Alat..... | 53 |
| C. Prosedur Penelitian..... | 54 |
| 1. Pengamatan Tingkat Keparahan Penyakit Blas dan Pengambilan Sampel di Lapangan | 54 |
| 2. Isolasi dan Identifikasi Cendawan <i>P. oryzae</i> | 58 |
| 3. Analisa Gen Virulensi Cendawan <i>P. oryzae</i> Menggunakan Metode SCAR | 60 |
| D. Analisis Data..... | 63 |

| | |
|---|-----|
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 64 |
| A. Hasil..... | 64 |
| 1. Pengamatan Tingkat Keparahan Penyakit Blas Padi dan Pengambilan Sampel Lapangan | 64 |
| 2. Isolasi dan Karakteristik Morfologi Cendawan <i>P. oryzae</i> yang Ditemukan | 67 |
| 3. Analisa Gen Virulensi Cendawan <i>P. oryzae</i> Menggunakan Metode SCAR | 78 |
| B. Pembahasan | 82 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | 97 |
| A. Kesimpulan | 97 |
| B. Saran | 98 |
| DAFTAR PUSTAKA | 99 |
| LAMPIRAN | 113 |

DAFTAR TABEL

| nomor | teks | halaman |
|-------|---|---------|
| 1. | Deskripsi skala evaluasi keparahan penyakit blas daun (IRRI, 2013)..... | 56 |
| 2. | Kategori skala serangan pada daun | 57 |
| 3. | Sekuen nukleotida primer | 62 |
| 4. | Haplotipe cendawan blas berdasarkan tiga gen virulensi | 63 |
| 5. | Keparahan penyakit blas daun di delapan Kecamatan Kabupaten Maros | 66 |
| 6. | Isolat <i>Pyricularia oryzae</i> yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros | 68 |
| 7. | Morfologi kultur dan mikroskopis mikroskopis isolat <i>Pyricularia oryzae</i> yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros | 71 |
| 8. | Haplotipe cendawan <i>Pyricularia oryzae</i> berdasarkan pola ampikon ketiga gen virulensi yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros..... | 81 |

DAFTAR GAMBAR

| nomor | teks | halaman |
|-------|---|---------|
| 1. | Kerangka pikir penelitian | 8 |
| 2. | Morfologi kultur dan mikroskopis <i>Pyricularia oryzae</i> (Klaubauf <i>et al.</i> (2014) dan Castroagudin <i>et al.</i> , 2016))..... | 21 |
| 3. | Gejala blas pada berbagai bagian tanaman padi (Khemruk, W., 2016)..... | 23 |
| 4. | Siklus infeksi <i>P. oryzae</i> pada tanaman padi (Dean <i>et al.</i> , 2002) | 26 |
| 5. | Siklus pembentukan molekul DNA baru dalam proses PCR (Muladno, 2002) | 46 |
| 6. | Peta wilayah Kabupaten Maros (BPS Kabupaten Maros, 2019) | 52 |
| 7. | Pola diagonal pengamatan intensitas serangan | 55 |
| 8. | Penilaian pola bercak blas daun menggunakan skala evaluasi 0-9 (IRRI, 1996)..... | 56 |
| 9. | Gejala blas padi hasil pengamatan di lapangan. (Kurrata, 2019) | 64 |
| 10. | Grafik keparahan penyakit blas daun padi di delapan Kecamatan Kabupaten Maros | 67 |
| 11. | Karakteristik morfologi spora <i>P. oryzae</i> yang tumbuh di atas permukaan daun di bawah mikroskop stereo perbesaran 50x (Kurrata, 2019)..... | 69 |
| 12. | Karakteristik morfologi isolat <i>P. oryzae</i> di bawah mikroskop compound perbesaran 400x (Kurrata, 2019) | 70 |
| 13. | Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik <i>P. oryzae</i> dengan menggunakan primer <i>Pwl2</i> | 79 |
| 14. | Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik <i>P. oryzae</i> dengan menggunakan primer <i>Erg2</i> | 79 |
| 15. | Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik <i>P. oryzae</i> dengan menggunakan primer <i>Cut2</i> | 80 |

DAFTAR LAMPIRAN

| nomor | teks | halaman |
|--------------|--|----------------|
| 1. | Tanaman padi yang terserang blas di delapan Kecamatan Kabupaten Maros | 114 |
| 2. | Deskripsi varietas padi | 116 |
| 3. | Bahan dan alat pembuatan media PDA (Potato Dextrose Agar) | 120 |
| 4. | Bahan dan alat metode inkubasi kertas saring/ <i>blotter test</i> (atas) dan PDA (Potato Dextrose Agar) (bawah) | 121 |
| 5. | Tahapan metode inkubasi dengan kertas saring/ <i>blotter test</i> | 122 |
| 6. | Tahapan metode inkubasi dengan PDA (Potato Dextrose Agar) | 123 |
| 7. | Tahapan metode PCR <i>Pyricularia oryzae</i> terbagi menjadi empat tahap yaitu ekstraksi DNA, pembuatan master mix dan amplifikasi PCR, pembuatan gel agarosa dan elektroforesis | 124 |

DAFTAR ARTI LAMBANG DAN SINGKATAN

| Lambang/singkatan | Arti dan keterangan |
|-------------------|--|
| (% w/v) | Percent weight per volume, persentase berat per volume |
| µm | Mikronmeter, satuan panjang |
| x g | (kali) gravitasi/ <i>relative centrifugal force</i> |
| bp | base pair (pasang basa), satuan dalam biologi molekuler yaitu komponen nukleotida dalam RNA atau DNA yang komplementer yang terhubung oleh ikatan hydrogen |
| cm | Sentimeter, satuan panjang |
| DNA | Deoxyribonucleic acid, asam deoksiribonukleat |
| g | Gram, satuan unit untuk massa |
| ha | Hektar, satuan unit untuk luas tanah |
| kD | kiloDalton, satuan unit untuk massa molekuler |
| kg | Kilogram, satuan unit untuk massa |
| km | Kilometer, satuan panjang |
| mg/l | Milligram per liter, satuan untuk larutan |
| ml | Milliliter, satuan volume berbasis liter |
| ng | Nanogram, satuan satuan unit untuk massa |
| NUV | Near ultraviolet |
| °C | (derajat) Celcius, satuan suhu |
| RNA | Ribonucleid acid, asam ribonukleat |
| rpm | Rotation per menit, satuan untuk kecepatan rotasi (perputaran) |
| SM | Sebelum masehi, satuan waktu penanggalan |
| UV | Ultraviolet, spektroskopi ultraviolet |

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Lebih dari setengah populasi dunia membutuhkan padi (*Oryza sativa* L.) famili Poaceae sebagai tanaman sereal terpenting dan sumber pati primer (Yadav *et al.*, 2015). Produksi padi di empat negara pengonsumsi beras terbesar di Asia pada tahun 2015 mencapai 200 juta ton di Cina, 170 juta ton di India, 50 juta ton di Indonesia dan 20 juta ton di Bangladesh (FAO, 2016). Produksi beras secara global belum mampu memenuhi permintaan populasi dunia yang meningkat setiap tahun (Khush dan Jena, 2009). Menurut penelitian dilakukan oleh IRRI pada masalah pangan populasi dunia, telah diprediksi bahwa 800 juta ton beras akan dibutuhkan pada tahun 2025 (Kubo dan Purevdoj, 2004).

Salah satu faktor kendala utama yang mengancam produksi beras di seluruh dunia adalah penyakit blas yang disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* Cavara (Teleomorph: *Magnaporthe oryzae* Hebert) (Divya *et al.*, 2014). Cendawan ini dapat menginfeksi tanaman padi di semua tahap pertumbuhan di bawah lingkungan yang kondusif meliputi daun, buku, leher malai, bulir padi dan kolar daun (Scardaci *et al.*, 1997). Penyakit blas padi merupakan masalah serius di lebih dari 85 negara di semua benua yang membudidayakan padi dengan kerugian hasil yang

beragam dengan kerugian antara 10-30% dari panen padi tahunan (Skamnioti and Gurr, 2009). Wang *et al.*, (2014) melaporkan penurunan hasil padi di Jepang akibat penyakit blas sekitar 60%, di Brasil pernah mencapai 100%, India 7,5%, Korea 8%, Cina 14%, Filipina 67%, Vietnam 60%, Italia 24% dan Iran 50%.

Kerusakan penyakit blas di Indonesia pada tahun 2015 mencapai 46.924 ha atau 9,25% dari total luas areal pertanaman padi dan diramalkan serangan akan meningkat pada tahun-tahun mendatang (Ditjen Tanaman Pangan, 2015). Sudir *et al.* (2014) melaporkan penyakit blas sudah menyebar di hampir semua sentra produksi padi di Indonesia. Tidak hanya menyerang pada tanaman padi gogo tetapi juga padi di lahan sawah tadah hujan dan lahan irigasi. Wilayah dominan penyebaran blas yang telah dilaporkan di Indonesia meliputi Propinsi Jawa Barat, Sumatera Selatan, Sumatera Utara, Kalimantan Tengah, Bali dan Nusa Tenggara Barat (Hasanuddin, 2004). Di Sulawesi Selatan, total luas serangan penyakit blas pada 24 kabupaten/kota dari tahun 2004-2013 mencapai 12.056 ha. Total luas serangan blas tertinggi terdapat pada tiga kabupaten yaitu Kabupaten Sinjai (5.993 ha), Kabupaten Maros (1.814 ha) dan Kabupaten Bone (1.023 ha) (BPTPH Sulsel, 2014).

Pada awalnya pengendalian penyakit blas padi menggunakan varietas padi tahan terbilang efektif. Namun, varietas tahan hanya efektif dalam jangka pendek karena munculnya ras *P. oryzae* baru (Utami *et al.*, 2006). Munculnya ras *P. oryzae* baru sebagai akibat dari perubahan

genetik patogen alami yang terjadi secara kontinu karena adanya berbagai faktor tekanan lingkungan dan faktor inang (Kang dan Lee, 2000). Menurut Taheri dan Irannejad (2014) variasi dalam patotipe dan struktur populasi patogen ini sangat dipengaruhi oleh kondisi geografis suatu wilayah. Ras-ras patogen dapat berubah sifat virulensinya dalam waktu singkat bergantung pada inang dan pengaruh lingkungan (Utami *et al.*, 2006).

Keragaman genetik dalam biologi populasi patogen dapat diketahui diantaranya melalui pemantauan keragaman fisiologi ras (patotipe) dan keragaman genetik (haplotipe). Keragaman fisiologi ras (patotipe) diklasifikasi berdasarkan reaksi patogen pada tanaman diferensial yang masing-masing varietas memiliki gen yang mampu membedakan patogenesitas isolat yang diuji (Hayashi dan Fukuta, 2009; Fukuta *et al.*, 2009). Sedangkan keragaman genetik (haplotipe) salah satunya diketahui melalui analisis DNA (Asam Deoksiribonukleat) patogen dengan marka molekuler PCR (Polymerase Chain Reaction) (Leung *et al.*, 1993).

Soubabere *et al.* (2001) telah mengidentifikasi *Magnaporthe grisea* yang saat ini dikenal sebagai *M. oryzae* (anamorph: *Pyricularia oryzae*) menggunakan penanda molekuler (marka) sebagai pengkode gen yang berkaitan dengan virulensi yaitu penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR). Sebanyak tiga dari enam belas penanda SCAR dikembangkan oleh Soubabere *et al.* (2001) telah banyak digunakan di Indonesia untuk menentukan variasi genetik

(haplotipe) isolat *P. oryzae* yaitu: *Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2*. Gen *Cut1* merupakan lokus gen pengkode enzim cutinase berfungsi sebagai pendegradasi lapisan kutikula tanaman (Sweigard *et al.*, 1992). Gen *Erg2* berperan sebagai pengkode metabolit sekunder pada cendawan yang menjadi target antifungal pada sel tanaman (Keon *et al.*, 1994), sedangkan gen *Pwl2* dikenal sebagai gen avirulen yang bersifat spesifik inang (Valent dan Chumley, 1994). Penanda-penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) hanya mengamplifikasi pita DNA yang sesuai ukuran target selama proses PCR sehingga hanya menghasilkan satu Pita DNA (pita tunggal) dalam proses elektroforesis menggunakan gel agarosa.

Di Indonesia penelitian tentang keanekaragaman genetik yang mengkarakterisasi kespesifikan isolat *P. oryzae* terhadap lokus spesifik yang berhubungan dengan gen virulensi banyak dilakukan. Hasil Penelitian Reflinur *et al.* (2005) untuk mengetahui keragaman genetik 230 isolat cendawan *P. oryzae* koleksi Laboratorium Biologi Molekuler Balai Besar-Biogen yang berasal dari Lampung, Bogor, Sukabumi, Sumatera Utara dan Sumatera Barat dengan menggunakan primer spesifik gen virulensi (*Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2*). Penelitian tersebut menghasilkan delapan haplotipe, yaitu A-000, B-001, C-011, D-111, E-010, F-110, G-100 dan H-101 dengan frekuensi tertinggi adalah haplotipe D-111 (61,3%) dan H-101 (16,1%). Penelitian yang serupa dilakukan oleh Lestari *et al.*, (2014), diperoleh enam haplotipe dari enam belas isolat yaitu B-001,

C-011, D-111, F-110, G-100 dan H-101. Hal ini menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut menunjukkan keragaman genetik yang tinggi.

Demikian juga dengan penelitian Rianingsih (2017) dan Izha (2018) untuk mengetahui keragaman genetik isolat *Pyricularia oryzae* yang berasal dari beberapa daerah/kabupaten di Sulawesi Selatan menggunakan primer spesifik gen virulensi (*Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2*). Hasil deteksi molekuler 10 isolat *P. oryzae* oleh Rianingsih (2017) dari Kabupaten Maros, Bone dan Gowa ditemukan 3 haplotipe yaitu C-011, E-010 dan F-110, haplotipe C-011 yang dominan. Hasil deteksi molekuler Izha (2018) terhadap 10 isolat *P. oryzae* dari Kabupaten Pinrang ditemukan 2 haplotipe yaitu F-110 (8 isolat) dan G-100 (2 isolat).

Berkaitan dengan uraian di atas, sifat patogen blas mudah membentuk variasi genetik baru maka pemantauan sebaran dan komposisi keragaman genetik dari waktu ke waktu sebagai dasar rekomendasi pengendalian dengan varietas tahan sangat diperlukan. Mekanisme genetik yang dapat menerangkan variasi genetik *P. oryzae*, hal ini dapat terjadi akibat mutasi atau rekombinasi (Zeigler, 1998). Penggunaan penanda spesifik berbasis PCR yang terkait dengan virulensi seperti *Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2* dapat digunakan karena merupakan teknik yang ampuh untuk mendeteksi variasi genetik patogen tanaman termasuk mengetahui mekanisme interaksi tanaman padi dengan blas (Soubabere *et al.*, 2001; Lestari *et al.*, 2014). Penelitian sejenis untuk mengetahui keragaman genetik *P. oryzae* di Indonesia khususnya di Kabupaten Maros

yang merupakan salah satu daerah utama penghasil beras di Sulawesi Selatan perlu dilakukan sehingga dapat diperoleh data perkembangan sebaran dan komposisi keanekaragaman genetik *P. oryzae* dari waktu ke waktu guna pengembangan informasi dalam perakitan varietas tahan. Selain itu perlu diketahui pula tingkat keparahan penyakit blas di lapangan. Hal itu penting sebagai langkah untuk mengendalikan penyakit yang menyerang pertanaman padi di lokasi tersebut.

B. Rumusan Masalah

Tingginya kerugian yang disebabkan oleh cendawan blas mengharuskan pemulia tanaman untuk mengembangkan varietas unggul tahan terhadap penyakit blas sebagai salah satu strategi pengendalian penyakit ini. Tidak dipungkiri bahwa menanam varietas tahan merupakan cara penanggulangan penyakit blas yang murah, efisien dan aman dari risiko pencemaran pestisida. Namun ketahanan suatu varietas padi terhadap penyakit blas hanya dapat dimanfaatkan beberapa tahun saja disebabkan oleh kompleksitas patogen dengan mudah dapat mematahkan ketahanan varietas terutama bila ketahanan varietas ditentukan oleh satu gen dominan. Pengkajian dinamika populasi cendawan blas di lapang merupakan langkah awal yang harus dilakukan untuk mendapatkan informasi gen-gen terkait virulensi cendawan untuk lokasi tertentu, yaitu dapat diketahui dengan analisis DNA patogen menggunakan marka molekuler terkait virulensi. Sehingga mekanisme interaksi tanaman padi

dengan blas lebih dipahami sebagai rekomendasi kepada pemulia tanaman dalam mengembangkan varietas unggul tahan. Berdasarkan uraian pada latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan yang akan menjadi acuan adalah:

1. Seberapa besar tingkat keparahan penyakit blas padi di Kabupaten Maros?
2. Bagaimanana sebaran dan komposisi keberadaan gen terkait virulensi pada masing-masing isolat blas padi yang diperoleh dari Kabupaten Maros?

C. Tujuan Penelitian

Sesuai dengan rumusan masalah di atas, maka tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui tingkat keparahan serangan penyakit blas padi di Kabupaten Maros.
2. Menganalisis keragaman genetik isolat *P. oryzae* dari Kabupaten Maros berdasarkan gen terkait virulensi menggunakan metode SCAR (Sequence Characterized Amplified Region).

D. Kegunaan Penelitian

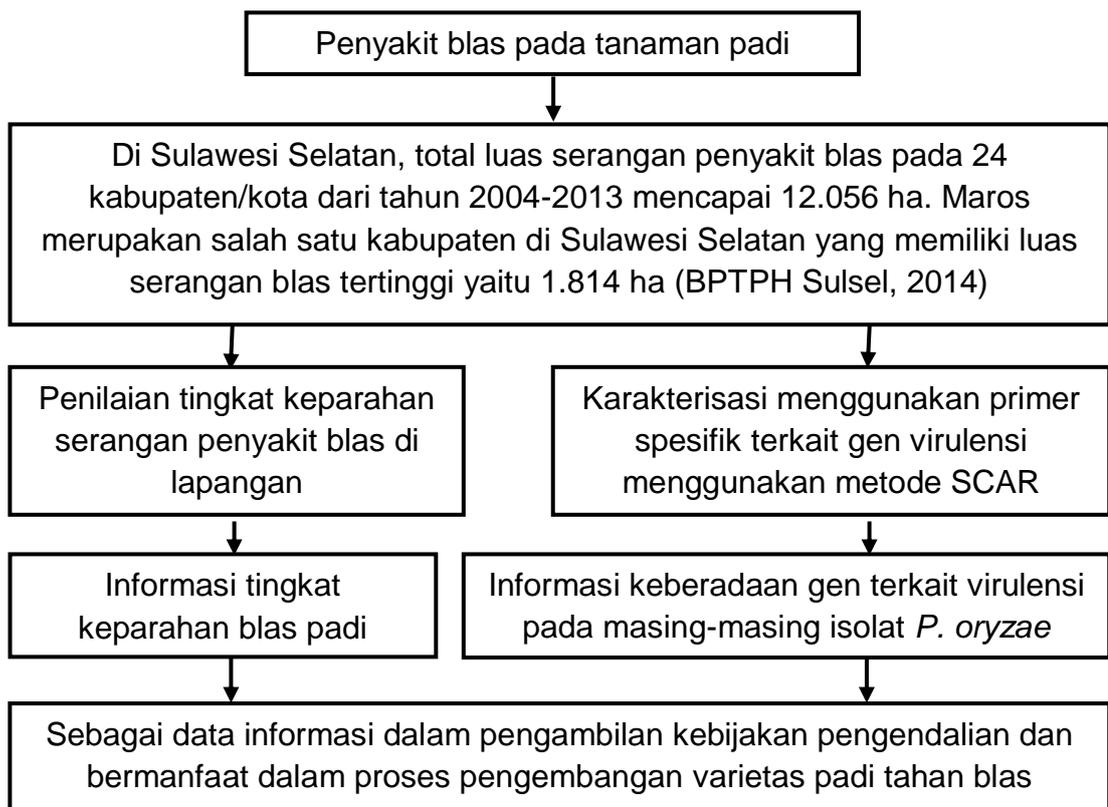
Sebagai informasi mengenai tingkat keparahan penyakit blas padi dan keragaman genetik cendawan *P. oryzae* yang berkaitan dengan sifat virulensi di Kabupaten Maros. Informasi yang diperoleh dapat bermanfaat bagi Pemerintah dalam upaya pencegahan dan pengendalian serta

bermanfaat bagi pemulia tanaman dalam proses perakitan varietas padi tahan penyakit blas.

E. Hipotesis Penelitian

1. Terdapat perbedaan tingkat keparahan serangan penyakit blas padi di lapangan.
2. Terdapat keragaman gen virulensi pada isolat-isolat cendawan blas padi yang diuji.

F. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Padi

Padi merupakan tanaman budidaya terpenting dalam peradaban. Tanaman padi berasal dari dua benua yaitu Asia dan Afrika Barat tropis dan subtropis. Bukti sejarah memperlihatkan bahwa tanaman padi sudah ada sejak 3000 tahun SM di Zhejiang (Cina). Fosil butir padi dan gabah ditemukan di Hastinapur Uttar Pradesh India sekitar 100-800 SM. Selain Cina dan India, ada beberapa negara asal padi yaitu Bangladesh, Burma, Vietnam dan Thailand (Purnamaningsih, 2006).

Menurut Hanum (2008), dalam sistematika tumbuhan padi diklasifikasikan dalam botani sebagai berikut: Kingdom: Plantae, Divisio: Spermatophyta, Sub divisio: Angiospermae, Kelas: Monocotyledoneae, Ordo: Poales, Famili: Gramineae (Poaceae), Genus: *Oryza*, Spesies: *Oryza sativa* L. Menurut Hasanah (2007), padi berasal dari dua benua yaitu padi jenis *Oryza fatua* Coening dan *Oryza sativa* L. berasal dari benua Asia sedangkan *Oryza stapfii* Rroschevdan *Oryza glaberima* Steund berasal dari Afrika Barat. Padi sekarang ini merupakan persilangan antara *Oryza officinalis* dan *Oryza sativa f. spontanea*. Tanaman padi yang dapat tumbuh baik di daerah tropis ialah *Indica*, sedangkan *Japonica* banyak diusahakan di daerah subtropis.

Menurut Siregar (1981) terdapat 25 spesies *Oryza*, yang terkenal adalah *O. sativa* dengan dua subspecies yaitu *Indica* (padi bulu) yang ditanam di Indonesia dan *Sinica* (padi cere). Padi dibedakan dalam dua tipe yaitu padi kering (gogo) yang ditanam di dataran tinggi dan padi sawah di dataran yang memerlukan penggenangan.

Tanaman padi termasuk golongan *graminae*, sejenis rumput yang berumpun. Dalam satu bibit dapat tumbuh anakan hingga dua puluh lebih anakan. Pada umumnya tanaman padi membutuhkan air dalam jumlah relatif banyak, namun tidak semua fase pertumbuhan membutuhkan air dalam jumlah yang sama. Tanaman padi memerlukan penyinaran matahari penuh tanpa naungan dan merupakan tanaman yang berumur pendek. Pertumbuhan tanaman padi dibagi dalam tiga fase, yaitu fase vegetatif (awal pertumbuhan sampai pembentukan bakal malai/primordial), fase generatif/reproduktif (primordial sampai pembungaan) dan fase pematangan (pembungaan sampai gabah matang). Fase vegetatif merupakan fase pertumbuhan organ-organ vegetatif, seperti penambahan jumlah anakan, tinggi tanaman, bobot dan luas daun. Lama fase reproduktif untuk kebanyakan varietas padi di daerah tropis umumnya 35 hari dan fase pematangan sekitar 30 hari. Perbedaan masa pertumbuhan ditentukan oleh lamanya fase vegetatif. Varietas IR 64 matang dalam 110 hari mempunyai fase vegetatif 45 hari, sedangkan IR 8 yang matang dalam 130 hari fase vegetatifnya 65 hari (Makarim dan Suhartatik, 2009).

Padi termasuk tanaman sereal terpenting di dunia dan sumber pati primer untuk lebih dari setengah populasi dunia (Yadav *et al.*, 2015), merupakan makanan pokok di berbagai negara tropis termasuk Indonesia. Di Indonesia, padi merupakan komoditas tanaman pangan andalan selain jagung, ubi kayu, ubi jalar dan kacang-kacangan. Diantara bahan pangan berkarbohidrat selain umbi-umbian dan batang palma, beras merupakan sumber kalori terpenting sebagai sumber energi bagi sebagian besar penduduk. Manfaat padi selain sebagai sumber energi juga bisa mengobati gangguan pencernaan, mengobati bisul, bengkak dan jerawat serta bisa diekstrak untuk obat flu dan kosmetik.

Produksi padi menempati urutan ketiga dari semua sereal setelah jagung dan gandum (Kharisma *et al.*, 2013). Produksi beras secara global belum mampu memenuhi permintaan populasi dunia yang meningkat setiap tahun (Khush dan Jena, 2009). Menurut penelitian dilakukan oleh IRRI pada masalah pangan populasi dunia, telah diprediksi bahwa 800 juta ton beras akan dibutuhkan pada tahun 2025 (Kubo dan Purevdoj, 2004).

Di Indonesia produktivitas padi pada tahun 2014 sampai 2015 mengalami peningkatan dari 51.35 ku/ha menjadi 54.41 ku/ha (BPS, 2016). Berdasarkan data Badan Pusat Statistik (2018) total luas panen tanaman padi nasional 10.903.835 ha dengan total produksi sebesar 56.537.774ton gabah kering giling (GKG). Tiga provinsi dengan produksi padi (GKG) tertinggi pada tahun 2018 terjadi di Provinsi Jawa Timur, Jawa

Barat dan Jawa Tengah dengan produksi masing-masing sebesar 10,54 juta ton, 9,54 juta ton dan 9,51 juta ton. Sulawesi Selatan menempati urutan ke empat dengan produksi sebesar 5.740.730 ton dengan luas panen 1.145.319 ha sehingga rata-rata produksi per hektar sebesar 5,01 ton/ha. Jumlah tersebut masih jauh dibandingkan dengan potensi hasil tanaman padi sawah, umumnya lebih dari 6 ton/ha. Produksi padi masih dianggap belum optimal untuk memenuhi kebutuhan masyarakat Indonesia. Selain karena strategi perdagangan, pemerintah masih melakukan impor beras dari negara lain untuk memenuhi kebutuhan masyarakat. Penurunan hasil padi dipengaruhi oleh faktor abiotik dan faktor biotik seperti iklim, ketersediaan air, kesuburan tanah, varietas yang digunakan, sistem pengelolaan tanaman, perkembangan hama dan penyakit.

B. Patogen Penyebab Penyakit Blas (*Pyricularia oryzae* Cav.)

1. Arti Ekonomis Penyakit Blas Padi

Penyakit blas padi (*rice blast disease*) disebabkan oleh cendawan *Pyricularia oryzae* Cav. [sinonim *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch]. Cendawan ini termasuk salah satu patogen penyebab utama yang mengancam produksi beras di seluruh dunia (Divya *et al.*, 2014). Penyakit ini merupakan masalah serius di lebih dari 85 negara yang terjadi pada seluruh area produksi padi dan dapat sangat merusak ketika lingkungan

cocok. Kerugian hasil yang diakibatkan oleh penyakit blas beragam dengan kerugian antara 10% hingga 30% dari panen padi tahunan (Skamnioti dan Gurr, 2009). Menurut Koutroubas *et al.* (2009), tanaman padi yang bergejala penyakit blas dengan intensitas tinggi akan mengalami penurunan bobot tanaman dan gabah. Menurut Hai *et al.* (2007), kehilangan hasil akibat penyakit blas terutama karena gejala patah leher berupa penurunan kuantitas gabah mencapai 38,2-64,57%, kuantitas malai mencapai 3,12-11,27% dan bobot 1.000 butir gabah mencapai 3,6-5,07%. Wang *et al.* (2014) melaporkan penurunan hasil padi di Jepang akibat penyakit blas sekitar 60%, di Brasil pernah mencapai 100%, India 7,5%, Korea 8%, Cina 14%, Filipina 67%, Vietnam 60%, Italia 24% dan Iran 50%. Kehilangan hasil secara ekonomi tidak dapat dihitung, tetapi data menunjukkan nilainya lebih dari 70 milyar dolar pada beberapa negara di Asia (Scheuermann *et al.*, 2012).

Di Indonesia, penyakit blas sudah menyebar di hampir semua sentra produksi padi (Sudir dkk., 2014). Tidak hanya menyerang pada tanaman padi gogo tetapi juga padi di lahan sawah tadah hujan dan lahan irigasi. Serangan penyakit ini di Indonesia berdasarkan data Kumulatif Luas Tambah Serangan (KLTS) musim kemarau 2012 mencapai 14.290 ha, sedangkan prakiraan serangan blas musim kemarau 2012/2013 meningkat hingga 19.177 ha, dengan luas sasaran tanam pada musim kemarau 2013 seluas 5.725.611 ha (Ulfah *et al.*, 2013). Wilayah dominan penyebaran blas yang telah dilaporkan di Indonesia meliputi Provinsi Jawa

Barat, Sumatera Selatan, Sumatera Utara, Kalimantan Tengah, Bali dan Nusa Tenggara Barat (Hasanuddin, 2004). Total luas serangan penyakit blas pada 24 kabupaten/kota di Sulawesi Selatan dari tahun 2004-2013 mencapai 12.056 ha. Total luas serangan blas tertinggi terdapat pada tiga kabupaten yaitu Kabupaten Sinjai (5.993 ha), Kabupaten Maros (1.814 ha) dan Kabupaten Bone (1.023 ha) (BPTPH Sulsel, 2014). Balai Besar Penelitian Padi (2015), melaporkan bahwa luas serangan penyakit blas dapat mencapai luas 1.285 juta ha atau sekitar 12% dari total luas areal pertanaman padi di Indonesia. Kehilangan hasil pada varietas rentan dapat mencapai 50-90% atau dapat menggagalkan panen (Rais *et al.*, 2001).

2. Sistematika *P. oryzae*

Klasifikasi cendawan *P. oryzae* antara lain: Domain: Eukaryota, Kingdom: Fungi, Filum: Ascomycota, Subfilum: Pezizomycotina, Kelas: Sordariomycetes, Subkelas: Sordariomycetidae, Ordo: Magnaporthales, Famili: Pyriculariaceae, Genus: *Pyricularia*, Spesies: *Pyricularia oryzae* Cavara (1892). Sinonim cendawan ini antara lain : *Dactylaria oryzae* (Cavara) Sawada, (1917) dan *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch (2002) (EPPO, 2020). **Nama umum internasional:** **Inggris:** blast of rice, gray leaf spot of perennial ryegrass, johnson spot of banana, neck blast; pitting disease, rice rotten neck, rice seedling blight; ryegrass blast; wheat blast; **Spanyol:** anublo del arroz, mancha johnson del platano, piriculariosis, quema del arroz; **Perancis:** brunissure du riz, pyriculariose du riz;

China: tao je ping; **Portugal:** brusone. **Nama umum lokal:**
Brasil: brusone; **Jerman:** Brusone-Krankheit: Reis, Fleckenkrankheit:
 Reis, Reisbräune, Reimbrennen; **India:** jhulsa; **Indonesia:** blas;
Iraq: shara; **Italy:** brusone; **Jepang:** imochi; **Korea:** byeo do yeol byung;
Malaysia: karah; **Vietnam:** bênh dao ôn (CABI, 2020).

Magnaporthales adalah ordo cendawan terdiri dari patogen tanaman (parasit) dan saprofit yang sebagian besar ditemukan pada rumput dan juga pada kayu yang terendam (Thongkantha *et al.*, 2009). Secara filogenetis Magnaporthales berisi tiga famili yaitu Magnaporthaceae, Ophiocercaceae dan Pyriculariaceae. Tetapi ketiga famili tersebut secara morfologis dan ekologis berbeda (Klaubauf *et al.*, 2014). Ophiocercaceae terutama terdiri dari spesies saprobik terkait perairan atau kayu (Klaubauf *et al.*, 2014). Magnaporthaceae dan Pyriculariaceae terutama merupakan spesies patogen tanaman. Secara khusus, genera *Pyricularia* (Pyriculariaceae) dan *Gaeumannomyces* (Magnaporthaceae) mengandung beberapa spesies yang merupakan patogen tanaman penting dalam bidang ekonomi dan pertanian (Luo dan Zhang, 2013).

Pyriculariaceae sebagian besar merupakan patogen rumput dan menyebabkan penyakit blas. Cendawan ini adalah bagian dari spesies kompleks yang dapat menyebabkan penyakit blas pada sekitar 50 spesies rumput (*Poaceae* dan *Cyperaceae*), termasuk padi (*Oryza sativa*), gandum (*Triticum aestivum*), barley (*Hordeum vulgare*), jagung (*Zea*

mays), gandum (*Avena sativa*), gandum hitam (*Secale cereale*), millet jari (*Eleusine corocana*) dan ryegrass abadi (*Lolium perenne*) (Skamnioti dan Gurr, 2009). Pyriculariaceae menghasilkan perithecia dengan leher silinder panjang, menyatukan asci pendek dengan cincin apikal besar dan askospora mirip dengan Magnaporthaceae lainnya. Morfologi aseksual menghasilkan konidia hialin atau coklat pada konidiofor bercabang sederhana dan juga membentuk appressoria (Klaubauf *et al.*, 2014; Luo *et al.*, 2015). Spesies yang paling banyak dipelajari di Pyriculariaceae tentu saja *P. oryzae* (sinonim *Magnaporthe oryzae*) yang menyebabkan penyakit blas pada padi dan tanaman sereal lainnya di seluruh dunia. Cendawan dalam kelompok ini memiliki kemampuan untuk menginfeksi semua bagian tanaman inang dan kadang-kadang juga berakar (Sesma dan Osbourn, 2004).

Nama *Pyricularia grisea* Sacc. muncul lebih awal (1880) sebagai spesies yang patogen pada rumput *Digitaria sanguinalis*. Cavara (1891) menggambarkan cendawan yang ditemukan pada padi di Italia sebagai *P. oryzae* dengan morfologi yang mirip dengan *P. grisea*. Kedua spesies tersebut memiliki teleomorf yang sama pada awalnya, yaitu *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr (Ou, 1985). Rossman *et al.* (1990) menempatkan *P. oryzae* sebagai sinonim dari *P. grisea*. Sampai saat ini, ada kebingungan mengenai nama yang benar dari patogen blas padi, karena kedua nama *P. oryzae* dan *P. grisea* sering digunakan secara sinonim (Choi *et al.*, 2013). Studi di era pra-molekuler (sebelum sekitar 1995)

menggunakan karakter morfologis, lintas patogenesisitas dan ketidakcocokan seksual untuk membedakan *P. grisea* dan *P. oryzae*. Sebagai contoh, Thomas (1940) menemukan bahwa *P. oryzae* dari padi dapat menginfeksi gandum (*Triticum aestivum*), gandum (*Avena sativa*), gandum (*Hordeum vulgare*), jagung (*Zea mays*), millet Italia (*Setaria italica*) dan rumput rumput Mesir (*Dactyloctenium aegyptiacum*), sedangkan isolat *P. oryzae* dari millet Italia dan *Eleusine coracana* gagal menginfeksi padi (*Oryza sativa*). Pada 1970-an, keadaan teleomorfik *P. grisea* dan *P. oryzae* ditemukan di beberapa laboratorium. Pada saat itu, banyak nama dapat diterapkan pada satu spesies jamur tunggal dan Hebert (1971) memberi nama *Ceratosphearia grisea* ke keadaan teleomorfik *P. grisea*. *C. grisea* menghasilkan perithecia hitam non-stromatik dengan leher panjang dan selosida berbentuk *spindle* berbentuk empat. *C. grisea* kemudian dipindahkan ke *Magnaporthe grisea* (Barr, 1977) dan kedua nama ini sekarang dianggap sinonim dari *P. grisea*.

Kato (2000) membandingkan patogenesisitas, kemampuan kawin dan pembatasan polimorfisme panjang fragmen dengan probe DNA satu salinan dari 85 isolat *Pyricularia* dari 29 inang. Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat *Pyricularia* dari *Digitaria* spp. secara genetik berbeda dari isolat padi dan spesies tanaman lainnya. Menurut Couch dan Kohn (2002), *Pyricularia* pada rumput liar dan padi merupakan spesies terpisah. Couch dan Kohn (2002) menganalisis data urutan DNA dari tiga lokus genetik (aktin, beta-tubulin dan kalmodulin) dan menemukan bahwa

isolat *P. grisea* dari *Digitaria* spp. berada di *clade* yang secara filogenetik berbeda dari isolat dari padi dan rumput lainnya. *P. grisea* merupakan patogen pada *Digitaria* spp. (*Digitaria horizontalis* dari Brazil, *D. smutzi* dari Jepang, dan *Digitaria* sp. dari USA dan Cina), dengan teleomorfnya ialah *M. grisea*, sedangkan *P. oryzae* merupakan spesies yang patogen pada padi dan berbagai anggota Graminae (serealia dan rumput) yang dibudidayakan. Mereka selanjutnya menyimpulkan bahwa patogen blas pada padi adalah *P. oryzae*, sedangkan *P. grisea* terbatas pada *Digitaria*. Teleomorf *P. oryzae*, yaitu *Magnaporthe oryzae* B. Couch. *M. oryzae* ditempatkan sebagai anggota *M. grisea* spesies kompleks. Serealia dan rumput budidaya tersebut adalah *Eleusine coracana* (*finger millet*), *Eleusine indica*, *Eragrostis curvula*, *Lolium perenne*, *Setaria* sp. Selanjutnya, *M. grisea* kompleks (*M. oryzae*) digunakan sebagai nama cendawan penyebab blas pada padi dan beberapa anggota *Graminae* lainnya (Motallebi *et al.*, 2009).

Sejak 1 Januari 2013, satu cendawan hanya dapat memiliki satu nama yang benar (Hawksworth *et al.*, 2013) dan nama lain dianggap sinonim. Berdasarkan kode tata nama saat ini untuk ganggang, cendawan dan tanaman (Barrie *et al.*, 2012), semua nama cendawan yang sah diperlakukan sama untuk tujuan menetapkan prioritas taksonomi (Wingfield *et al.*, 2012). Nama yang benar dari cendawan blas padi telah diperdebatkan selama lebih dari tiga puluh tahun. Luo dan Zhang (2013) menganalisis sekuen DNA dari banyak gen termasuk SSU, LSU, ITS,

MCM7, RPB1 dan TEF1 jamur dalam urutan *Magnaporthales* termasuk *Magnaporthe*, *Gaeumannomyces* dan *Pyricularia*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Magnaporthe salvinii*, jenis spesies *Magnaporthe* (Krause dan Webster, 1972), berada dalam *clade* yang berbeda dari patogen blas padi, *P. oryzae*. Akibatnya, *Magnaporthe salvinii* yang menyebabkan busuk batang padi disinonimkan dengan *Nakataea oryzae* (Cattaneo) J. Luo & Zhang, berdasarkan prioritas.

3. Morfologi dan Biologi Blas Padi

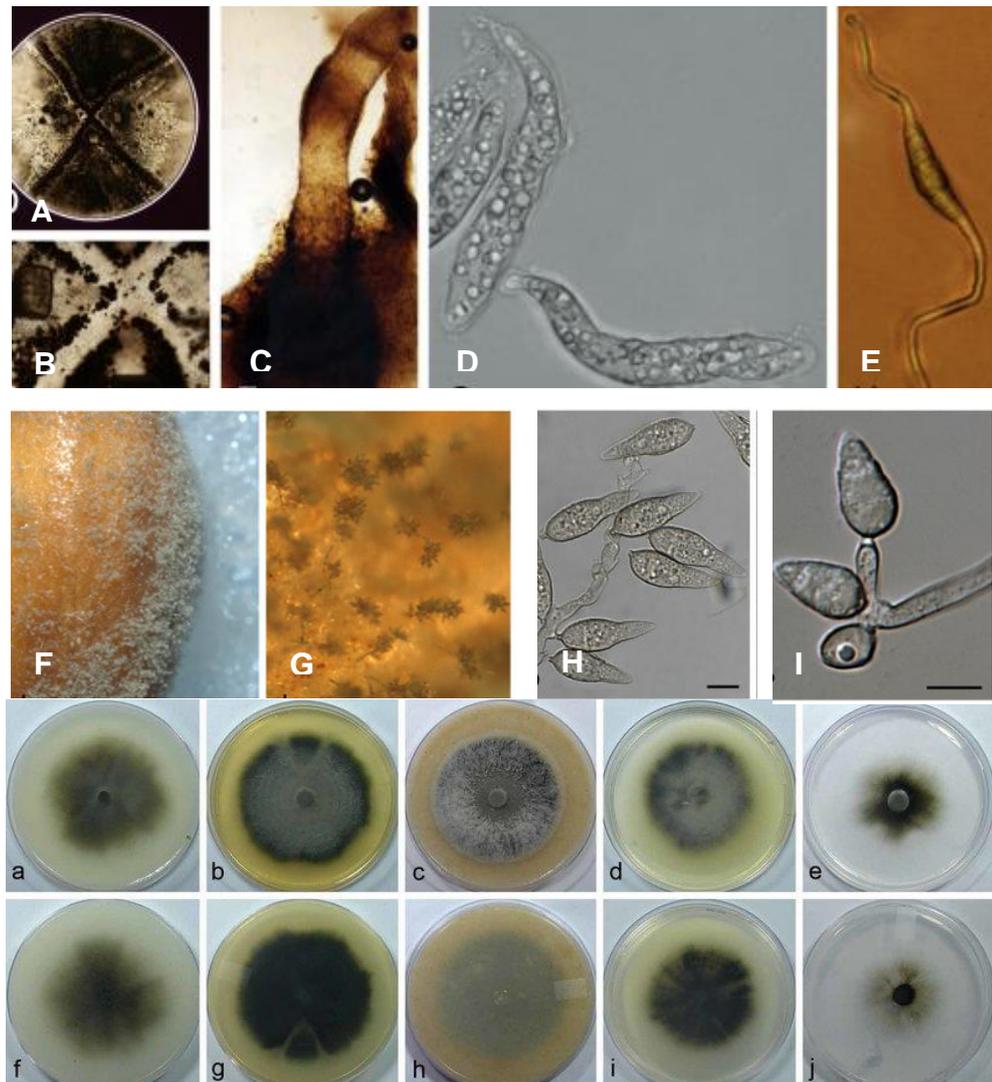
Di seluruh dunia, cendawan blas yang ditemukan di lapang ialah anamorfnya (bentuk aseksual) (Kato *et al.*, 2000). Teleomorf (bentuk seksual) tidak pernah ditemukan di lapang, meskipun terdapat indikasi keberadaan siklus seksual di lapang berdasarkan penanda molekuler *repeat-induced point mutation* (RIP) (Ikeda *et al.*, 2002). Teleomorf yaitu *Magnaporthe oryzae* Couch hanya dihasilkan dengan pengkulturan di laboratorium dari penyilangan dua isolat yang membawa jenis *mating type* berbeda dan salah satu isolat tersebut bersifat hermaprodit (Zeigler, 1998; Agrios, 2005 dalam Sucipto, 2016). Sehingga cendawan ini bersifat heterotalik dengan sistem kawin bipolar (dikendalikan oleh dua alel yang berbeda pada lokus tunggal) dengan gen tambahan mengendalikan siklus seksual (Tebeest, 2007).

Tahap aseksual disebut *P. oryzae* merupakan bentuk spora yang paling umum ditemukan, dapat ditemukan pada luka atau gejala dari penyakit ini. Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa secara

morfologi, cendawan *P. oryzae* mempunyai konidia berbentuk seperti buah pir atau bulat lonjong (*pyriform*), hialin dan bersekat dua atau mempunyai tiga ruang yang diproduksi di apex pada konidiofor (Barnett dan Hunter, 1998 *dalam* Nurfadillah, 2016). Konidiofor panjang bersekat-sekat, jarang bercabang, tunggal dan membentuk konidium pada ujungnya. Ukuran konidium *P. oryzae* berkisar antara 19-23 μm \times 7-9 μm . Ukuran dan bentuk konidia berbeda-beda tergantung dari ras patogen dan kondisi lingkungan. Kondisi lingkungan yang optimum untuk infeksi dan sporulasi, kelembapan 95% dengan suhu 26-27 °C (Ou, 1985).

P. oryzae menghasilkan spora seksual (askospora) dalam struktur yang disebut asci dan diklasifikasikan kedalam famili Magnaporthaceae (Gambar 2 A-E). Asci ditemukan dalam struktur khusus disebut perithecia. Miselium dari *Magnaporthe oryzae* ini bersepta dan spora cendawan ini bersifat haploid.

Media PDA dilaporkan memberikan pertumbuhan maksimum pada cendawan blas dibanding dengan media lain seperti media Richard's agar dan host extract + 2% sukrosa (Meena, 2005). Koloni cendawan *P. oryzae* pada media PDA menunjukkan pertumbuhan yang baik pada suhu ruang dan optimum pada kisaran suhu 25-30 °C. Koloni isolat *P. oryzae* biasanya ditandai berwarna abu-abu sampai abu-abu kehitaman dengan



Gambar 2. Morfologi kultur dan mikroskopis *Pyricularia oryzae*. **A-E**. Morfologi seksual *P. oryzae*. **A, B**. Persilangan berbagai jenis *P. oryzae* untuk menghasilkan morfologi seksual **C**. Ascoma **D**. Asci **E**. Perkecambahan ascospore. **F-I**. Morfologi aseksual. **F, G**. Sporulasi pada biji jelai steril SNA **H**. *P. oryzae* (URM7369) **I**. *P. oryzae* (BF0028). Scale bars: F = 50 μm ; others = 10 μm . **a - j**. Kultur isolat 10880 ditanam selama 7 hari pada 12 jam foto periode suhu 25 $^{\circ}\text{C}$ dalam media. **a, f** (CMA). **b, g** (MEA). **c, h** (OA). **d, i** (PDA). **e, j** (SNA) Gambar A, B, D foto diambil oleh Dounia Saleh, CIRAD; C, E diambil oleh Didier Tharreau, CIRAD; F, I dari Klaubauf *et al.* (2014); G, H, a-j dari Castroagudín *et al.* (2016)

tekstur koloni beludru. Beberapa isolat menampilkan pinggiran koloni yang lebih halus namun ada juga yang tidak teratur. Pada umumnya miselia cendawan *P. oryzae* mempunyai bentuk lingkaran seperti cincin konsentris yang mengarah ke pusat (Gambar 2a-j). Variasi morfologi isolat cendawan *P. oryzae* penting dari sudut pandang biologi patogen.

4. Gejala Penyakit Blas Padi

Penyakit blas umumnya menyerang tanaman padi pada bagian daun dan leher malai. Penyakit blas yang menyerang daun disebut sebagai blas daun (*leaf blast*) dan yang menyerang leher malai disebut blas leher (*neck blast*) (Santoso *et al.*, 2007). Selain itu blas dapat juga menyerang bagian lain tanaman padi yaitu buku batang (*node blast*), bulir padi (*spikelet blast*) dan kolar daun (*collar rot*) (Yuliani dan Maryana 2014; Sudir *et al.*, 2014; BB Padi, 2015). Gejala penyakit blas yang parah di bagian buku tanaman padi dapat menyebabkan batang patah dan kematian pada bagian batang di atas buku yang terinfeksi (Sudir *et al.*, 2014; Taufik, 2011). Gejala penyakit blas pada berbagai bagian tanaman padi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Gejala blas pada berbagai bagian tanaman padi. Blas daun (**a-b**); blas kolar (**c-d**); blas leher malai (**e-f**), blas buku batang (**g-h**) dan infeksi pada bulir (**i**) (National Diagnostic Protocol, 2015; gambar a, c–e, g oleh Groth; b, f, h oleh Cartwright; i oleh TeBeest) (Khemmuk, W., 2016)

Ou (1985) mengemukakan perkembangan penyakit blas pada tanaman adalah sebagai berikut: bentuk khas bercak blas adalah elips dengan ujungnya agak runcing seperti belah ketupat. Bercak yang telah berkembang, bagian tepi berwarna coklat dan bagian tengah berwarna putih keabu-abuan. Bentuk dan warna bercak bervariasi tergantung pada keadaan sekitarnya, kerentanan varietas dan umur bercak. Gejala bercak daun blas mulai terlihat pada saat tanaman padi berumur 40 hari setelah tabur benih. Bercak bermula kecil berwarna hijau gelap, abu-abu sedikit kebiru-biruan. Bercak ini terus membesar pada varietas yang peka, khususnya bila dalam keadaan lembab. Bercak yang telah berkembang penuh mencapai 1-1,5 cm dan lebar 0,3-0,5 cm dengan tepi berwarna coklat. Bercak pada daun varietas peka tidak membentuk tepi yang jelas,

utamanya dalam keadaan lembap dan ternaungi. Bercak tersebut dikelilingi oleh warna kuning pucat (halo area). Bercak tidak akan berkembang dan tetap seperti titik kecil pada varietas yang tahan. Bercak akan berkembang sampai beberapa milimeter berbentuk bulat atau elips dengan tepi warna coklat pada varietas dengan reaksi sedang. Jika beberapa bercak daun tumbuh meluas dan menyatu maka daun-daun padi yang terinfeksi menjadi kering dan tanaman mati. Infeksi pada leher malai menyebabkan pangkal malai menjadi busuk berwarna coklat keabu-abuan mengakibatkan malai patah dan gabah hampa. Faktor kelembapan sangat penting untuk timbulnya gejala blas, baik pada daun maupun pada leher malai (Santoso dan Anggiani, 2008).

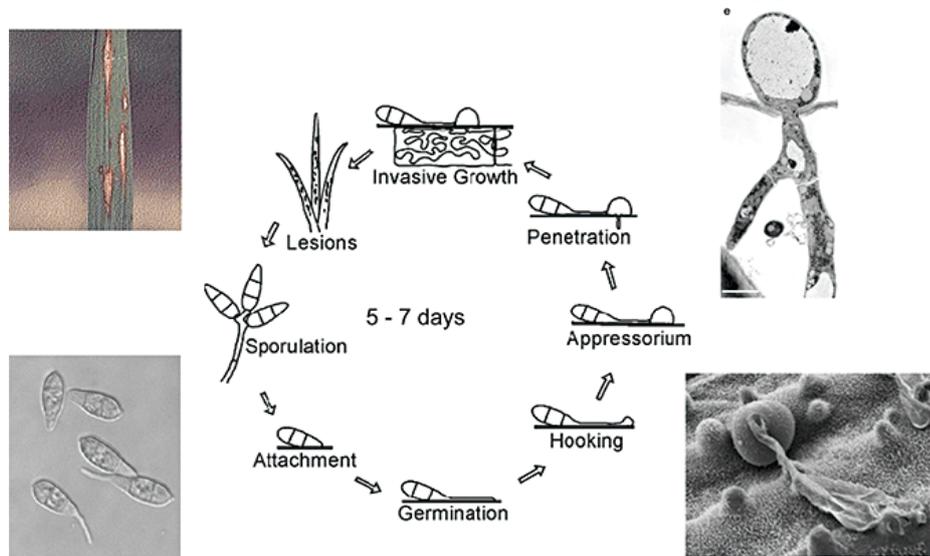
Pada stadia generatif, terutama pada saat pengisian biji, sering ditemukan gejala penyakit blas pada leher malai. Malai padi yang terinfeksi parah oleh patogen blas menimbulkan gejala busuk kering pada leher malai. Gejala penyakit blas pada leher malai berwarna coklat kehitaman (gosong) seperti terkena letupan api (*blast*). Pada kondisi penularan yang parah, leher malai menjadi busuk, kering dan mudah patah sehingga aliran fotosintesis ke bulir terhambat. Apabila malai terinfeksi pada stadia masak susu maka bulir padi banyak yang hampa. Gejala blas juga terdapat pada bagian kolar daun. Makin tinggi intensitas penyakit, makin banyak leher malai yang patah dan jatuh, sehingga makin banyak pengurangan hasil panen. Penyakit blas leher malai pada varietas rentan dapat mengakibatkan kehilangan hasil sampai 100% (Suganda *et*

al., 2016). Pada kondisi lingkungan yang mendukung, varietas padi yang terinfeksi parah dengan tingkat intensitas yang tinggi, baik oleh penyakit blas daun maupun blas leher malai, dapat menyebabkan tanaman puso (Nasution dan Usyati 2015). Yuliani dan Maryana (2014) melaporkan penyakit blas pada tahun 2005 merusak pertanaman padi varietas Fatmawati hingga mengalami puso seluas 500 ha di Tulang Bawang, Lampung. Pada lahan sawah irigasi, kehilangan hasil akibat blas leher malai lebih tinggi daripada blas daun (Teng *et al.*, 1991).

5. Siklus Hidup dan Proses Infeksi *P. oryzae*

P. oryzae menghasilkan konidia udara yang menginfeksi daun dan malai tanaman inang (Murata *et al.*, 2014). Siklus hidupnya terdiri dari serangkaian langkah perkembangan diskrit (Gambar 4): perlekatan konidia, perkecambahan spora, pengembangan tabung kecambah, pembentukan appressorium, munculnya pasak penetrasi dan pertumbuhan invasif pada tanaman inang (Galhano dan Talbot, 2011). Lesi muncul setelah 5-7 hari lalu konidiofor dan konidia dapat diproduksi setelah 20 hari (Saleh *et al.*, 2012). Di bawah kondisi kelembapan dan suhu yang menguntungkan (periode lama permukaan basah tanaman, kelembapan tinggi, sedikit atau tidak ada angin pada suhu malam dan malam hari antara 12-32°C, siklus infeksi berulang karena daun yang baru dikembangkan bertindak sebagai reseptor, dengan 20.000-60.000 spora berpotensi dihasilkan dari satu lesi dalam satu malam (Kato, 2001). Konidia dilepaskan dari bercak pada daun maupun leher malai, dimulai

pada dini hari antara pukul 02.00 hingga 06.00, terutama dalam kondisi angin (TeBeest *et al.*, 2007).



Gambar 4. Siklus infeksi *P. oryzae* pada tanaman padi (Dean *et al.*, 2012)

a. Proses inisiasi.

P. oryzae membutuhkan kondisi yang menguntungkan, khususnya kelembapan permukaan, kelembapan, suhu dan cahaya, selama tahap awal proses infeksi (Struck, 2006). Infeksi dimulai oleh konidia yang mendarat di permukaan daun. Konidia menempel pada permukaan tanaman karena adanya perekat atau getah yang dihasilkan (*spore tip mucilage*). Pada suhu optimum kemampuan melekatnya spora juga dipengaruhi dengan adanya gaya adhesi yang terjadi akibat interaksi hidrofobik antara *P. oryzae* dengan permukaan tanaman inangnya hingga terjadi perkecambahan spora. Konidia berkecambah dengan membentuk tabung terpolarisasi dalam waktu dua jam (Talbot, 2003). Selama

perpanjangan tabung konidia, sekelompok vesikel sitoplasma terbentuk di dekat sel puncak konidium (Bourett dan Howard, 1990). Tabung konidia membengkak selama 6-10 jam berikutnya dan berdiferensiasi menjadi appressorium (Galhano dan Talbot, 2011). Appressoria adalah struktur yang digunakan spesies patogen untuk menempel pada permukaan tanaman dalam persiapan infeksi. Appressoria uniseluler, berbentuk kubah dan menghasilkan turgor seluler, yang diterjemahkan menjadi kekuatan mekanik yang memecahkan kutikula daun, memungkinkan penetrasi jaringan tanaman (Talbot, 2003; Ebbole, 2007). Setelah appressoria berdiferensiasi, jaringan tanaman sering menjadi berpigmen gelap karena pembentukan lapisan melanin yang berbeda di dinding sel (Talbot, 2003; Ebbole, 2007). Turgor penekan dihasilkan oleh akumulasi gliserol hingga konsentrasi tinggi di dalam sel yang terinfeksi, yang mengarah ke peningkatan tekanan dan pecahnya kutikula tanaman inang (de Jong *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1999). Cendawan kemudian menyebar ke seluruh sel melalui plasmodesmata.

b. Penetrasi dan pertumbuhan invasif.

Penetrasi jaringan inang terjadi dalam 10-14 jam produksi appressorium (Zeigler, 1998). Hifa invasif berkembang dari pasak penetrasi dan tumbuh di dalam inang tanaman, bergerak dari sel ke sel tanpa menyebabkan gejala pada kultivar padi yang rentan dalam 4-5 hari pertama setelah penetrasi (Kankanala *et al.*, 2007). Lesi nekrotik kemudian berkembang di permukaan daun, tempat diproduksi spora

untuk melanjutkan siklus hidup. Hifa invasif berserabut membesar menjadi hifa bulat. Sel-sel yang diinvasi hidup ketika cendawan memasuki sel tetapi kemudian mati saat sel-sel penuh dengan hifa (Fernandez dan Wilson, 2014). Kankanala *et al.* (2007) menunjukkan bahwa hifa invasif bulat mengisi sel pertama setelah 8-12 jam pasca inokulasi, sebelum menyebar ke sel tetangga setelah 32-36 jam. Selanjutnya hifa invasif tumbuh lebih cepat dari satu sel ke sel berikutnya, hanya membutuhkan 2-3 jam untuk pindah ke sel tetangga. Bercak blas yang terdapat pada permukaan daun membawa konidiofor-konidiofor yang dapat menghasilkan sampai dengan 2.000 spora per malam dan berlangsung selama 10-20 hari (Wilson & Talbot, 2009).

6. Epidemiologi Penyakit Blas Padi

Penyebaran penyakit blas sangat luas dan bersifat destruktif jika kondisi lingkungan menguntungkan (Scardaci *et al.*, 1997). Namun epidemi penyakit hanya berkembang apabila terjadi kombinasi dan perkembangan yang baik dari banyak faktor lingkungan (seperti kelembapan, suhu dan angin) yang bertepatan dengan tingkat kerentanan tanaman serta virulensi patogen (produksi, penyebaran, inokulasi, penetrasi, infeksi dan reproduksi) (Agrios, 1996 *dalam* Yuliani dan Maryana, 2014).

a. Penyebaran.

Konidia *P. oryzae* biasanya menyebar melalui udara atau percikan air hujan. Terdapat dua jenis penyebaran konidia, penyebaran lokal sekitar 1–5 m atau penyebaran jarak jauh (Tharreau *et al.*, 2009). Penyebaran jarak jauh dimungkinkan melalui pengangkutan benih atau manusia yang terinfeksi. Phillips *et al.* (1992) memperkirakan 240.000 konidia.

Konidia yang menyebar melalui udara adalah cara penyebaran yang paling penting, meskipun cendawan ini juga dapat menyebar melalui benih, sisa jerami, gabah sakit dan air irigasi yang terinfeksi (Ou, 1972). Jarak tempuh penyebaran konidia yang terbawa angin dapat mencapai 2 km (Ou, 1985). Banyaknya spora yang tertangkap oleh daun tergantung pada kecepatan angin dan posisi daun/sudut daun. Makin besar sudut daun makin banyak spora yang tertangkap (Ou, 1985).

Penyebaran spora terjadi selain oleh angin juga oleh benih dan jerami sakit. Cendawan *P. oryzae* mampu bertahan dalam sisa jerami dan gabah sakit. Dalam keadaan kering dan suhu kamar, spora masih bertahan hidup sampai satu tahun sedangkan miselia mampu bertahan sampai lebih dari tiga tahun. Sumber inokulum primer di lapangan umumnya adalah jerami. Suwandi *et al.* (2016) menyatakan bahwa sisa-sisa jerami tanaman sakit di lapangan dapat menjadi sumber inokulum bagi tanaman musim berikutnya. Sumber inokulum benih umumnya memperlihatkan gejala awal dalam persemaian. Untuk daerah tropis,

sumber inokulum selalu ada sepanjang tahun karena adanya spora di udara dan tanaman inang lain selain padi (Santoso dan Anggiani, 2008).

b. Pengaruh lingkungan pada penyakit blas padi.

Perkembangan penyakit blas juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan yaitu kesuburan tanah dan kelembapan udara. Secara umum, periode lama daun basah, kelembapan relatif tinggi dan suhu 17-28 °C mendukung perkembangan *P. oryzae* (Greer dan Webster, 2001). Kisaran suhu kritis untuk penetrasi dan pembentukan infeksi adalah sekitar 25-26 °C, sedangkan perkecambahan spora dan pembentukan appressoria terjadi dalam 6-10 jam pada 20-30 °C dengan adanya air/embun pada permukaan daun (Asuyama, 1965; Ou, 1985). Suhu tinggi (sekitar 32 °C) meningkatkan ekspansi lesi, terutama dalam delapan hari pertama setelah infeksi. Pembesaran lesi lambat dan konstan selama periode 20 hari pada suhu yang lebih rendah (16 °C).

P. oryzae bertahan hidup di tanaman hidup dari satu musim panen ke musim tropis. Di daerah beriklim sedang, *P. oryzae* bertahan hidup pada residu tanaman, biji yang sakit atau pada jerami sebagai sumber inokulum (Kato, 2001). Miselium *P. oryzae* dapat tetap hidup pada 18-32 °C hingga tiga tahun. Konidia dilaporkan dapat bertahan setelah satu tahun pada suhu 8 °C dan kelembapan relatif 20% (Zeigler, 1995). Menurut Santoso dan Nasution (2008), suhu optimum untuk infeksi sama dengan suhu optimum yang diperlukan untuk pertumbuhan miselia, sporulasi dan perkecambahan spora.

Faktor kelembapan baik dalam bentuk hujan, embun atau kelembapan relatif merupakan faktor yang sangat membantu perkembangan penyakit blas. Pada wilayah dengan kelembapan udara >90% tanaman mengalami masa berembun yang panjang (*dew period*). Hal ini mendukung perkembangan blas. Hujan lebat yang terjadi dalam waktu singkat tidak membantu perkembangan penyakit blas. Sebaliknya, hujan rintik-rintik tetapi lama merupakan kondisi yang menguntungkan bagi blas untuk berkembang dan menginfeksi tanaman (Amir dan Nasution, 1993). Spora pada umumnya dilepaskan pada dini hari antara pukul 02.00-06.00 dimana kondisi udara masih lembap (TeBeest *et al.*, 2007). Pelepasan spora di daerah tropis juga terjadi pada siang hari setelah turun hujan. Peranan air hujan sangat penting untuk pelepasan spora.

Kelembapan udara dan kelembapan tanah mempengaruhi patogenisitas dan pertumbuhan cendawan. Serangan penyakit blas lebih berat pada lahan kering daripada lahan sawah, namun tergantung pada varietas padi yang ditanam. Kelembapan udara mempengaruhi perkembangan bercak. Peran kelembapan udara baik iklim makro maupun mikro serta pembentukan embun sangat menentukan perkembangan penyakit blas. Di pesemaian, terjadinya infeksi di bagian tengah lebih berat dibandingkan bagian pinggir. Faktor naungan memiliki pengaruh terhadap perkembangan bercak. Pesemaian dalam rumah kaca, akan lebih rentan apabila kondisi lingkungan sedikit teduh dan ternaungi.

Patogen blas berkembang biak dengan cepat pada tanaman padi yang berjarak tanam rapat. Pada jarak tanam yang rapat memiliki kelembapan udara mikro yang tinggi. Kecepatan pertumbuhan cendawan *P. oryzae* juga akan semakin tinggi jika pemupukan urea dilakukan secara berlebihan (Yuliani dan Maryana, 2014).

Cahaya dan naungan juga mempengaruhi infeksi atau perkembangan patogen. Proses penetrasi lebih cepat dalam keadaan gelap, tetapi untuk perkembangan selanjutnya memerlukan cahaya. Hemi dan Imura (1989) meneliti pengaruh cahaya sebelum dan sesudah inokulasi terhadap periode inkubasi dan hasilnya adalah panjang periode inkubasi LL > LD > DL > DD, dimana LL = cahaya terus-menerus, sebelum dan sesudah inokulasi, LD = cahaya sebelum inokulasi dan gelap sesudahnya, DL = gelap sebelum inokulasi dan cahaya sesudahnya, DD = gelap terus-menerus sebelum dan sesudah inokulasi, sedang tingkat infeksi adalah DL > LD > DD.

Pasokan nitrogen yang tinggi adalah faktor lain yang meningkatkan kerentanan penyakit (Ballini *et al.*, 2013). Dosis pupuk nitrogen (N) berkorelasi positif dengan intensitas serangan blas, semakin tinggi dosis pupuk N keparahan penyakit blas semakin tinggi. Makin cepat tersedianya hara N bagi tanaman misalnya ZA, makin cepat pula meningkatnya serangan blas (Sudir *et al.*, 2002). Pada tanah lempung, serangan blas lebih ringan dari pada tanah berpasir (Amir dan Kardin 1991). Pada umumnya pengaruh N terhadap sel epidermis adalah permeabilitas air

dan menurunnya kadar unsur silika, sehingga cendawan mudah melakukan penetrasi. Namun pada varietas yang tahan pengaruh pupuk N tidak banyak berpengaruh (Nandy *et al.*, 2010). Pengaruh pupuk silika telah banyak diteliti dan umumnya pengaruh silika terutama pada ketahanan fisik tanaman, khususnya sel-sel epidermis. Akan tetapi unsur silika tidak mampu menahan perkembangan cendawan setelah terjadi proses penetrasi dalam jaringan daun (Ou, 1985).

c. Epidemi Penyakit Blas Di Indonesia

Epidemi penyakit blas di Indonesia yang semula terjadi pada tanaman padi gogo, sejak awal tahun 1985 telah berstatus sebagai penyakit utama padi di lahan sawah tadah hujan dan pada awal tahun 2000 berkembang di lahan irigasi. Sudir *et al.* (2014) melaporkan penyakit blas sudah menyebar di hampir semua sentra produksi padi di Indonesia. Beberapa areal persawahan beririgasi yang dilaporkan terjangkit penyakit blas adalah Subang, Karawang, Indramayu, Garut dan Sukabumi di Jawa Barat, seluruh kabupaten penghasil padi pada lahan sawah irigasi dan tadah hujan dataran rendah di Jawa Tengah, Lamongan, Jombang, Mojokerto, Pasuruan, Probolinggo serta Lumajang di Jawa Timur (Sudir *et al.*, 2013; Yulianto *et al.*, 2014). Penyakit blas juga berkembang di Lampung, Sumatra Selatan, Jambi, Sumatera Barat, Sulawesi Tengah, Sulawesi Tenggara dan Sulawesi Selatan serta di Kalimantan Tengah dan Kalimantan Selatan (Amir *et al.*, 2003; Suganda *et al.*, 2016). Penyakit blas, khususnya blas leher, perlu mendapat perhatian yang lebih serius

karena ditemukan pada tingkat intensitas penularan yang tinggi pada beberapa sentra pertanaman padi di Indonesia, yang saat ini telah menjadi daerah endemis penyakit blas (Sudir *et al.*, 2013).

Mew *et al.* (1986) menyatakan intensitas penyakit blas yang terjadi di lahan sawah tadah hujan berbeda antar musim tanam dan antar daerah. Agroekosistem lahan sawah tadah hujan yang miskin unsur hara dengan curah hujan yang kurang menjadi lingkungan yang sesuai bagi perkembangan patogen blas. Keparahan penyakit blas yang berat hingga mengakibatkan tanaman puso lebih sering terjadi pada lahan sawah tadah hujan.

7. Inang Alternatif Penyakit Blas Padi

P. oryzae spesies kompleks (Couch & Kohn, 2002) menyebabkan penyakit blas pada banyak tanaman budidaya di seluruh dunia (Urashima *et al.*, 1993), termasuk gandum (Igarashi *et al.*, 1986; Castroagudin *et al.*, 2016), jagung (Bailey dan Eijnatten, 1961), millet (Kato *et al.*, 1976), beras (Cavara, 1891) dan jelai (Okada dan Yaegashi, 1985). Saat ini, lebih dari 50 spesies Poaceae telah dilaporkan sebagai inang *P. oryzae*, sebagian besar merupakan tanaman monokotil, khususnya dalam famili Commelinaceae, Cyperaceae, Poaceae dan Zingiberaceae (Park dan Shin, 2009).

Oleh karena itu, padi gogo yang ditanam satu kali dalam satu tahun selalu mendapat infeksi blas. Walaupun dalam suatu periode tidak ada pertanaman padi, namun di sekitar lahan tersebut terdapat gulma yang

menjadi inang patogen blas yang berperan sebagai sumber inokulum pada padi gogo. Selain gulma-gulma tersebut, sumber spora juga banyak yang berasal dari sisa-sisa jerami padi yang terinfeksi penyakit blas.

C. Interaksi Tanaman Padi dan Patogen *P. oryzae*

Kemampuan penyerangan patogen dipengaruhi oleh faktor virulensi yang dimiliki oleh ras patogen blas tertentu. Mekanisme penyerangan patogen terjadi berdasarkan interaksi *gene-to-gene* antara gen ketahanan blas pada tanaman inang dan gen virulen (*avr*) pada patogen blas. Pada tanaman inang umumnya gen yang memberikan respon tahan bersifat dominan (R) sedangkan gen yang memberikan respon rentan bersifat resesif (r). Sementara itu pada patogen, gen avirulen (tidak memiliki kemampuan untuk menginfeksi) bersifat dominan (*Avr*) sedangkan gen virulen (mampu menginfeksi) bersifat resesif (*avr*). Pada interaksi *Avr-R* bersifat *incompatible* artinya tanaman inang memiliki gen ketahanan (R) yang mampu mengenali gen avirulen (A) dari patogen sehingga tanaman bersifat tahan. Sementara itu, pada interaksi *Avr-r* bersifat *compatible*, tanaman tidak memiliki gen ketahanan R untuk mengenali gen avirulen dari patogen sehingga patogen dapat menyerang dengan gen virulen yang lain. Interaksi *avr-R* menyebabkan respon rentan karena meskipun tanaman mempunyai gen ketahanan R, patogen tidak memiliki gen avirulen yang dikenali oleh gen ketahanan R sehingga mekanisme pertahanan tidak diaktifkan. Interaksi *avr-r* menimbulkan

reaksi rentan karena tanaman tidak memiliki ketahanan dan patogen bersifat virulen sehingga patogen menyerang tanaman (Agrios, 2005 *dalam* Windarsih, 2014).

Faktor-faktor yang mempengaruhi ketahanan atau kerentanan suatu varietas padi terhadap cendawan *P. oryzae* adalah adanya gen ketahanan pada tanaman inang, tingkat virulensi cendawan *P. oryzae* dan lingkungan (Ou, 1985). Galur tahan memiliki kemampuan untuk membatasi penetrasi apresorium blas dan mematikan patogen blas. Deposisi senyawa silikat yang berada dalam jaringan epidermis daun varietas tahan dapat melindungi invasi hifa cendawan secara mekanis (Kim *et al.*, 2002). Selain itu, varietas padi yang tahan juga cenderung menghambat pembentukan spora blas dengan memproduksi fitoaleksin tertentu sebagai akibat interaksi antar patogen dan tanaman padi (Rodrigues *et al.*, 2004). Hal ini dapat pula disebabkan adanya reaksi hipersensitif yang cepat dari tanaman inang sehingga patogen tidak berkembang (Fitrianna, 2011). Kemampuan infeksi cendawan juga dipengaruhi haplotipe suatu cendawan. Keragaman haplotipe *P. oryzae* antara lain dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu dan kelembapan, baik pada lokasi yang sama maupun berbeda (Reflinur, 2005).

Sistem pertahanan tanaman terhadap serangan patogen terdiri dari pertahanan pasif dan pertahanan aktif (Osburn, 1996). Mekanisme pertahanan pasif diantaranya adalah kultikula yang berlilin dan senyawa

anti mikroba yang bertujuan mencegah terjadinya kolonisasi jaringan oleh cendawan. Sedangkan aktifnya mekanisme seluler yang terinduksi karena elisitor yang dikeluarkan oleh patogen merupakan sistem pertahanan aktif, diantaranya adalah terjadi akumulasi metabolit sekunder anti mikroba dan ekspresi protein *pathogenesis related* (Kim *et al.*, 2000).

Ketahanan penyakit pada tanaman secara umum terbagi menjadi dua yaitu ketahanan monogenik (ketahanan kualitatif) dan ketahanan poligenik (ketahanan kuantitatif) (Gerena, 2006). Upaya perakitan tanaman padi tahan blas telah banyak dilakukan namun umumnya ketahanan pada tanaman tersebut tidak bersifat lama. Sifat ketahanan tersebut hanya berlangsung selama 2-3 tahun setelah tanaman dilepas, sehingga dalam waktu relatif singkat ketahanan tanaman dapat terpatahkan (Joko dan Tasliah, 2004). Sebagian besar varietas padi bersifat rentan terhadap beberapa ras cendawan blas karena cendawan ini memiliki keragaman genetik yang tinggi, sehingga dapat cepat membentuk ras baru (Subhankar dan Chattoo, 2005). Variasi patogenik cendawan blas cukup tinggi salah satunya disebabkan adanya elemen transposon *POT2* (elemen yang dapat berpindah) (Kim *et al.*, 2000). Pemantauan perkembangan populasi patogen blas di lapangan biasanya dilakukan berdasarkan reaksi virulensi pada satu set tanaman diferensial Indonesia sehingga dapat ditentukan jenis ras blas di lapangan atau menggunakan penanda DNA (Santoso *et al.*, 2007).

D. Analisis Molekuler

1. Penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

Gen yang berhubungan dengan sifat virulensi pada *P. oryzae* secara genetik telah dikaji oleh beberapa peneliti (Chao dan Ellingboe, 1997; Valent *et al.*, 2001). Selain itu, beberapa gen resisten terhadap *P. oryzae*, gen yang mengontrol kompatibilitas dengan varietas tertentu dan gen-gen yang mengontrol perkembangan blas selama infeksi termasuk gen yang mempengaruhi pembentukan apresorium dan fungsi penetrasi apresorium juga telah dilaporkan (Chao dan Ellingboe, 1997; Kang dan Lee, 2000; Lau dan Ellingboe, 1993). Soubabere *et al.* (2001) telah mengidentifikasi *Magnaporthe grisea* yang saat ini dikenal sebagai *Magnaporthe oryzae* (anamorph: *P. oryzae*) menggunakan penanda molekuler (marka) sebagai pengkode gen yang berkaitan dengan virulensi yaitu penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR). SCAR adalah fragmen DNA yang diamplifikasi dengan PCR (Polymerase Chain Reaction) menggunakan primer spesifik yang didesain dari sekuen nukleotida dari klon fragmen RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) yang terkait dengan ciri yang menjadi perhatian utama (Paran dan Michelmore, 1993). Variasi polimorfisme dapat dideteksi dengan elektroforesis pada gel agarosa atau poliakrilamid. Keuntungan penanda ini yaitu cepat dan mudah digunakan, *reproducibility* yang tinggi, memiliki lokus spesifik dan kuantitas DNA template yang diperlukan sedikit (10-100 ng per reaction), kurang sensitiv terhadap kondisi reaksi, bersifat

kodominan. Kelemahannya adalah butuh informasi sekuen guna mendesain primer untuk PCR. Penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) dapat digunakan dalam mengidentifikasi kultivar (Theerakulpisut *et al.*, 2008), lokasi gen resisten penyakit (Anandaraj *et al.*, 2008) dan pemetaan genetik (Hernandez *et al.*, 2001).

Haplotipe *Pyricularia* dengan inang padi (68 strain) dari benua Afrika, Amerika Utara, Amerika Selatan, Asia dan Eropa membentuk lima grup berdasarkan hasil amplifikasi 14 pasang primer SCAR. Haplotipe *Pyricularia* padi dari Asia memiliki keragaman tinggi, sehingga berada di semua grup. Sebaliknya haplotipe *Pyricularia* padi dari Eropa tidak menyebar, berada dalam satu grup dengan *Pyricularia* padi dari Amerika Utara, Amerika Selatan dan Asia (Soubabere *et al.*, 2000). Selanjutnya sebanyak 16 jenis primer penanda SCAR yang dikembangkan oleh Soubabere *et al.* (2001) untuk memonitor rekombinasi dan migrasi populasi *Pyricularia* padi yaitu *C7-1.4*, *Cut1*, *E10*, *Erg2*, *H6-0.8-4*, *H6-0.8-5*, *H6-1.1-5*, *H6-1.1-7*, *J13-1.4*, *J16-0.7*, *J16-0.9*, *P9-0.4*, *P9-1.9*, *Pwl2*, *S9* dan *Y16*. Sebanyak tiga pasang primer yaitu *Cut1*, *Pwl2* dan *Erg2* penanda SCAR dari ke 16 jenis tersebut telah digunakan di Indonesia untuk menunjukkan keragaman genetik *Pyricularia* patogen padi dari beberapa daerah endemik di Indonesia (Reflinur *et al.*, 2005). Enzim kutinase *Pyricularia* padi yang disandikan oleh gen *Cut1* tidak mempengaruhi patogenisitas dan kecepatan konidiasi (Sweigard *et al.*, 1992), tetapi gen *Cut1* yang diperlukan untuk menginfeksi tanaman

(Skamnioti dan Gurr 2007). Sebanyak delapan gen diperkirakan menyandikan enzim kutinase *Pyricularia* dari padi (Dean *et al.*, 2005). *Pwl2* merupakan salah satu gen avirulen *Pyricularia* 70-15 dari padi (Dean *et al.*, 2005).

Studi keragaman genetik isolat *P. oryzae* yang telah dilakukan dengan menggunakan tiga primer mempunyai peran spesifik dalam pengenalan inang *P. oryzae*. Ketiga primer tersebut adalah (1) *Cut1* merupakan gen penyandi enzim kutinase berfungsi sebagai pendegradasi lapisan kitikula tanaman (Sweigard *et al.*, 1992), (2) *Erg2* merupakan lokus DNA yang berperan sebagai penyandi metabolit sekunder pada cendawan yang menjadi target antifungal pada sel tanaman (Keon *et al.*, 1994) dan (3) *Pwl2* sebagai gen avirulen yang bersifat spesifik inang (Valent dan Chumley, 1994). Ketiga gen tersebut telah dikembangkan menjadi primer penanda Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) yang dapat digunakan untuk memonitor rekombinasi dan perubahan struktur populasi *P. oryzae* (Soubarbere *et al.*, 2001).

Hasil penelitian Reflinur *et al.* (2005) untuk mengetahui keragaman genetik 230 isolat cendawan *P. oryzae* koleksi Laboratorium Biologi Molekuler BB-Biogen yang berasal dari Lampung, Bogor, Sukabumi, Sumatera Utara dan Sumatera Barat dengan menggunakan primer spesifik gen virulensi (*Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2*) menghasilkan delapan haplotipe, yaitu A-000, B-001, C-011, D-111, E-010, F-110, G-100 dan H-101 dengan frekuensi tertinggi adalah haplotipe D-111 (61,3%) dan H-101

(16,1%). Demikian juga dengan penelitian Rianingsih (2017) dan Izha (2018) untuk mengetahui keragaman genetik isolat *P. oryzae* yang berasal dari beberapa daerah/Kabupaten di Sulawesi Selatan menggunakan primer spesifik gen virulensi (*Cut1*, *Erg2* dan *Pwl2*). Deteksi molekuler 10 isolat *P. oryzae* oleh Rianingsih (2017) dari Kabupaten Maros, Bone dan Gowa ditemukan 3 haplotipe yaitu C-011, E-010 dan F-110. Haplotipe C-011 yang dominan. Sedangkan hasil deteksi molekuler Izha (2018) terhadap 10 isolat *P. oryzae* dari Kabupaten Pinrang ditemukan 2 haplotipe yaitu F-110 (8 isolat) dan G-100 (2 isolat).

2. Isolasi DNA

DNA adalah asam nukleat yang mengandung materi genetik dan berfungsi untuk mengatur perkembangan biologis seluruh bentuk kehidupan secara seluler. DNA menyimpan informasi genetik secara lengkap yang diperlukan untuk mencirikan struktur semua protein dan RNA tiap-tiap spesies organisme, untuk membuat program pada saat yang tepat dan menempatkan biosintesis sel dan komponen jaringan secara teratur, untuk menentukan aktivitas organisme sepanjang siklus hidupnya dan untuk menentukan kekhususan organisme tertentu. DNA dapat diisolasi dari semua makhluk hidup. Sel cendawan memiliki beberapa organel sitoplasmik yang dibatasi membran seperti mitokondria, membran yang mengandung sterol dan ribosom bertipe 80S. Sel cendawan memiliki inti yang dibatasi membran dengan kromosom yang mengandung DNA. DNA terdiri atas bagian yang mengkode genetik

(ekson), bagian yang tidak mengkode genetik (intron) dan bagian yang mengatur regulasi genetik. DNA merupakan molekul yang amat panjang, terdiri dari ribuan deoksiribonukleotida (Adenin, Guanin, Sitosin, Timin) yang bergabung dalam suatu urutan yang bersifat khas bagi tiap organisme. Molekul ini biasanya berbentuk untai ganda (Lehninger, 1982).

Prinsip utama dalam isolasi DNA ada tiga yakni penghancuran (lisis), ekstraksi atau pemisahan DNA dari bahan padat seperti selulosa dan protein serta pemurnian DNA. Menurut Faatih (2009) DNA dapat diisolasi dari setiap bagian makhluk hidup yang mengandung nukleus/inti sel, dengan langkah-langkah ialah (1) isolasi sel, (2) lisis dinding dan membran sel, (3) ekstraksi dalam larutan, (4) purifikasi dan (5) presipitasi. Prinsip-prinsip dalam melakukan isolasi DNA ada dua, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip utama sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat akan berada di dasar, sedangkan substansi yang lebih ringan akan terletak di atas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan di dalam sebuah mesin yang bernama mesin sentrifugasi dengan kecepatan yang bervariasi, contohnya 2500 rpm (*rotation per minute*) atau 3000 rpm. Isolasi DNA/RNA merupakan langkah awal yang harus dikerjakan dalam analisis gen dan rekayasa genetika untuk mendapatkan templat DNA yang akan digunakan dalam PCR. Isolasi DNA telah mengalami perkembangan mulai dari cara

konvensional menggunakan larutan penyangga yang disiapkan sendiri hingga cara terkini menggunakan kit komersial (Syahputra dkk., 2016). Penggunaan kit komersial berbasis formulasi larutan penyangga saat ini banyak dilakukan karena lebih efisien dan praktis. Teknik PCR mensyaratkan komponen cetakan (templat) DNA yang digunakan memiliki kemurnian dan konsentrasi tinggi sehingga amplifikasi dapat berlangsung optimum. Tingkat kemurnian, konsentrasi dan kualitas DNA sangat ditentukan oleh metode isolasi DNA. Perbedaan kandungan DNA kontaminan dan adanya DNA bukan target menyebabkan perbedaan metode isolasi DNA organisme. Pemilihan metode isolasi DNA yang tepat dan memadai berperan penting untuk keberhasilan teknik PCR (Tan dan Yiap, 2009).

3. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR merupakan salah satu teknik identifikasi molekuler yang dapat digunakan sebagai sarana diagnosis penyakit berdasarkan teknik amplifikasi DNA. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh seorang biokimiawan bernama Karry Mullis pada tahun 1985 (Joshi, M. dan Deshpande, J.D., 2010). PCR atau reaksi berantai polimerase adalah suatu metode enzimatik dalam bidang biologi molekuler yang bertujuan untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu dengan jumlah kelipatan ribuan hingga jutaan salinan secara *in vitro* dalam suatu *thermocycler* (mesin PCR) (Yuwono, 2006). Dalam hitungan jam, PCR memungkinkan untuk dapat membuat salinan dari

fragmen DNA target dalam jumlah yang banyak, sedangkan dengan teknik amplifikasi lain seperti kloning gen akan membutuhkan waktu berhari-hari atau berminggu-minggu (Paolella, 1998). Ketika awal perkembangannya, metode ini hanya digunakan sebagai metode untuk melipatgandakan DNA. Kemudian, metode ini dikembangkan untuk melipatgandakan dan melakukan kuantitasi molekul mRNA (Yuwono, 2006). PCR ini banyak digunakan untuk mempelajari gen spesifik atau urutan nukleotidanya (Schleif, 1993).

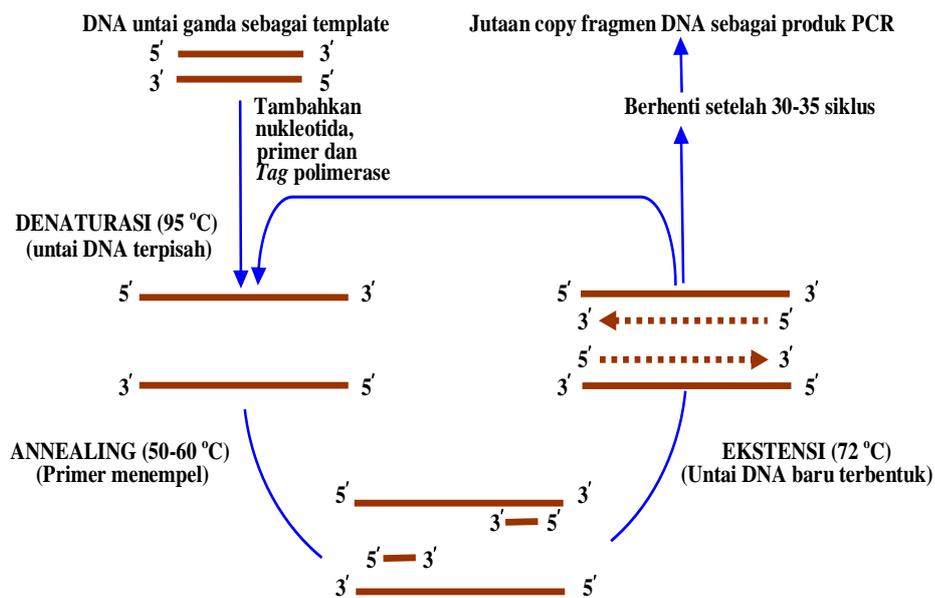
Komponen-komponen utama yang diperlukan pada proses PCR adalah cetakan (templat) DNA yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan, sepasang primer yaitu oligonukleotida *primer* yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang mempunyai urutan nukleotida yang komplementer dengan urutan nukleotida DNA templat, dNTPs (deoksiribonukleotida trifosfat) terdiri atas dATP, dCTP, dGTP, dTTP dan enzim polimerase DNA yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah buffer PCR dan magnesium klorida ($MgCl_2$) (Yuwono, 2006).

Sepasang primer yang akan mengagapit posisi DNA target yang kita gandakan dalam proses PCR yaitu primer *forward* dan primer *reverse*. Primer *forward* adalah primer yang berada sebelum daerah target sedangkan primer *reverse* merupakan primer yang berada setelah daerah target. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida.

Teknik PCR melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Setiap siklus terdiri dari tiga tahap yaitu denaturasi, perlekatan (*annealing*) dan perpanjangan (*extension*) (Joshi, M. dan Deshpande, J.D., 2010).

- a. Tahap pertama adalah proses denaturasi DNA sehingga DNA templat (*unamplified DNA*) yang berutas ganda akan terpisah menjadi DNA berutas tunggal. Proses ini dilakukan dengan cara memanaskan sampel DNA pada temperatur tinggi yaitu 90-95 °C selama 1-2 menit.
- b. Tahap kedua adalah proses perlekatan (*annealing*) dengan cara penurunan temperatur (didinginkan) hingga mencapai suatu suhu tertentu antara 40-60 °C selama 30 detik untuk memberi waktu pada primer menempel (*anneal primers*) pada daerah tertentu dari target DNA. Pada tahap ini primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA target pada daerah yang komplementer dengan sekuens primer.
- c. Tahap ketiga adalah tahap pemanjangan atau *extension*. Tahap ini dilakukan dengan cara menaikkan temperatur antara 70-75 °C dalam waktu yang disesuaikan dengan panjang atau pendeknya ukuran DNA yang diharapkan sebagai produk amplifikasi. Umumnya, waktu yang digunakan untuk ekstensi DNA pada PCR yaitu 2-3 menit (Yuwono, 2006). Pada tahap ini enzim polimerase mulai bekerja yaitu dengan cara menyusun pasangan untaian DNA yang baru dengan nukelotida-nukleotida dari dNTPs yang telah tersedia dalam larutan. Sintesa DNA

dimulai dari ujung 3'-hidroksi pada tiap primer. Lamanya reaksi bergantung pada DNA polimerase yang digunakan dan panjangnya fragmen DNA yang akan diamplifikasi.



Gambar 5. Siklus pembentukan molekul DNA baru dalam proses PCR (Muladno, 2002)

Fragmen DNA yang dihasilkan dari ketiga tahapan tersebut kemudian menjadi cetakan untuk sekuen selanjutnya dalam proses PCR dengan cara mengulang tahapan tersebut sebanyak 25 hingga 50 ulangan (siklus) (Gambar 5). Umumnya jumlah siklus yang digunakan pada proses PCR adalah 30 siklus. Target DNA yang diinginkan (*short "target" product*) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (*long product*) akan meningkat secara linier.

Enzim DNA polimerase yang digunakan dalam tahap ekstensi adalah Taq DNA polimerase. Enzim ini diisolasi dari bakteri *Thermus aquaticus* BM (Taq) dan dikembangkan pada tahun 1988. *Thermus aquaticus* BM merupakan strain yang tidak memiliki endonuklease restriksi Taq1. Taq DNA polimerase tersusun dari satu rantai polipeptida yang memiliki berat molekul kurang lebih 95 kD. Enzim ini memiliki kemampuan polimerisasi DNA yang sangat tinggi, namun tidak memiliki aktivitas eksonuklease 3' ke 5'. Taq polimerase paling aktif pada pH 9 (Yuwono, 2006). Enzim Taq DNA polimerase mampu tahan sampai suhu mendidih 100 °C, dan aktivitas optimalnya dapat berlangsung pada suhu 92-95 °C (Fatchiyah, E.L. dkk, 2011). Seperti halnya pada replikasi DNA, enzim DNA polimerase mensintesis DNA dengan arah dari ujung 5' ke ujung 3' (Watson *et al.*, 2004).

Jumlah kopi fragmen DNA target (amplicon) yang dihasilkan pada akhir siklus PCR dapat dihitung secara teoritis menurut rumus:

$$Y = (2^n - 2^n)X$$

Y : jumlah amplicon

n : jumlah siklus

X : jumlah molekul DNA templat semula

Jika $X = 1$ dan jumlah siklus yang digunakan adalah 30, maka jumlah amplicon yang diperoleh pada akhir proses PCR adalah 1.074×10^9 . Dari fenomena ini dapat terlihat bahwa dengan menggunakan teknik PCR dimungkinkan untuk mendapatkan fragmen DNA yang diinginkan (amplicon) secara eksponensial dalam waktu relatif singkat.

4. Elektroforesis Gel Agarosa

Prinsip elektroforesis agarose adalah teknik pemisahan asam nukleat/protein berdasarkan perbedaan medan listrik, molekul dan partikel bermuatan dalam media penyangga akan bergerak ke arah elektrode yang memiliki muatan berlawanan di bawah pengaruh medan listrik. Media yang umum digunakan adalah gel agarosa atau poliakrilamid. Agarosa merupakan polisakarida turunan yang didapat dari alga merah. Gel agarose dapat digunakan untuk memisahkan DNA berukuran lebih dari 100 bp dan dijalankan secara horizontal, sedangkan untuk memisahkan DNA dengan ukuran lebih pendek hingga 1 bp dapat digunakan gel poliakrilamid dan dijalankan secara vertikal. Gel agarose merupakan fase diam dalam pemisahan fragmen DNA dan muatan listrik sebagai fase geraknya. Elektroforesis poliakrilamid biasanya digunakan untuk menentukan urutan DNA (sekuensing) (Madigan, 2000; Gaffar, 2007).

Larutan DNA yang bermuatan negatif dimasukkan ke dalam sumur-sumur yang terdapat pada gel agarosa dan diletakkan di kutub negatif, apabila dialiri arus listrik dengan menggunakan larutan buffer yang sesuai maka DNA akan bergerak ke kutub positif. Laju migrasi DNA dalam medan listrik berbanding terbalik dengan massa DNA. Migrasi DNA terutama ditentukan oleh ukuran panjang dan bentuk DNA. Fragmen DNA yang berukuran kecil akan bermigrasi lebih cepat dibanding yang berukuran besar, sehingga elektroforesis mampu memisahkan fragmen DNA berdasarkan ukuran panjangnya.

Visualisasi DNA dilakukan di bawah paparan sinar ultraviolet setelah terlebih dahulu gel dalam pembuatannya ditambahkan pewarna. Pewarna yang biasa digunakan adalah ethidium bromide (EB). EB bersifat karsinogenik dan mutagenik. Kesadaran mengenai keamanan, telah mendorong pemilihan bahan yang aman dan ramah bagi personal laboratorium dan lingkungan. Pada kegiatan di bidang biologi molekuler sekarang tersedia alternatif pengganti EB yang diklaim lebih aman, salah satunya yaitu *gel red* atau *florSAFE DNA stain*. Dibandingkan dengan EB, pewarna alternatif ini memiliki toksisitas dan mutagenitas yang rendah. *FlorSAFE DNA stain* adalah non karsinogenik, namun dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan mata. Kenakan sarung tangan dan pelindung saat memegang. Berdasarkan hasil visualisasi panjang amplicon maka dapat diperkirakan dengan membandingkannya dengan pita DNA standar (Madigan, 2000).

E. Gambaran Umum Kabupaten Maros Terkait Geografi

Kabupaten Maros adalah salah satu Daerah Tingkat II di Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia. Kabupaten Maros terletak di bagian barat Sulawesi Selatan antara 40°45'-50°07' Lintang Selatan dan 109°205'-129°12' Bujur Timur yang berbatasan dengan Kabupaten Pangkep di sebelah Utara, Kota Makassar dan Kabupaten Gowa di sebelah Selatan, Kabupaten Bone di sebelah Timur dan Selat Makassar di sebelah Barat. Kabupaten ini memiliki luas wilayah 1.619,12 km² yang terdiri dari empat belas kecamatan dan 103 desa/kelurahan. Kecamatan tersebut yaitu

Turikale, Maros Baros, Lau, Bontoa, Mandai, Marusu, Tanralili, Moncongloe, Tompobulu, Bantimurung, Simbang, Cenrana, Camba dan Mallawa (Gambar 6).

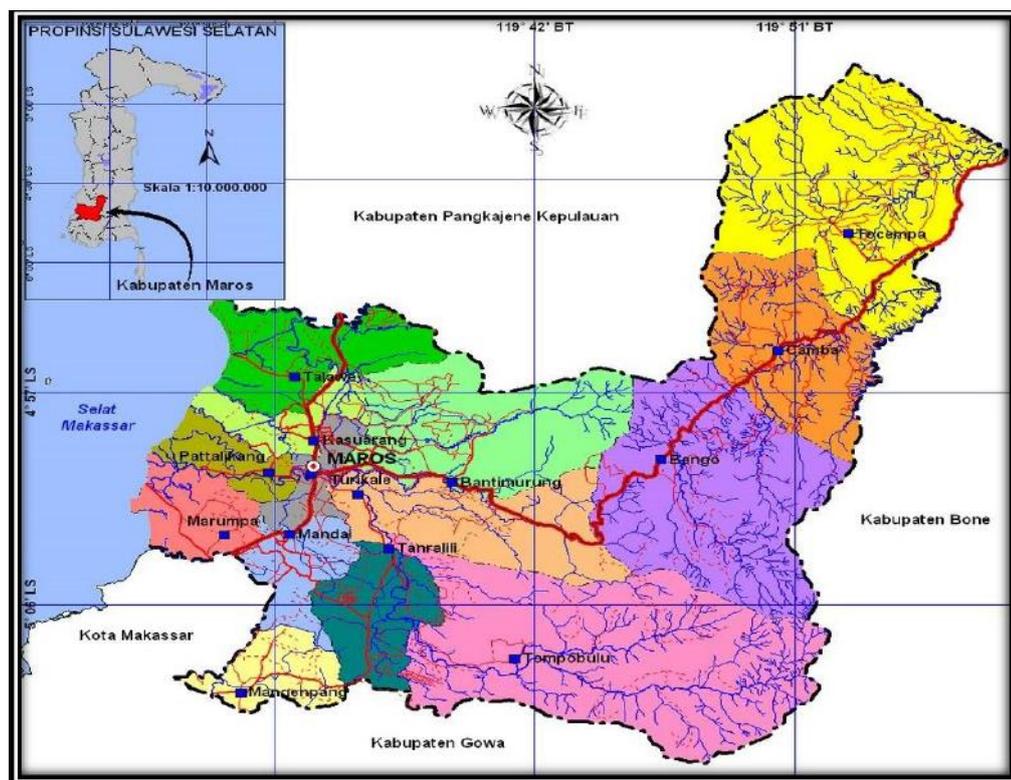
Ketinggian suatu tempat dari permukaan laut terutama di daerah tropis dapat menentukan banyaknya curah hujan dan suhu. Ketinggian juga berhubungan erat dengan konfigurasi lapangan, unsur-unsur curah hujan, suhu dan konfigurasi lapangan mempengaruhi peluang pembudidayaan komoditas. Ketinggian wilayah di Kabupaten Maros berkisar antara 0-2000 meter dari permukaan laut. Di bagian Barat wilayah Kabupaten Maros dengan ketinggian 0-25 meter dan di bagian Timur dengan ketinggian 100-1000 meter lebih. Kabupaten Maros dengan ketinggian 0-25 m merupakan daerah yang dominan dengan luas wilayah 63.083 ha atau sebesar 39% sedangkan daerah yang memiliki luas daerah yang sempit berada pada ketinggian >1000 m dengan luas wilayah 7.193 ha atau sebesar 4% dari luas total wilayah perencanaan.

Berdasarkan pencatatan Badan Stasiun Meteorologi, Klimatologi dan Geofisika (BMKG) tahun 2018 rata-rata suhu udara bulanan di Kabupaten Maros adalah 27,22 °C tiap bulannya. Suhu bulanan paling rendah adalah 23,1 °C (terjadi pada bulan Juli dan Agustus 2018) sedangkan paling tinggi adalah 33,5 °C (terjadi pada bulan September 2018). Kelembapan udara bervariasi antara 60% hingga 82%. Iklim Kabupaten Maros tergolong iklim tropis basah dengan curah hujan rata-rata sekitar 284,5 mm setiap bulannya dan rata-rata curah hujan tahunan

3150 mm/tahun dengan jumlah hari hujan berkisar 185 hari selama tahun 2018. Curah hujan cukup bervariasi, curah hujan tertinggi terjadi bulan Januari (695 mm) dan terendah terjadi bulan Agustus (32 mm). Bulan Agustus dan September curah hujan relatif rendah. Berdasarkan kelas curah hujan tahunan sebagian besar wilayah termasuk kategori sangat basah, hanya dua kecamatan termasuk dalam kategori basah, seperti di kecamatan Maros Baru dan Marusu. Penyinaran matahari selama tahun 2018 rata-rata berkisar 66,67%. Jumlah bulan kering dengan intensitas <100 mm/bulan terdapat sebanyak tiga bulan dan bulan basah dengan intensitas >200 mm/bulan adalah sebanyak enam bulan. Dengan demikian kawasan tersebut menurut kriteria Oldeman (1979) memiliki Zona Agroklimat C-2, dapat ditanami padi dua kali panen dalam setahun, dimana penanaman padi yang jatuh saat curah hujan di bawah 200 mm per bulan dilakukan dengan sistem gogo rancah.

Keadaan topografi wilayah sangat bervariasi mulai dari wilayah datar sampai bergunung-gunung. Secara geografis daerah ini yaitu terdiri dari 10% (10 desa) adalah pantai, 5% (5 desa) adalah kawasan lembah, 27% (28 desa) adalah lereng/bukit dan 58% (60 desa) adalah dataran. Tanah di Kabupaten Maros dapat dikelompokkan menjadi tanah yang terbentuk di daerah *lowland* dan *upland*. Keadaan tanah di daerah *lowland* berasal dari aluvium dan volkan sering tergenang (jenuh air), sehingga karakteristik tanahnya banyak dipengaruhi oleh air. Tanah di daerah *upland*, berkembang dari bahan volkan dan sedimen (batu liat

berkapur/batu gamping), yang didominasi oleh proses pencucian (*leaching*) dan pengendapan. Jenis tanah di Kabupaten Maros diklasifikasikan dalam empat tipe yaitu alluvial muda, regosol, litosol dan mediteran.



Gambar 6. Peta wilayah Kabupaten Maros (BPS Kabupaten Maros, 2019)

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2019 sampai Februari 2020. Penelitian dilaksanakan dengan metode survei pada lahan sawah dan dilanjutkan dengan pengujian di laboratorium, terdiri atas tiga kegiatan. Kegiatan pertama adalah pengamatan keparahan penyakit dan pengambilan sampel dilakukan di delapan lokasi lahan petani (kecamatan yang berbeda) di Kabupaten Maros Sulawesi Selatan. Kedua, proses isolasi dan identifikasi morfologi terhadap isolat-isolat yang diperoleh dilakukan di Laboratorium Penyakit Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Ketiga, analisis gen virulensi cendawan blas *P. oryzae* menggunakan metode SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) dilakukan di Laboratorium Penelitian, Rumah Sakit Pendidikan Universitas Hasanuddin Makassar.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini: bagian tanaman padi bergejala blas (daun, leher malai, malai, buku batang dan kolar daun), media sintesis potato dextrose agar (PDA), akuades, alkohol 95%, NaOCl, spiritus, chloramphenicol, kertas saring, kertas label, plastik *wrapping*, aluminium foil, kaca preparat, *cover glass*, kuteks bening, tisu, kapas,

plastik klip, amplop sampel, kit ekstraksi DNA (Geneaid DNA Extraction Kit), Master Mix PCR (primer *forward* dan *reverse Pw12*, *Erg2* dan *Cut1*, enzim Go Taq® Green Master Mix, dan ddH₂O), mikrotips (tips biasa volume 10-100 µl dan 1000 µl, tips filter volume 10 µl dan 1000 µl), tabung *ependorf* (2 ml; 1,5ml; 0,5 ml), agarosa, TBE/TAE 1x, *ladder/marker*, *florosafe*, sarung tangan karet.

Alat yang digunakan adalah: *handphone* android yang terdapat aplikasi *GPS (global positioning system)*, box lampu NUV untuk inkubasi, *autoclave*, oven, *laminar air flow (LAF)*, mikroskop stereo dan mikroskop compound, *bio safety cabinet (BSC)*, inkubator, *shaker*, *refrigerator*, timbangan analitik digital, *hot plate magnetic stirer*, vortex, *sentrifuse*, *power pac elektroforesis*, *gel doc* (alat dokumentasi), mesin PCR Bio-Rad, *microwave*, *timer*, mikropistil, mikropipet, kotak es, kotak tabung *ependorf*, cawan Petri, erlenmeyer, gelas ukur, spatula, pipet tetes, *corkborer*, jarum preparat, gunting, spatula, pinset, pembakar bunsen, korek gas, *sprayer*, kamera dan alat tulis.

C. Prosedur Penelitian

1. Pengamatan Tingkat Keparahan Penyakit Blas dan Pengambilan Sampel di Lapangan

Pengamatan menggunakan metode survei dilakukan pada tanaman padi sawah di delapan petak lahan yang berbeda. Pemilihan lahan secara *purposive sampling* yaitu mempertimbangkan lahan yang menunjukkan

adanya gejala serangan *P. oryzae*. Pengamatan sampel yaitu secara diagonal, setiap petak diambil lima unit sampel tanaman, yaitu di antara sudut dan bagian tengah petak (Gambar 7). Dalam satu petak lahan diambil sepuluh rumpun, sehingga masing-masing unit terdiri dari dua rumpun tanaman padi. Masing-masing rumpun diambil delapan sampel daun, hasil pengamatan dirata-ratakan. Parameter yang diamati adalah luas bercak penyakit blas pada daun padi berdasarkan Gambar 8 (IRRI, 1996) dan Tabel 1 (IRRI, 2013). Data luas bercak daun dianalisis untuk menentukan keparahan penyakit dengan rumus (Zulaikha, 2018) sebagai berikut :

$$KP = \frac{\sum(n \times v)}{(N \times Z)} \times 100\%$$

Keterangan:

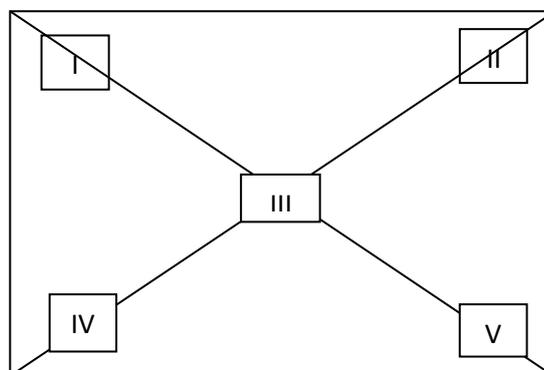
KP : keparahan penyakit (%)

n : jumlah daun tanaman yang terserang

v : nilai skala daun yang terserang

N : jumlah seluruh daun yang diamati

Z : skala tertinggi dari kategori skala serangan



Gambar 7. Pola diagonal pengamatan intensitas serangan



Gambar 8. Penilaian pola bercak blas daun menggunakan skala evaluasi 0-9 (IRRI, 1996).

Tabel 1. Deskripsi skala evaluasi keparahan penyakit blas daun (IRRI, 2013)

| Skor Gejala | Deskripsi | Kriteria |
|-------------|--|---------------|
| 0 | Tidak ada gejala serangan | Sangat tahan |
| 1 | Bintik coklat kecil ukuran ujung jarum atau bintik coklat yang lebih besar tanpa pusat sporulasi | Tahan |
| 2 | Bercak abu-abu nekrotik, diameter 1-2 mm, agak bulat sedikit memanjang dengan tepi coklat, bercak kebanyakan ditemukan di bagian bawah daun. | Tahan |
| 3 | Jenis bercak sama seperti pada skor 2, tetapi sejumlah besar bercak di bagian atas daun | Agak Tahan |
| 4 | Bercak khas blas, panjang 3 mm atau lebih, luas daun terserang kurang dari 4% luas daun | Agak Rentan |
| 5 | Bercak khas blas, luas daun terserang 4-10% | Rentan |
| 6 | Bercak khas blas, luas daun terserang 11-25% | Rentan |
| 7 | Bercak khas blas, luas daun terserang 26-50% | Rentan |
| 8 | Bercak khas blas, luas daun terserang 51-75% | Sangat Rentan |
| 9 | Bercak khas blas, luas daun terserang lebih dari 75% | Berat |

Selanjutnya untuk mengetahui kategori tingkat serangannya, hasil penghitungan keparahan penyakit blas daun disesuaikan dengan kategori skala serangan berdasarkan Akhsan dan Palupi (2015) sesuai Tabel 2 berikut.

Tabel 2. Kategori skala serangan pada daun

| Skala | Kategori Serangan | Keterangan |
|-------|--------------------------------------|------------|
| 1 | 1-5% Serangan dari luas daun | Tahan |
| 3 | 5-11% Serangan dari luas daun | Ringan |
| 5 | > 11 - ≤ 25% Serangan dari luas daun | Sedang |
| 7 | > 25 - ≤ 75% Serangan dari luas daun | Berat |
| 9 | > 75-100% Serangan dari luas daun | Puso |

Pengambilan sampel pada lokasi pengamatan menggunakan metode *purposive random sampling* atau pengambilan sampel bagian tanaman bergejala khas penyakit blas padi (daun, leher malai, malai, buku batang dan kolar daun). Pengambilan sampel dilakukan pada saat umur tanaman berada pada fase vegetatif atau generatif (menyesuaikan kondisi pertanaman di lapangan). Bagian tanaman yang bergejala kemudian dimasukkan dalam amplop sampel serta diberikan label untuk penandaan (nomor sampel, lokasi, tanggal pengambilan, umur tanaman dan varietas). Sampel selanjutnya dibawa ke laboratorium dan dilakukan pengujian.

2. Isolasi dan Identifikasi Cendawan *P. oryzae*

a. Pembuatan media Potato Dextrose Agar (PDA)

Media PDA yang digunakan pada penelitian ini menggunakan media instan (sintetis). Cara pembuatan dilakukan sesuai keterangan pada kemasan. Ditimbang sebanyak 39 g dan dilarutkan dalam wadah erlenmeyer berisi 1000 ml akuades. Panaskan di atas *hotplate magnetic stirrer* sampai homogen. Setelah itu erlenmeyer disumbat dengan kapas, ditutup dengan aluminium foil lalu dieratkan dengan plastik *wrapping*. Selanjutnya media disterilisasi di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C tekanan 1,25 atm. Untuk mencegah kontaminasi bakteri ditambahkan antibiotik chloramphenicol 250 mg/l. Untuk menambah antibiotik gunakan sarung tangan, lalu dituang ke dalam cawan petri steril, tahap tersebut dilakukan dalam *laminar air flow (LAF)*.

b. Preparasi sampel dan isolasi dari bagian tanaman padi

1) Preparasi sampel

Sampel gejala khas blas pada tanaman padi (daun, buku batang, kolar daun, leher malai dan malai) dikumpulkan dari lahan pertanaman padi. Sampel daun dan kolar bergejala blas dipotong kecil $\pm 1-2 \text{ cm}^2$. Sampel buku batang dan leher malai dipotong $\pm 3-5 \text{ cm}^2$. Dilakukan desinfeksi jaringan dengan cara direndam dalam natrium hipoklorit (NaOCl) 1% selama tiga menit dan dibilas dua kali dengan akuades steril selama 1 menit kemudian dikeringanginkan.

2) Isolasi sampel dari bagian tanaman

Penelitian ini menggunakan dua metode isolasi tidak langsung yaitu metode kertas saring (*blotter test*) dan metode agar-agar cawan petri.

a) Metode uji kertas saring (*blotter test*) atau modifikasinya

Metode ini merupakan metode menurut Hayasi dan Fukuta (2009) yang dimodifikasi. Dilembapkan tiga helai kertas saring dengan cara mencelupkannya ke dalam akuades steril, kemudian diletakkan di dalam cawan Petri steril atau diletakkan tiga helai kertas saring dalam cawan Petri, kemudian dituangkan 10 ml akuades steril, sehingga seluruh kertas saring basah merata, buang kelebihan air. Plating bagian tanaman di atas permukaan kertas saring. Inkubasi pada suhu ruang dengan pengaturan penyinaran 12 jam gelap dan 12 jam terang lampu NUV selama 5-7 hari atau lebih. Konidia yang muncul dari permukaan jaringan tanaman kemudian diamati dengan mikroskop binokuler. Konidia yang tumbuh pada bagian jaringan tanaman lalu dipindahkan ke media PDA (Potato Dextrose Agar) diinkubasi pada suhu ruang selama 7-10 hari.

b) Metode agar-agar cawan Petri

Setelah dilakukan sterilisasi permukaan bagian tanaman yang bergejala, bagian tanaman tersebut diletakkan ke dalam cawan Petri yang telah diisi media PDA. Susun sedemikian rupa sesuai dengan ukuran sampel. Inkubasi pada suhu ruang dengan pengaturan penyinaran 12 jam gelap dan 12 jam terang lampu NUV (near ultra violet) selama 5-7 hari atau lebih. Selanjutnya diamati masing-masing koloni cendawan pada

setiap cawan Petri menggunakan mikroskop. Miselium yang tumbuh dari jaringan tanaman disubkultur lagi ke cawan baru berisi media PDA dan diinkubasi pada 25 °C selama 7-10 hari (Srivastava *et al.*, 2014).

c. Identifikasi cendawan blas padi *P. oryzae*

Identifikasi cendawan blas yaitu dengan mengamati morfologi koloni (warna koloni dan tampilan permukaan) setiap isolat pada media PDA setelah inkubasi. Untuk sporulasi, kultur dipertahankan dalam 12 jam gelap kemudian konidia diamati dari masing-masing isolat. Bentuk konidia diamati di bawah mikroskop (Srivastava *et al.*, 2014). Cendawan *P. oryzae* dapat diidentifikasi dengan adanya konidia yang berbentuk *pyriform* mirip gada berwarna abu-abu hingga hialin dan umumnya memiliki dua septa, namun kadang-kadang juga ditemukan satu atau tiga septa (Bonman *et al.*, 1986).

3. Analisa Gen Virulensi Cendawan *P. oryzae* Menggunakan Metode SCAR

a. Ekstraksi DNA.

Isolasi DNA genom isolat cendawan *P. oryzae* dilakukan dari kultur miselia cendawan. Ekstraksi DNA mengikuti prosedur gSYNC™ DNA Extraction Kit, sebanyak 25 mg miselia cendawan dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi ukuran 1,5 ml lalu ditambahkan 200 µl buffer GST dan 20 µl protease K selanjutnya miselia digerus menggunakan mikropistil lalu divortex secara cepat dan disentrifugasi selama 5 menit. Kemudian

diinkubasi pada suhu 60 °C selama 12 jam hingga sampel menjadi *lysate*. Apabila masih terdapat gumpalan, maka dilakukan sentrifugasi selama 2 menit pada 14000-16000 rpm lalu supernatan dipindahkan secara hati-hati pada tabung mikrosentrifugasi baru ukuran 1,5 ml dan ditambahkan buffer GSB dan divortex kemudian ditambahkan 200 µl ethanol absolut pada sampel lalu divortex perlahan selama 10 detik. Sampel ditempatkan ke GD Column dalam tabung koleksi 2 ml lalu disentrifugasi 14000-16000 rpm selama 1 menit. DNA yang tertampung pada GD column kemudian ditambahkan buffer W1 400 µl dan disentrifugasi selama 30 detik. Ditambahkan 600 µl wash buffer dan disentrifugasi selama 30 detik, dipindahkan ke GD Column baru. Ditambahkan 100 µl elution buffer kemudian disentrifugasi 14000-16000 rpm selama 30 detik hingga ditemukan DNA murni.

b. Amplifikasi PCR

Haplotipe yang dihasilkan oleh metode Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) dengan menggunakan ketiga primer menggambarkan keragaman genetik cendawan (haplotipe) *P. oryzae* secara molekuler. Haplotipe tersebut dideteksi menggunakan marka *Erg2*, *Pwl2* dan *Cut1*, yaitu marka yang berkaitan dengan virulensi (Soubabere *et al.*, 2001). Pengamatan dilakukan pada pola pita DNA hasil amplifikasi pada tiap ampikon primer dengan ukuran berkisar 1440 bp untuk gen *Erg2*, 800-900 bp untuk gen *Pwl2* dan 800-1730 bp untuk gen *Cut1*. Reaksi PCR dilakukan pada total 25 µl volume yang mengandung 5 ng

DNA, 1 pmol/ μ l primer *forward* dan *reverse*, 12,5 μ l enzim Go Taq® Green Master Mix dan 5,5 μ l H₂O. Urutan basa tiap primer tersebut disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Sekuen nukleotida primer

| Lokus Primer | Urutan basa Primer (5'-3') |
|--------------|----------------------------|
| <i>Erg2</i> | F: GCAGGGCTCATTCTTTTCTA |
| | R: CCGACTGGAAGGTTTCTTTA |
| <i>Pwl2</i> | F: TCCGCCACTTTTCTCATTCC |
| | R: GCCCTCTTCTCGCTGTTTAC |
| <i>Cut1</i> | F: TATAGCGTTGACCTTGTGGA |
| | R: TAAGCATCTCAGACCGAACC |

Keterangan: F= *Forward*, R= *Reverse*.

Program PCR diawali dengan denaturasi awal/inisiasi pada suhu 94 °C selama 2 menit dilanjutkan dengan proses amplifikasi sebanyak 35 siklus, yaitu denaturasi pada suhu 94 °C selama 30 detik, annealing/perlekatan pada suhu 54 °C selama 30 detik, ekstensi/pemanjangan pada suhu 72 °C selama 1 menit dan siklus terakhir ekstensi final 72 °C selama 5 menit. Elektroforesis produk PCR dilakukan pada gel agarosa 1% (w/v) dengan tegangan listrik 100 Volt selama 40 menit untuk mengidentifikasi ampikon tiap primer sesuai ukuran referensi (Soubabere *et al.*, 2001; Reflinur *et al.*, 2005)

D. Analisis Data

Pita DNA hasil amplifikasi yang muncul untuk setiap primer dari masing-masing isolat diskor dengan nilai 1 (ada pita DNA) dan 0 (tidak ada pita DNA). Selanjutnya data ini digunakan untuk mengelompokkan isolat-isolat uji menjadi beberapa haplotipe berdasarkan kombinasi ketiga jenis gen (*Erg2*, *Pwl2* dan *Cut1*) pada isolat-isolat yang diuji. Penentuan haplotipe tersebut disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Haplotipe cendawan blas berdasarkan tiga gen virulensi

| Haplotipe | Gen penyandi virulensi | | |
|-----------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|
| | <i>Pwl2</i> (800-900bp) | <i>Erg2</i> (1440 bp) | <i>Cut1</i> (800-1730 bp) |
| A-000 | 0 | 0 | 0 |
| B-001 | 0 | 0 | 1 |
| C-011 | 0 | 1 | 1 |
| D-111 | 1 | 1 | 1 |
| E-010 | 0 | 1 | 0 |
| F-110 | 1 | 1 | 0 |
| G-100 | 1 | 0 | 0 |
| H-101 | 1 | 0 | 1 |

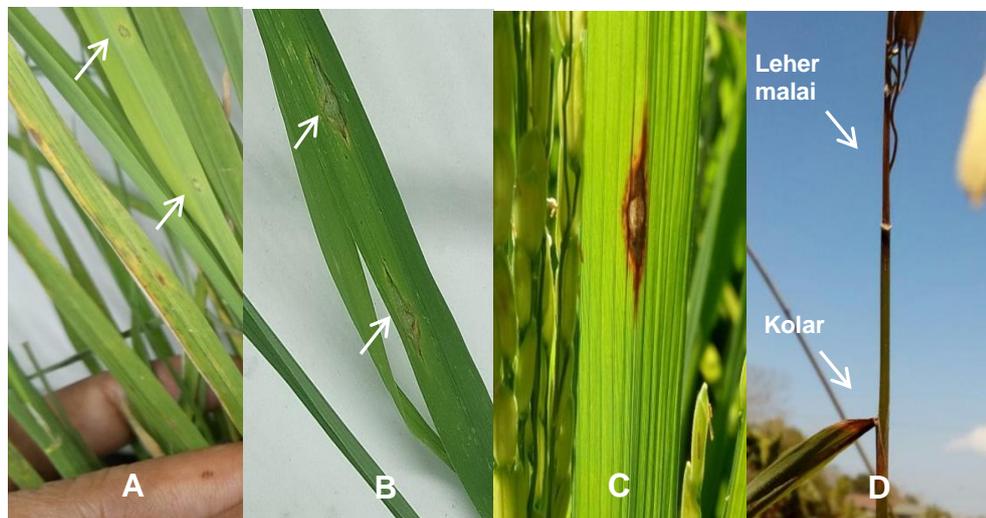
Ket: 0= tidak ada pita DNA, 1= ada pita DNA.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Pengamatan Tingkat Keparahan Penyakit Blas Padi dan Pengambilan Sampel di Lapangan



Gambar 9. Gejala blas padi hasil pengamatan di lapangan. Perkembangan gejala blas daun berturut-turut (A-C). Blas leher malai dan kolar (D) (Kurrata, 2019)

Cendawan *P. oryzae* yang menyerang tanaman padi akan membentuk gejala bercak yang bentuknya khas, yaitu belah ketupat dengan kedua ujungnya meruncing. Sisi runcing ini sejajar dengan pembuluh daun. Gejala blas daun disajikan pada Gambar 9 (A-C). Gejala awal blas berupa bercak berbentuk bulat kecil berwarna abu-abu dan tepi berwarna gelap kehijauan. Dalam perkembangannya bercak yang terbentuk semakin meluas berbentuk belah ketupat di bagian tengahnya

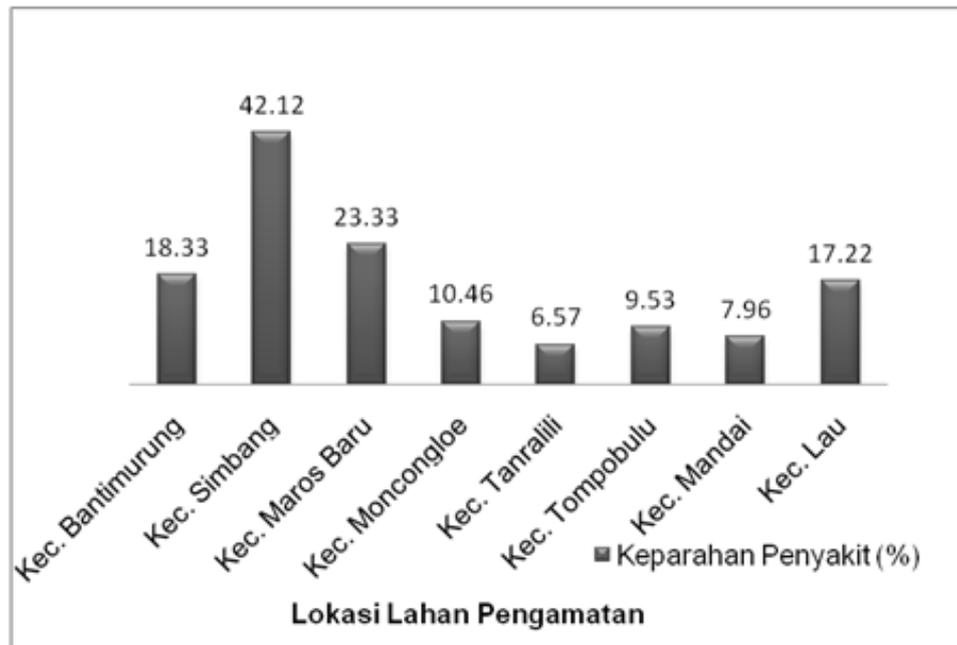
berwarna abu-abu sedikit kebiru-biruan dan di bagian tepinya berwarna hijau gelap hingga coklat. Bercak yang berkembang penuh mencapai panjang 1-1,5 cm dan lebar 0,3-0,5 cm dengan tepi nekrotik berwarna coklat kemerahan. Pada stadia generatif, terutama pada saat pengisian biji, ditemukan gejala penyakit blas pada leher malai. Gejala penyakit blas pada leher malai berwarna coklat kehitaman (gosong) seperti terkena letupan api (*blast*) (Gambar 9D). Gejala blas juga terdapat pada bagian kolar daun (9D).

Hasil pengamatan luas bercak penyakit blas daun yang disebabkan oleh *P. oryzae* di pertanaman padi sawah Kabupaten Maros didapatkan data hasil keparahan penyakit blas daun di delapan Kecamatan yang bervariasi berkisar antara 6,57-42,12% (Tabel 5, Gambar 10). Keparahannya penyakit blas daun di lokasi pengamatan menunjukkan bahwa tingkat serangan tertinggi di Kecamatan Simbang varietas Mekongga (42,12%) dengan kategori berat kemudian diikuti di Kecamatan Maros Baru varietas Mekongga (23,33%), Bantimurung varietas Inpari 4 (18,33 %) dan Lau varietas Inpari 4 (17,33%) dengan kategori sedang. Kategori ringan terdapat di empat kecamatan lainnya yaitu Kecamatan Tanralili varietas Inpari 7 (6,57%), Kecamatan Mandai, Tompobulu dan Moncongloe varietas Ciherang (7,56%, 9,53% dan 10,46%).

Tabel 5. Keparahan penyakit blas daun di delapan Kecamatan Kabupaten Maros

| No. | Lokasi | Posisi koordinat (latitude dan longitude) | Varietas | Umur (HST) | Keparahan penyakit (%) | Kategori* |
|-----|------------------|---|----------|---------------|---------------------------|-----------|
| 1. | Kec. Bantimurung | Lat. 4°57'45" Long. 119°36'45" | Inpari 4 | 75 | 18,33 | Sedang |
| 2. | Kec. Simbang | Lat. 5°1'3" Long. 119°38'57" | Mekongga | 70 | 42,12 | Berat |
| 3. | Kec. Maros Baru | Lat. 5°0'11" Long. 119°32'58" | Mekongga | 41 | 23,33 | Sedang |
| 4. | Kec. Moncongloe | Lat. 5°6'32" Long. 119°32'18" | Ciherang | 50 | 10,46 | Ringan |
| 5. | Kec. Tanralili | Lat. 5°6'42" Long. 119°36'42" | Inpari 7 | 52 | 6,57 | Ringan |
| 6. | Kec. Tompobulu | Lat. 5°8'19" Long. 119°41'43" | Ciherang | 70 | 9,53 | Ringan |
| 7. | Kec. Mandai | Lat. 5°6'37" Long. 119°31'47" | Ciherang | 70 | 7,96 | Ringan |
| 8. | Kec. Lau | Lat. 4°59'7" Long. 119°34'15" | Inpari 4 | 75 | 17,22 | Sedang |

*Kategori berdasarkan Akhsan dan Palupi (2015)



Gambar 10. Grafik keparahan penyakit blas daun padi di delapan Kecamatan Kabupaten Maros

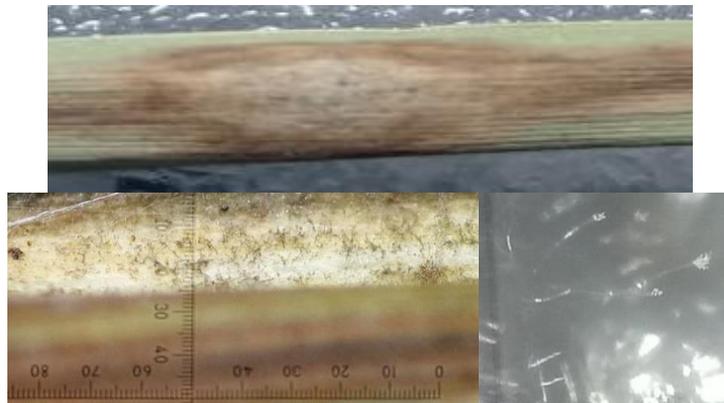
2. Isolasi dan Karakteristik Morfologi Cendawan *P. oryzae* yang Ditemukan

Hasil isolasi dan identifikasi dari pengambilan sampel tanaman padi bergejala blas di lapangan ditemukan sebanyak 15 isolat *P. oryzae* yang berasal dari 8 Kecamatan di Kabupaten Maros. Dua isolat yang berasal dari Kecamatan Bantimurung diberi kode isolat PoBM1 dan PoBM2. Empat isolat dari Kecamatan Simbang diberi kode PoSb1, PoSb2, PoSb3 dan PoSb4. Dua isolat dari Kecamatan Maros Baru diberi kode PoMb1 dan PoMb2. Dua isolat dari Kecamatan Moncongloe diberi kode PoMl1 dan PoMl2. Dua isolat dari Kecamatan Tanralili diberi kode PoTl1 dan PoTl2. Satu isolat dari Kecamatan Tompobulu diberi kode PoTb1. Satu isolat dari Kecamatan Mandai diberi kode PoMd1. Satu isolat dari

Kecamatan Lau diberi kode PoLu1. Daftar isolat hasil identifikasi *P. oryzae* disajikan pada Tabel 6 berikut.

Tabel 6. Isolat *P. oryzae* yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros

| No. | Kode isolat | Lokasi pengambilan isolat | Bagian jaringan | Jenis varietas |
|-----|-------------|---------------------------|-----------------|----------------|
| 1. | PoBm1 | Kec. Bantimurung | Daun | Inpari 4 |
| 2. | PoBm2 | Kec. Bantimurung | Daun | Inpari 4 |
| 3. | PoSb1 | Kec. Simbang | Daun | Mekongga |
| 4. | PoSb2 | Kec. Simbang | Daun | Mekongga |
| 5. | PoSb3 | Kec. Simbang | Kolar | Mekongga |
| 6. | PoSb4 | Kec. Simbang | Daun | Mekongga |
| 7. | PoMb1 | Kec. Maros Baru | Daun | Mekongga |
| 8. | PoMb2 | Kec. Maros Baru | Daun | Mekongga |
| 9. | PoMI1 | Kec. Moncongloe | Daun | Ciherang |
| 10. | PoMI2 | Kec. Moncongloe | Kolar | Ciherang |
| 11. | PoTI1 | Kec. Tanralili | Daun | Inpari 7 |
| 12. | PoTI2 | Kec. Tanralili | Daun | Inpari 7 |
| 13. | PoTb1 | Kec. Tompobulu | Daun | Ciherang |
| 14. | PoMd1 | Kec. Mandai | Daun | Ciherang |
| 15. | PoLu1 | Kec. Lau | Daun | Inpari 4 |



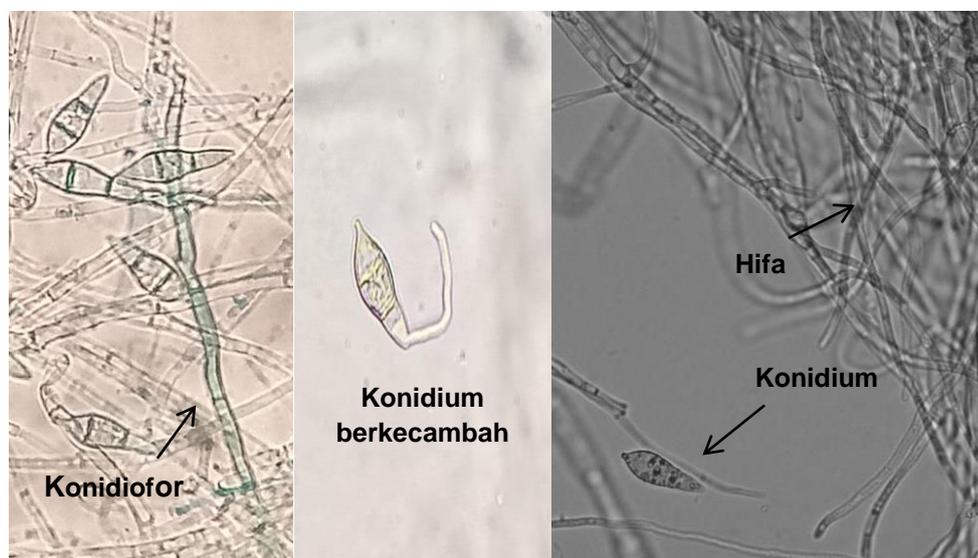
Gambar 11. Karakteristik morfologi spora *P. oryzae* yang tumbuh di atas permukaan daun di bawah mikroskop stereo perbesaran 50x (Kurrata, 2019)

Pengamatan makroskopis cendawan *P. oryzae* yang tumbuh di permukaan daun padi menggunakan mikroskop stereo menunjukkan ketika terjadi sporulasi nampak keberadaan konidia dan miselia sehingga membentuk warna abu-abu. Konidiofor *P. oryzae* berwarna abu-abu hingga tidak berwarna (hialin) dan tunggal jarang yang bercabang serta membentuk konidium di bagian ujungnya.

Morfologi isolat cendawan *P. oryzae* yang ditumbuhkan pada media PDA, memiliki warna koloni pada bagian depan yaitu putih, perpaduan putih dan abu-abu kehitaman hingga perpaduan putih, coklat dan abu-abu kehitaman. Warna koloni bagian belakang yaitu hitam, hijau kehitaman, hingga perpaduan coklat dan hitam. Pola koloni umumnya circular, berbentuk lingkaran menyerupai cincin konsentris yang mengarah ke titik pusat tumbuh. Beberapa isolat menampilkan pinggiran koloni yang lebih

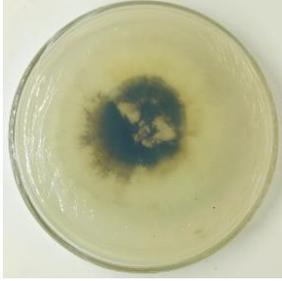
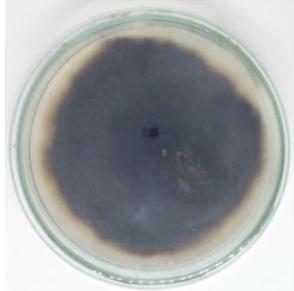
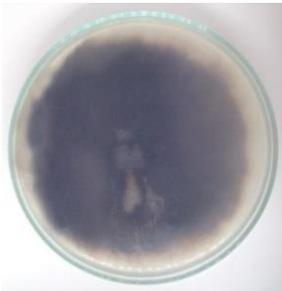
halus namun ada juga yang tidak teratur. Tekstur koloni yaitu berkapas, beludru hingga perpaduan beludru dan berkapas (Tabel 6).

Pengamatan mikroskopis cendawan *P. oryzae* menggunakan mikroskop compound menunjukkan bahwa konidiofor panjang bersekat-sekat, bentuk konidium *pyriform* (berbentuk seperti buah pir) bagian dasar membulat dan ujung meruncing, berwarna abu-abu hingga tidak berwarna (hialin) dengan dua septa dan tiga sel yang berbeda luas. Ukuran dan bentuk konidia berbeda-beda biasanya tergantung dari ras patogen dan kondisi lingkungan. Miselium tidak berwarna (hialin dan bersekat). Pada pengamatan mikroskopis ini juga tampak konidium yang berkecambah (Gambar 12).



Gambar 12. Karakteristik morfologi isolat *P. oryzae* di bawah mikroskop compound perbesaran 400x. Konidiofor bersekat, konidium dengan dua septa dan tiga sel (Kurrata, 2019)

Tabel 7. Morfologi kultur dan mikroskopis isolat *P. oryzae* yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|--|--|-------------------------------------|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 1. | PoBm1 | Inpari 4 (daun) |  |  |  | |
| 2. | PoBm2 | Inpari 4 (leher malai) |  |  |  | |

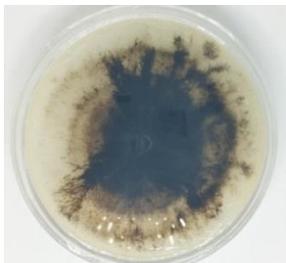
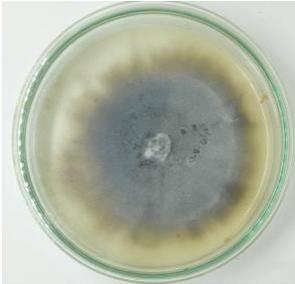
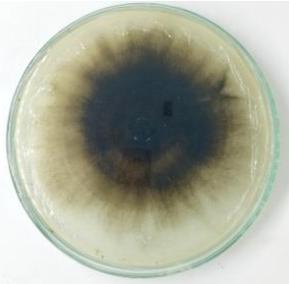
Putih dan tampak adanya massa seperti kapas

Pyriform, medium

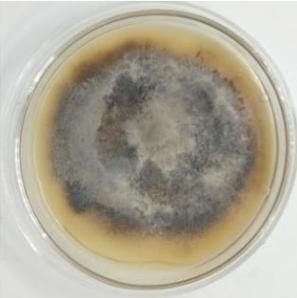
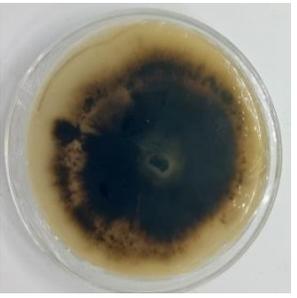
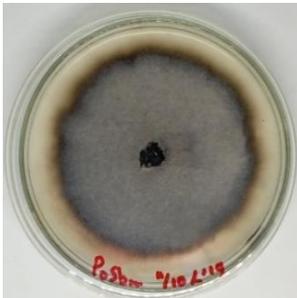
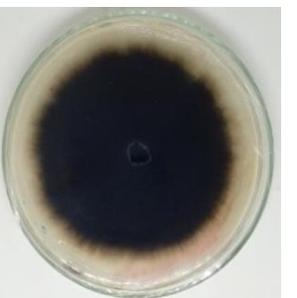
Hitam dan tampak seperti beludru

Pyriform, medium

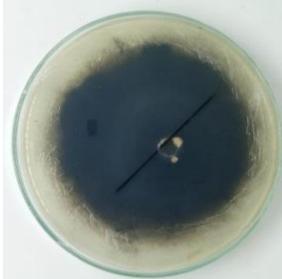
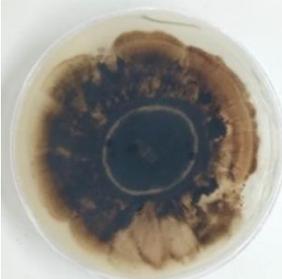
Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|--|--|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 3. | PoSb1 | Mekongga (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam kecoklatan tampak adanya massa seperti perpaduan kapas dan beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |
| 4. | PoSb2 | Mekongga (daun) |  | |  |  |
| | | | Abu-abu dan tampak seperti beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |

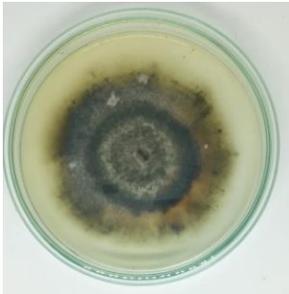
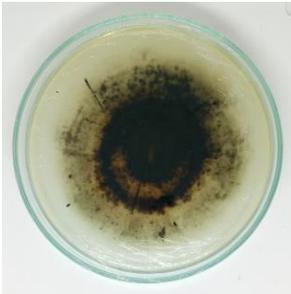
Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|--|--|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 5. | PoSb3 | Mekongga (kolar) |  | |  |  |
| | | | Hitam tampak adanya massa seperti kapas dan beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |
| 6. | PoSb4 | Mekongga (leher malai) |  | |  |  |
| | | | Abu-abu dan tampak seperti beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |

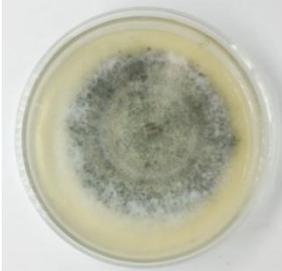
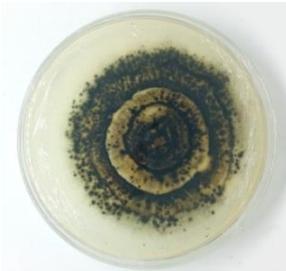
Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|--|--|-------------------------------------|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 7. | PoMb1 | Mekongga (daun) |  |  |  | <i>Pyriform, small</i> |
| 8. | PoMb2 | Mekongga (daun) |  |  |  | <i>Pyriform, small</i> |

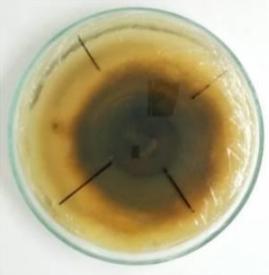
Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|--|--|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 9. | PoM11 | Ciherang (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam keabu-abuan dan tampak seperti beludru | | | <i>Pyriform, large</i> |
| 10. | PoM12 | Ciherang (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam keabuan dan tampak massa seperti kapas dan beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |

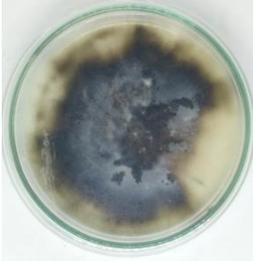
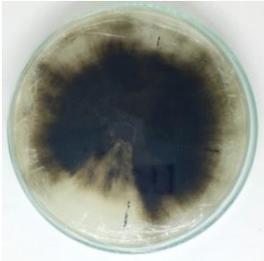
Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|--|--|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 11. | PoTI1 | Inpari 7 (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam dan tampak massa seperti kapas dan beludru | | | <i>Pyriform, small</i> |
| 12. | PoTI2 | Inpari 7 (daun) |  | |  |  |
| | | | Kecoklatan tampak massa seperti kapas dan beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |

Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|--|--|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 13. | PoTb1 | Ciherang (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam dan tampak massa seperti kapas | | | <i>Pyriform, small</i> |
| 14. | PoMd1 | Ciherang (daun) |  | |  |  |
| | | | Putih dan tampak massa seperti kapas | | | <i>Pyriform, small</i> |

Lanjutan Tabel 7

| No. | Kode isolat | Asal varietas (bagian jaringan tanaman) | Gambar variasi kultur isolat cendawan <i>P. oryzae</i> (warna koloni dan tampilan permukaan) | | | Gambar mikroskopis (bentuk konidia) |
|-----|-------------|---|--|-----|---|---|
| | | | Tampak depan | dan | Tampak belakang | |
| 15. | PoLu1 | Inpari 4 (daun) |  | |  |  |
| | | | Hitam keabuan dan tampak seperti beludru | | | <i>Pyriform, medium</i> |

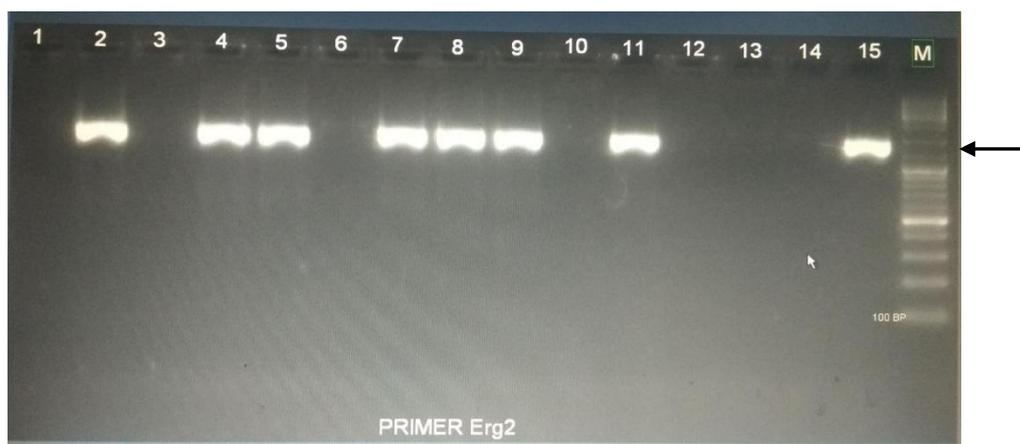
3. Analisa Gen Virulensi Cendawan *P. oryzae* Menggunakan Metode SCAR

Amplifikasi berdasarkan keberadaan gen penyandi gen spesifik virulensi (*Pwl2*, *Erg2* dan *Cut1*) dengan metode Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) menunjukkan bahwa primer tersebut tidak teramplifikasi pada semua isolat yang diuji. Hasil elektroforesis berdasarkan primer spesifik gen virulensi dari 15 isolat *P. oryzae* yang diuji

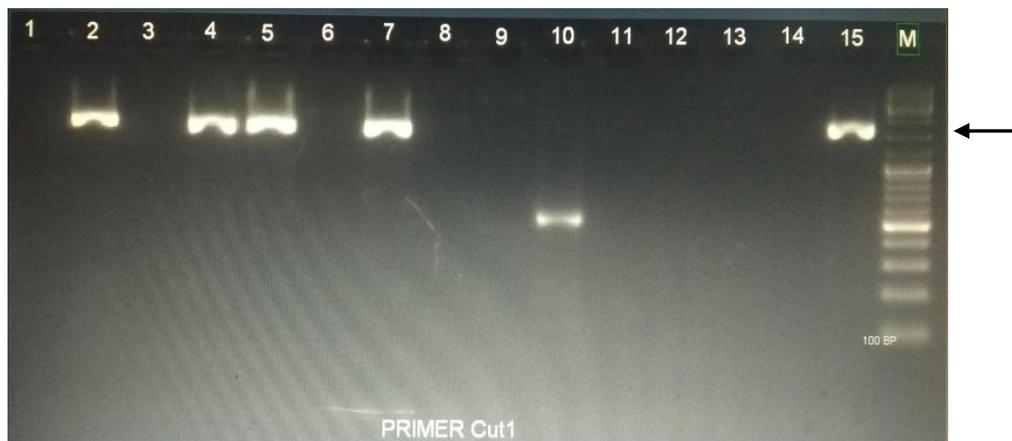
menunjukkan bahwa primer *Pw12* teramplifikasi pada 8 isolat dengan ukuran pita DNA yaitu 900 bp, primer *Erg2* teramplifikasi pada 8 isolat dengan ukuran pita DNA yaitu 1440 bp dan pada primer *Cut1* teramplifikasi sebanyak 5 isolat dengan ukuran referensi berkisar 800-1730 bp. Variasi ampikon pada isolat cendawan *P. oryzae* serta ukuran gen virulensi dapat dilihat pada Gambar 13-15.



Gambar 13. Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik *P. oryzae* dengan menggunakan primer *Pw12*. M = DNA ladder 100 bp. No. 1-15 = isolat *P. oryzae*. Tanda panah menampilkan pita polimorfik (900 bp)



Gambar 14. Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik *P. oryzae* dengan menggunakan primer *Erg2*. M = DNA ladder 100 bp. No. 1-15 = isolat *P. oryzae*. Tanda panah menampilkan pita polimorfik (1200 bp)



Gambar 15. Pola pita hasil amplifikasi DNA genomik *P. oryzae* dengan menggunakan primer *Cut1*. M = DNA ladder 100 bp. No. 1-15 = isolat *P. oryzae*. Tanda panah menampilkan pita polimorfik (1440 bp)

Hasil amplifikasi elektroforesis yang muncul pada setiap primer dari masing-masing isolat diskor dengan nilai 1 (ada pita DNA) dan 0 (tidak ada pita DNA). Hasil elektroforesis yang merupakan representasi masing-masing haplotipe berdasarkan pengelompokan kombinasi ketiga jenis gen (*Erg2*, *Pwl2* dan *Cut1*) diperoleh sebanyak 5 haplotipe meliputi haplotipe A-000 (4 isolat), haplotipe C-011 (3 isolat), haplotipe D-111 (2 isolat), haplotipe F-110 (3 isolat) dan haplotipe G-100 (3 isolat). Tidak ditemukan haplotipe B-001, E-010 dan H-101 pada isolat *P. oryzae* yang dianalisis. Hasil penentuan haplotipe tersebut disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Haplotipe cendawan *P. oryzae* berdasarkan pola amplikon ketiga gen virulensi yang ditemukan di delapan Kecamatan Kabupaten Maros

| No. | Kode isolat | Keberadaan amplikon | | | Haplotipe |
|-----|-------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|-----------|
| | | <i>Pwl2</i> (800-900 bp) | <i>Erg2</i> (1440 bp) | <i>Cut1</i> (800-1730 bp) | |
| 1. | PoBm1 | 1 | 0 | 0 | G-100 |
| 2. | PoBm2 | 0 | 1 | 1 | C-011 |
| 3. | PoSb1 | 0 | 0 | 0 | A-000 |
| 4. | PoSb2 | 1 | 1 | 1 | D-111 |
| 5. | PoSb3 | 0 | 1 | 1 | C-011 |
| 6. | PoSb4 | 0 | 0 | 0 | A-000 |
| 7. | PoMb1 | 1 | 1 | 1 | D-111 |
| 8. | PoMb2 | 1 | 1 | 0 | F-110 |
| 9. | PoMI1 | 1 | 1 | 0 | F-110 |
| 10. | PoMI2 | 0 | 0 | 0 | A-000 |
| 11. | PoTI1 | 1 | 1 | 0 | F-110 |
| 12. | PoTI2 | 0 | 0 | 0 | A-000 |
| 13. | PoTb1 | 1 | 0 | 0 | G-100 |
| 14. | PoMd1 | 1 | 0 | 0 | G-100 |
| 15. | PoLu1 | 0 | 1 | 1 | C-011 |

Ket: 0= tidak ada pita DNA, 1= ada pita DNA.

B. Pembahasan

Survei keparahan penyakit blas daun yang dilakukan pada tanaman padi sawah di Kabupaten Maros menunjukkan data hasil keparahan yang bervariasi. Data keparahan penyakit blas daun di delapan Kecamatan terdapat serangan kategori ringan, sedang dan berat. Berdasarkan Tabel 5, persentase keparahan penyakit terdapat di lokasi, varietas dan umur tanaman padi sebagai berikut: kategori berat terdapat di Kecamatan Simbang 42,12% (Mekongga 70 HST); kategori sedang terdapat di Kecamatan Maros Baru 23,33% (Mekongga 41 HST), Bantimurung 18,33% (Inpari 75 HST) dan Lau 17,22% (Inpari 4 75 HST); kategori ringan terdapat di Kecamatan Tanralili 6,57% (Inpari 7 52 HST), Mandai 7,96% (Ciherang 70 HST), Tompobulu 9,53% (Ciherang 70 HST) dan Moncongloe 10,46% (Ciherang 50 HST).

Perbedaan keparahan serangan penyakit blas dapat dipengaruhi oleh banyak faktor. Bila kita melihat konsep segitiga penyakit (*triangle disease*) kita mengenal adanya patogen yang virulen, tanaman yang rentan dan faktor lingkungan yang mendukung. Ou (1985) menyatakan bahwa faktor-faktor yang mempengaruhi ketahanan atau kerentanan suatu varietas padi terhadap cendawan *P. oryzae* adalah adanya gen ketahanan pada tanaman inang, tingkat virulensi cendawan *P. oryzae* dan lingkungan.

Perbedaan perkembangan laju luas bercak penyakit blas dapat dipengaruhi oleh ketahanan masing-masing varietas yang berbeda

terhadap penyakit. Rodrigues *et al.* (2004), melaporkan varietas padi yang tahan cenderung menghambat pembentukan spora blas dengan memproduksi fitoaleksin tertentu sebagai akibat interaksi antar patogen dan tanaman padi. Hasil persentase keparahan penyakit blas di lapangan menunjukkan bahwa varietas Ciherang dan Inpari 7 termasuk kategori ringan, varietas Inpari 4 termasuk kategori sedang, varietas Mekongga termasuk kategori berat dan sedang. Terkait dengan varietas, telah diteliti sebelumnya mengenai hubungan antara ketahanan suatu varietas terhadap serangan blas padi. Menurut Akhsan dan Palupi (2015) varietas Ciherang merupakan varietas yang tahan terhadap penyakit blas daun. Suganda dkk. (2016) juga melaporkan bahwa intensitas serangan blas pada varietas Ciherang di lokasi endemik serangannya lebih rendah pada blas daun tetapi serangannya lebih tinggi pada blas leher. Varietas Sintanur, varietas Pandan Wangi, varietas Ciherang dan varietas Mekongga yang digunakan oleh petani di Kabupaten Pringsewu memiliki sifat ketahanan yang sama yaitu medium tahan (*moderate*) terhadap penyakit blas daun, namun rentan terhadap blas leher malai (Adrian, 2018). Hasil penelitian Yulianto (2009), varietas Mekongga merupakan varietas agak tahan. Hasil penelitian Adrian (2018) dan Yulianto (2009) tersebut kurang gayut dengan hasil pengamatan pada penelitian ini, khususnya tingkat keparahan blas pada varietas Mekongga di dua kecamatan. Kategori berat di Kecamatan Simbang dan kategori sedang di

Kecamatan Maros Baru. Kategori keparahan penyakit menunjukkan varietas tersebut relatif rentan terhadap serangan patogen blas.

Hasil tersebut tentunya menarik untuk dikaji. Menurut Santoso dan Nasution (2008) perkembangan penyakit blas dipengaruhi oleh banyak faktor termasuk iklim makro dan mikro (musim, kelembaban dan suhu), lingkungan, kesuburan tanah, virulensi patogen dan ketahanan varietas. Besarnya luas serangan ditentukan oleh peran faktor tersebut, namun selain memperhatikan faktor ketahanan varietas dan virulensi patogen, faktor perilaku petani dalam penerapan sistem budidaya dan pengendalian juga memiliki peran sangat penting dan berpengaruh bagi perkembangan patogen. Berdasarkan pengamatan dan hasil wawancara dengan petani dan petugas pengamat hama dan penyakit di Kecamatan Simbang, faktor utama yang menyebabkan keparahan penyakit blas terjadi karena perilaku petani dalam hal cara tanam dan pemupukan serta kondisi pengairan pertanaman padi. Faktor pertama terkait dengan perilaku budidaya petani. Pada lokasi pengamatan, petani menerapkan cara tanam dengan sistem hambur/sebar langsung. Cara tanam ini dilakukan karena dirasa oleh petani pola tanam tersebut lebih efisien baik segi waktu, tenaga dan biaya serta disesuaikan dengan kondisi ketersediaan air pada saat waktu penanaman. Cara tanam dengan sistem hambur menyebabkan jarak tanam menjadi lebih rapat. Patogen blas berkembang biak cepat pada tanaman padi yang berjarak tanam rapat sehingga akan mempermudah terjadinya infeksi dan penularan dari satu

tanaman ke tanaman yang lain. Pada jarak tanam rapat memiliki kelembaban udara mikro yang tinggi. Pertanaman yang terlalu rapat akan menciptakan kondisi lingkungan terutama suhu, kelembaban dan aerasi yang lebih menguntungkan bagi perkembangan penyakit (Sudir 2011). Faktor kedua penyebab keparahan penyakit blas adalah penggunaan pupuk urea yang berlebihan oleh petani. Kecepatan pertumbuhan cendawan *P. oryzae* juga akan semakin tinggi jika pemupukan urea dilakukan secara berlebihan. Penggunaan pupuk N yang berlebihan akan memacu pertumbuhan vegetatif yaitu jumlah anakan tanaman padi lebih banyak. Hal ini menyebabkan iklim mikro (suhu dan kelembapan) meningkat sehingga menjadi kondusif bagi perkembangan patogen blas (Shafaullah *et al.* 2011). Menurut Yuliani dan Maryana (2014) kelembapan udara mempengaruhi perkembangan bercak. Peran kelembapan udara baik iklim makro maupun mikro serta pembentukan embun sangat menentukan perkembangan penyakit blas. Makin tinggi jumlah pupuk N yang diaplikasikan maka makin tinggi tingkat keparahan penyakit blas. Jumlah pupuk nitrogen yang diaplikasikan ke pertanaman padi berkorelasi positif dengan keparahan blas. Kelebihan pupuk N membuat tanaman menjadi lebih rentan karena dapat melemahkan jaringan tanaman dan lebih mudah untuk dipenetrasi oleh patogen (Seebold *et al.* 2004). Faktor ketiga adalah kondisi pertanaman yang kekurangan air. Pada saat pengamatan bertepatan dengan musim gadu (kemarau) dan khusus lokasi pertanaman padi di Kecamatan Simbang dan Maros Baru merupakan padi

sawah tadah hujan. Tanaman padi kekurangan air rentan terhadap penyakit blas. Mew *et al.* (1986) menyatakan intensitas penyakit blas di lahan sawah tadah hujan dapat berbeda antar musim tanam dan antar daerah. Kurangnya curah hujan sangat mendukung perkembangan penyakit blas pada lahan tadah hujan. Menurut Yulianto (2017) kekurangan air diduga menyebabkan kadar silika tanaman rendah. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mew *et al.* (1986), ketebalan dan kekerasan dinding sel dipengaruhi oleh kandungan silika dalam jaringan tanaman sehingga mempengaruhi penetrasi patogen ke dalam jaringan tanaman.

Secara umum, hasil pengamatan keparahan penyakit blas pada penelitian ini memperlihatkan bahwa faktor cara budidaya berpengaruh terhadap intensitas serangan patogen blas. Seringkali pengendalian penyakit blas yang dilakukan hanya menggunakan satu cara, kurang berhasil secara memuaskan. Oleh karena itu, pengendalian penyakit blas perlu dilaksanakan melalui pengelolaan teknik-teknik pengendalian secara terpadu.

Persentase keparahan penyakit blas padi di tujuh kecamatan selain di Kecamatan Simbang lebih rendah yaitu kategori sedang dan ringan, terdapat di Kecamatan Bantimurung, Maros Baru, Lau, Moncongloe, Tanralili, Tompobulu dan Mandai. Berdasarkan pengamatan, selain karena faktor lingkungan yang kurang menguntungkan bagi perkembangan patogen blas juga dipengaruhi faktor perilaku petani dalam sistem budidaya dan pengendalian. Sebaliknya dengan di Kecamatan

Simbang, pada lokasi pengamatan di tujuh kecamatan lainnya petani menerapkan cara tanam dengan pengaturan jarak tanam yang tidak terlalu rapat atau jajar legowo. Cara tanam jajar legowo merupakan salah satu cara pengendalian terpadu yang dianjurkan untuk menekan perkembangan patogen penyebab penyakit. Cara tanam tersebut akan mengurangi kelembaban di sekitar kanopi pertanaman, mengurangi terjadinya embun dan air gutasi dan gesekan daun antar tanaman sebagai media penularan patogen (Sudir, 2014). Pengendalian terpadu lainnya yang diterapkan petani yaitu pemupukan berimbang. Ketika terjadi serangan blas di lapangan, petani menggunakan pupuk N dan K secara berimbang dengan menghindari pemupukan N terlalu tinggi. Dalam menekan serangan patogen blas, petani memberikan perlakuan pengendalian berupa penyemprotan fungisida saat tanaman fase vegetatif, sebelum serangan patogen blas semakin meningkat. Hal tersebut sesuai dengan laporan petugas pengamat hama dan penyakit di Kecamatan Bantimurung. Kategori serangan blas padi pada fase vegetatif di lokasi tersebut adalah skala 7 (berat), tetapi karena cepat dilakukan tindakan pengendalian menggunakan fungisida maka serangan blas padi menurun, sehingga pada saat tanaman memasuki fase generatif skala serangan menjadi skala 5 (sedang). Fungisida yang umum digunakan oleh petani setempat adalah Fujiwan 400 EC (berbahan aktif Isoprotiolan) dan Folia 252 SE (berbahan aktif Trisiklazole). Untuk menekan populasi blas sebelum menyerang leher malai, perlu dilakukan penyemprotan

fungisida minimum dua kali yaitu pada saat anakan maksimum dan awal berbunga (Sudir *et al.* 2002). Ketersediaan pengairan atau irigasi di lokasi tersebut juga relatif tersedia walaupun penanaman dilakukan saat musim gadu (kemarau).

Keragaman populasi dan tingkat virulensi patogen blas sangat mempengaruhi keparahan penyakit. Hingga saat ini telah terdeteksi 64 ras patogen blas. Masing-masing ras memiliki keganasan (virulensi) yang berbeda, bergantung pada varietas yang ditanam dan kondisi lingkungan mikro sekitar pertanaman padi. Menurut Yuliani dan Maryana (2014), perbedaan dan perubahan reaksi suatu varietas terhadap blas disebabkan oleh adanya perbedaan dan perubahan ras antar lokasi dan komposisi ras yang dominan di suatu wilayah. Sudir *et al.* (2014) menyatakan bahwa sebaran dan dominasi ras yang muncul pada setiap lokasi berbeda-beda memungkinkan varietas yang sama pada suatu lokasi tertentu tahan, sedangkan pada lokasi lain bersifat rentan. Hal ini menunjukkan bahwa cendawan penyebab penyakit blas mudah membentuk ras baru dengan tingkat virulensi tinggi sehingga dengan cepat dapat mematahkan ketahanan varietas. Oleh karena itu, diperlukan varietas tahan yang memiliki gen ketahanan banyak (*polygenic resistant*), agar sifat ketahanannya bertahan lama (*durable resistant*). Varietas tahan ini berguna untuk mengatasi penyakit blas yang sebaran dan banyaknya ras berbeda-beda pada setiap lokasi (Sudir *et al.*, 2014).

Karakteristik morfologi makroskopis isolat cendawan yang telah diisolasi dan ditumbuhkan pada media PDA menunjukkan adanya variasi berkaitan dengan warna koloni dan tekstur koloni, yaitu terlihat variasi warna koloni mulai dari putih, perpaduan putih dan abu-abu kehitaman hingga perpaduan putih, coklat dan abu-abu kehitaman dengan tekstur koloni beludru, berkapas hingga perpaduan beludru dan berkapas. Pola koloni melingkar menyerupai cincin konsentris yang mengarah ke pusat dengan tekstur koloni beludru.

Tidak ada variasi terkait dengan karakter morfologi secara mikroskopis, yaitu konidia berbentuk *pyriform*, berwarna abu-abu hingga tidak berwarna (hialin) dengan dua septa dan tiga sel. Namun pada hasil pengamatan mikroskopis berdasarkan isolat yang diperoleh terdapat variasi ukuran konidia. Sesuai perbedaan ukuran yang diperoleh diklasifikasikan menjadi tiga yaitu *small*, *medium* dan *large*. Konidia ukuran *small* terlihat pada isolat-isolat PoMb1, PoMb2, PoTl1, PoTb1 dan PoMd1. Ukuran *medium* pada PoBm1, PoBm2, PoSb1, PoSb2, PoSb3, PoSb4, PoMl2, PoTl2, PoLu1. Ukuran *large* pada isolat PoMl1. Ou (1985) melaporkan pengamatan mikroskopis cendawan *P. oryzae* menunjukkan bahwa konidium berbentuk seperti buah pir (*pyriform*) dengan dua sekat dan hialin. Ukuran konidium *P. oryzae* berkisar antara 19-23 μm \times 7-9 μm . Ukuran dan bentuk konidia berbeda-beda tergantung dari ras patogen dan kondisi lingkungan.

Warna koloni isolat cendawan *P. oryzae* yang telah diisolasi dan ditumbuhkan pada media buatan cenderung mengalami perubahan dari abu-abu kehitaman menjadi putih setelah disubkultur terus-menerus. Secara umum koloni *P. oryzae* cenderung tidak stabil selama disubkultur berulang-ulang di laboratorium. Tidak ada kaitan antara karakter morfologi dan mikroskopis isolat-isolat *P. oryzae* yang ditumbuhkan pada media buatan dengan gen virulensi *P. oryzae* yang ditemukan. Valent dan Chumley (1991), menjelaskan bahwa isolat-isolat cendawan *P. oryzae* cenderung tidak stabil penampakan koloninya, fertilitas dan patogenisitasnya selama disubkultur terus-menerus di laboratorium.

Isolat cendawan blas yang diisolasi dari lahan pertanaman padi terinfeksi penyakit blas di delapan kecamatan Kabupaten Maros menunjukkan keragaman yang tinggi. Pola pita DNA (hasil elektroforesis yang merupakan representasi masing-masing haplotipe) dari 15 isolat *P. oryzae* yang dianalisis berdasarkan primer penyandi gen virulensi (*Pw2*, *Erg2* dan *Cut1*) menggunakan metode SCAR menghasilkan 5 haplotipe yaitu haplotipe A-000 terbanyak ditemukan di 4 lokasi (4 isolat: Kecamatan Simbang, Moncongloe, Tanralili dan Tompobulu). Selanjutnya haplotipe C-011, F-110 dan G-100 ditemukan masing-masing di 3 lokasi yaitu haplotipe C-011 (3 isolat: Kecamatan Bantimurung, Simbang dan Lau), haplotipe F-110 (3 isolat: Kecamatan Maros Baru, Moncongloe dan Tanralili) dan haplotipe G-100 (3 isolat: Kecamatan Bantimurung, Tompobulu dan Mandai). Haplotipe D-111 ditemukan di 2 lokasi (2 isolat:

Kecamatan Simbang dan Maros Baru). Tidak ditemukan haplotipe B-001, E-010 dan H-101 pada isolat *Po* yang dianalisis.

Ditinjau dari keragaman haplotipe *P. oryzae* pada tiap lokasi, antar lokasi terdapat perbedaan jenis dan jumlah haplotipe yang diperoleh. Tiga haplotipe ditemukan di Kecamatan Simbang (haplotipe A,C,D). Dua haplotipe ditemukan yaitu di Kecamatan Bantimurung (haplotipe G-100, C-011), Maros Baru (haplotipe D-111, F-110), Moncongloe (haplotipe F-110, A-000) dan Tanralili (haplotipe F-110, A-000). Satu haplotipe ditemukan di Kecamatan Tompobulu (haplotipe G-100), Mandai (haplotipe G-100) dan Lau (haplotipe C-011).

Hasil penelitian tersebut jika dibandingkan dengan hasil penelitian Rianingsih (2017) dan Izha (2018) untuk mengetahui keragaman genetik isolat *P. oryzae* yang berasal dari beberapa daerah/Kabupaten di Sulawesi Selatan menggunakan primer spesifik gen virulensi (*Cut1*, *Erg2* dan *Pw12*) maka ditemukan jumlah dan jenis haplotipe yang lebih beragam di Kabupaten Maros. Deteksi molekuler 10 isolat *P. oryzae* oleh Rianingsih (2017) dari Kabupaten Bone, Maros dan Gowa ditemukan 3 haplotipe yaitu C-011, E-010 dan F-110. Haplotipe C-011 yang dominan. Sedangkan hasil deteksi molekuler Izha (2018) terhadap 10 isolat *P. oryzae* dari Kabupaten Pinrang ditemukan 2 haplotipe yaitu F-110 (8 isolat) dan G-100 (2 isolat).

Jika dikaitkan data hasil analisis gen terkait virulensi pada isolat-isolat uji menggunakan metode SCAR dengan tingkat keparahan penyakit

blas di delapan kecamatan Kabupaten Maros maka terdapat hubungan antara kategori tingkat keparahan serangan blas dengan jumlah dan haplotipe yang diperoleh. Lokasi kecamatan yang memiliki kategori serangan berat ditemukan isolat dengan jumlah terbanyak dan haplotipe yang beragam. Seperti yang telah diuraikan pada pembahasan di atas, Kecamatan Simbang merupakan lokasi pengamatan yang memiliki tingkat keparahan penyakit blas daun terparah kategori serangan berat ditemukan sebanyak 4 isolat dan 3 jenis haplotipe. Lokasi yang memiliki tingkat keparahan kategori sedang dan ringan ditemukan jumlah isolat relatif lebih sedikit daripada lokasi yang memiliki tingkat keparahan penyakit blas kategori berat yaitu berkisar 1-2 isolat. Secara umum lokasi dengan kategori keparahan sedang isolat yang diperoleh lebih banyak daripada kategori ringan. Selanjutnya jenis haplotipe berbeda ditemukan pada dua isolat dalam satu lokasi seperti di Kecamatan Bantimurung (G-100 dan C-011), Maros Baru (D-111 dan F-110) dan Moncongloe (A-000 dan F-110).

Adanya perbedaan atau keragaman haplotipe dipengaruhi oleh banyak faktor. Sesuai dengan pendapat Tenjo dan Hamer (2002), keragaman haplotipe *P. oryzae* tidak lepas dari pengaruh faktor lingkungan seperti suhu dan kelembapan, baik pada lokasi yang sama maupun berbeda. Menurut Chen *et al.* (1995), perbedaan agroekologi sumber isolat *P. oryzae* dapat menyebabkan diferensiasi yang besar dalam sidik jari DNA genomik cendawan dengan marka *MGR586*. Agrios

(1988) *dalam* Lestari *et al.* (2014) mengemukakan bahwa lingkungan dapat mempengaruhi ketersediaan inokulum, tingkat pertumbuhan patogen, daya tahan hidup patogen dan kerentanan genetik inang serta arah dan jarak penyebaran patogen.

Berkaitan dengan patogenisitas terhadap penyakit blas padi, mayoritas cendawan *P. oryzae* mempunyai gen *Cut1*, *Pwl2* dan *Erg2*. Di antara total isolat cendawan *P. oryzae*, gen yang paling besar ditemukan proporsinya adalah gen *Pwl2* dan *Erg2* masing-masing (53,33%) selanjutnya *Cut1* (26,67%). Perkembangan *P. oryzae* selama proses infeksi dikendalikan oleh banyak gen (Tenjo dan Hamer, 2002). Primer *Cut1* merupakan gen yang menyandikan enzim *cutinase* berfungsi sebagai pendegradasi lapisan kitikula tanaman (Sweigard *et al.*, 1992), *Erg2* merupakan lokus DNA yang berperan sebagai penyandi metabolit sekunder pada cendawan yang menjadi target antifungal pada sel tanaman (Keon *et al.*, 1994) dan *Pwl2* sebagai gen avirulen yang bersifat spesifik inang (Valent dan Chumley, 1994).

Beberapa isolat (PoSb1, PoSb4, PoMI2 dan PoTI2) yang tidak teramplifikasi sesuai ukuran target pada primer *Erg2*, *Pwl2* dan *Cut1* kemungkinan bahwa isolat-isolat tersebut tidak mempunyai gen yang disandikan oleh ketiga primer tersebut atau dapat juga disebabkan oleh adanya peristiwa mutasi yaitu adanya aktivitas semacam elemen transposon (fragmen elemen loncat). Mekanisme yang dapat menerangkan variasi ras *P. oryzae* dapat terjadi melalui mutasi atau

rekombinasi (Zeigler, 1998). Mutasi dan rekombinasi merupakan sumber utama bagi cendawan patogen tumbuhan dalam menghasilkan variasi genetik, seperti halnya pada kebanyakan organisme. Mutasi memiliki kontribusi yang efektif dalam keragaman populasi. Perubahan besar dalam virulensi juga dapat diakibatkan oleh peristiwa mutasi (Burdon dan Silk 1997). Mutasi cendawan penyebab blas padi mungkin akibat jumlah kandungan elemen-elemen semacam transposon yang banyak. Jumlahnya lebih dari 30 jenis seperti *grh*, *MAGGY*, *MGLR-3*, *Pot2*, *Pot3*, (Kito *et al.*, 2002).

Penelitian Lestari dkk. (2014), melaporkan bahwa isolat yang mengandung satu atau dua gen virulen tidak stabil kemungkinan sering mengalami mutasi spontan yang berpengaruh cukup tinggi terhadap virulensinya. *P. oryzae* yang mengalami gen dengan frekuensi mutasi normal menunjukkan bahwa ketidakstabilan genetik dapat mempengaruhi bagian tertentu genom *P. oryzae* dan efeknya bervariasi tergantung ras (Valent, 1997). Dilaporkan oleh Valent dan Chumley (1994) bahwa gen virulen, termasuk *Pw2* tidak stabil. Dalam penelitian ini, isolat *P. oryzae* yang mengandung satu atau lebih gen virulen tidak stabil seperti haplotipe D-111, F-101 dan G-100.

Populasi *P. oryzae* sangat beragam dan terdiri dari individu-individu ras yang mempunyai sifat virulensi yang berbeda (Zeigler *et al.* 1994). Dominasi genetik *P. oryzae* di suatu wilayah dengan wilayah lain yang berbeda memungkinkan varietas padi di suatu wilayah tahan tetapi rentan

di wilayah lain. Informasi sebaran gen terkait virulensi *P. oryzae* sangat diperlukan untuk memprediksi kesesuaian varietas yang akan dilepas (spesifik lokasi). Hal ini sangat penting untuk regionalisasi varietas sesuai dengan sebaran gen terkait virulensi *P. oryzae* di wilayah tersebut. Dengan diketahuinya sebaran gen terkait virulensi *P. oryzae* yang dominan di suatu wilayah endemik blas maka pengendalian penyakit blas akan lebih efektif dengan menggunakan varietas tahan yang disesuaikan dengan gen *P. oryzae* di wilayah tersebut.

Menurut Amir *et al.* (1999), *P. oryzae* diketahui mempunyai keragaman genetik yang tinggi. Diantara tekanan evolusi yang sangat berperan dalam pembentukan struktur genetik patogen adalah seleksi tanaman inang, terutama akibat tekanan gen ketahanan dari tanaman oleh gen virulen pada patogen (Leung *et al.*, 1993). Keragaman genetik (haplotipe) yang menggambarkan famili genetik cendawan blas dapat dianalisis menggunakan marka molekuler. Haplotipe yang dihasilkan dengan metode Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) dengan menggunakan ketiga primer ada kaitannya dengan virulensi dan menggambarkan keragaman genetik patogen secara molekuler (Soubarbere *et al.*, 2001). Ketiga gen tersebut telah dikembangkan menjadi primer yang dapat digunakan untuk memonitor rekombinasi dan perubahan struktur populasi *P. oryzae*. Informasi yang dihasilkan merupakan data dari studi biologi populasi cendawan blas guna memberikan informasi tentang dinamika populasi patogen ini. Dengan

demikian marka berbasis PCR merupakan teknik yang direkomendasikan untuk mendeteksi genetik fitopatogen (Annamalai *et.al.*, 1995) termasuk *P. oryzae*.

Pengkajian tentang keparahan penyakit dan dinamika keragaman genetik cendawan blas terkait virulensi di lapang menggunakan marka molekuler merupakan langkah awal yang perlu dilakukan sehingga dapat memberikan pandangan baru tentang dinamika evolusi gen-gen terkait virulensi dari ras *P. oryzae* untuk lokasi tertentu. Sehingga mekanisme interaksi tanaman padi dengan blas lebih dipahami sebagai rekomendasi kepada pemulia tanaman dalam mengembangkan varietas unggul tahan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

1. Tingkat keparahan serangan penyakit blas *P. oryzae* tertinggi di Kecamatan Simbang dengan persentase sebesar 42,12% (varietas Mekongga) disusul oleh Kecamatan Maros Baru 23,33% (varietas Mekongga), Kecamatan Tanralili (varietas Inpari 7) 7,6% dan terendah di Kecamatan Mandai (varietas Ciherang) 7,88%.
2. Tingkat keparahan serangan penyakit blas *P. oryzae* ditentukan oleh patogen blas yang virulen, tanaman padi yang rentan/ketahanan varietas padi dan faktor lingkungan yang mendukung. Selain memperhatikan faktor tersebut, faktor perilaku petani dalam penerapan sistem budidaya dan pengendalian juga memiliki peran sangat penting dan berpengaruh bagi perkembangan patogen blas.
3. Sebanyak 15 isolat cendawan yang diisolasi teridentifikasi memiliki karakter morfologi makroskopis dan mikroskopis sesuai dengan *P. oryzae*.
4. Pola pita DNA dari 15 isolat *P. oryzae* yang dianalisis berdasarkan primer penyandi gen virulensi (*Pwl2*, *Erg2* dan *Cut1*) menggunakan metode SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), menghasilkan 5 haplotipe yaitu: A-000 (4 isolat), C-011 (3 isolat), D-111 (2 isolat), F-110 (3 isolat) dan G-100 (3 isolat).
5. Gen yang paling besar ditemukan proporsinya adalah gen *Pwl2* dan *Erg2* masing-masing (53,33%) selanjutnya *Cut1* (26,67%).

B. Saran

1. Metode lain untuk mengetahui tingkat keparahan penyakit blas perlu dilakukan seperti metode perangkap spora, sehingga dapat diketahui hubungan antara jumlah spora dengan intensitas penyakit blas. Selain itu diperlukan data iklim mikro (suhu, kelembaban) di sekitar tajuk tanaman padi dan data curah hujan. Caranya dengan meletakkan alat termometer dan higrometer digital pada ketinggian 50 cm dari permukaan tanah persawahan.
2. Penelitian lanjutan terhadap sebaran ras dan analisis gen virulensi cendawan *P. oryzae* dengan jumlah isolat yang lebih besar terutama dari daerah lain di Sulawesi Selatan sangat diperlukan untuk pengembangan informasi mengenai penyebaran ras dan keragaman genetik (haplotipe) *P. oryzae* di Indonesia terutama di Sulawesi Selatan.
3. Pentingnya diteliti perilaku petani dalam menerapkan pola tanam dan pengelolaannya dikaitkan dengan intensitas keparahan serangan penyakit blas *P. oryzae*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adrian, L., 2018. Pengaruh Varietas dan Paket Pemupukan N, P dan K Terhadap Intensitas Penyakit Blas (*Pyricularia oryzae* Cav.) Serta Produksi Padi. [Disertasi]. Bandar Lampung. Pasca Sarjana, Universitas Lampung.
- Agrios, N. G., 1988. *Plant Pathology*. Academic Press, University of Florida, USA. pp. 198-235.
- Akhsan, N., dan Palupi, P. J., 2015. Pengaruh waktu terhadap intensitas penyakit blast dan keberadaan spora *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. pada lahan padi sawah (*Oryzae sativa*) di Kecamatan Samarinda Utara. *ZIRAA'AH*, 40(2): 114-122.
- Amir, M., dan Nasution, A., 1993. Status dan pengendalian blas di Indonesia. Kinerja Penelitian Tanaman Pangan. Buku II. Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Pangan III Jakarta/Bogor 23-25 Agustus 1993. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor
- Amir, M. dan Kardin M. K., 1991. *Dalam*: Soenarjo, E., D.S. Damardjati, dan M. Syam (Eds.). Padi. Jilid 3. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor. Hal. 825-844.
- Amir, M., Santoso, Nasution, A., dan Kustianto, B., 2003. Pemetaan *Pyricularia grisea* di daerah endemik blas di sentra produksi padi sawah dan padi gogo. Laporan Akhir Tahun Balitpa. Sukamandi: Balai Penelitian Tanaman Padi.
- Amril, B., Aziz, A., dan Nasrun, D., 1993. Teknologi pengendalian penyakit blas pada padi gogo di lahan kering masam. Kinerja Penelitian Tanaman Pangan. Buku II. Prosiding Simposium Penelitian Tanaman Pangan III Jakarta/Bogor 23-25 Agustus 1993. Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman pangan. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Bogor
- Anandaraj, M., Chandran, S., George, R. S., Bhat, A. I., and Bhai, R. S., 2008. Development of SCAR Marker for Phytophthora Resistance in Black Pepper (*Piper nigrum* L.). *Journal of Spices and Aromatic Crops*, 17(3): 215-222.
- Annamalai, P., Ishii, H., Lalithakumari, D., and Revathi, R., 1995. Polymerase chain reaction and its application in fungal diseases diagnosis. *J. Plant Dis. Prot.*, 102: 91-104.

- Asuyama, H., 1965. Morphology, taxonomy, host range and life cycle of *Piricularia oryzae*. In Chandler, R.F.Jr (Ed.) *the Rice Blast disease. Proceedings of Symposium, IRRI*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. pp. 9-22
- Badan Pusat Statistik Sulawesi Selatan. 2018. Luas panen dan produksi beras di Indonesia 2018 (Hasil kegiatan pendataan statistik pertanian tanaman pangan terintegrasi dengan metode kerangka sampel area). Badan Pusat Statistik. URL: <https://www.bps.go.id/publication/2018/12/21/543c607a9ce62960d929060f/> (diakses tanggal 7 Mei 2019).
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Maros. 2019. Kabupaten Maros dalam angka 2019. Badan Pusat Statistik Kabupaten Maros. <https://maroskab.bps.go.id/publication/2019/08/16/29239258c554034ae6c0fc79/kabupaten-maros-dalam-angka-2019.html> (diakses tanggal 20 Maret 2020).
- Balai Proteksi Tanaman Pangan dan Hortikultura Sulawesi Selatan. 2014. Laporan serangan organisme pengganggu tanaman Sulawesi Selatan musim tanam 2004-2013. Pemerintah Daerah Provinsi Sulawesi Selatan.
- Ballini, E., Morel, J. B., Droc, G., Price, A., Courtois, B., Notteghem, J. L., and Tharreau, D., 2008. A genome-wide meta-analysis of rice blast resistance genes and quantitative trait loci provides new insights into partial and complete resistance. *Mol Plant Microbe Interact.*, 21: 859-68.
- Barr, M. E., 1977. *Magnaporthe*, *Telimenella* and *Hyponectria* (Physosporrellaceae). *Mycologia*, 69: 952-966.
- Barrie, F.R., Buck, W.R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D.L., Herendeen, P.S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prud'homme Van Reine, W.F., Smith, G.F., Wiersema, J.H., Turland, N.J. 2012. *International code of nomenclature for algae, fungi, and plants: (Melbourne code)*. A.R.G. Gantner Verlag KG.
- Bonman, J. M., Vergel De Dios, T. I., and Khin, M. M., 1986. Physiologic specialization of *Pyricularia oryzae* in the Philippines. *Plant Dis.*, 70: 767-769.
- Bourett, T. M., and Howard, R. J., 1990. In vitro development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Canadian Journal of Botany*, 68: 329-342.
- Burdon, J. J., and Silk, J. 1997. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi. *Phytopathology*, 87:664-669.
- CABI. 2019. *Magnaporthe oryzae* (rice blast disease), (Online). <https://www.cabi.org/isc/datasheet/46103> (diakses tanggal 20 Januari 2020).

- Castroagudín, V. L., Moreira, S. I., Pereira, D. A. S., Moreira, S. S., Brunner, P. C., Maciel, J. L. N., Crous, P. W., McDonald, B. A., Alves, E. and Ceresini, P. C. 2016. Wheat blast disease caused by *Pyricularia graminis-tritici* sp. nov. *bioRxiv preprint first posted online Apr. 30, 2016*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/051151>.
- Cavara, F., 1891. Fungi Longobardiae exsiccati sive mycetum specimina in *Longobardia collecta*, exsiccata et speciebus novis vel criticis, iconibus illustrata. *Pugillus* I no. 49 (Cited in Padwick GW. 1950 p. 18).
- Chao, C. T., and Ellingboe, A. H., 1997. Genetic analysis of avirulence/virulence of an isolate of *Magnaporthe grisea* from a rice field in Texas. *Phytopathology*, 87: 71-76.
- Chen, D., Zeigler, R. S., Leung, H., and Nelson, R. J., 1995. Population structure of *Pyricularia grisea* at two screening sites in the Philippines. *Phytopathology*, 85: 1011-1020.
- Choi, J., Park, S. Y., Kim, B. R., Roh, J. H., Oh, I. S., Han, S. S. and Lee, Y.H., 2013. Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. *PLoS ONE*, 8(2): e57196. .
- Couch, B. C. and Kohn, L. M., 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia*. 94: 683-693.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J. R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y. H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M. H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L. J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E., and Birren, B. W., 2005. The genome sequence of the rice blast fungus . *Nature*, 434(7036): 980-986.
- de Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N. and Talbot, N. J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389: 244-245.
- Dixon, K. P., Xu, J.-R., Smirnoff, N. and Talbot, N. J. 1999. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*. 11: 2045-2058.
- Direktorat Jenderal Tanaman Pangan. 2015. Laporan akuntabilitas kinerja instansi pemerintah (Lakip) Direktorat Jenderal Tanaman Pangan Tahun 2015. URL: <http://tanamanpangan.pertanian.go.id/assets/front/uploads/docume>

- nt/LAKIP_2015_DITJEN_TANAMAN_PANGAN.pdf. Diakses 14 November 2019.
- Divya, B., Robin, S., Rabindran, R., Manjunath, H., Valarmathi, P. and Joel, A. J. 2014. Resistance reaction of gene introgressed lines against rice blast (*Pyricularia oryzae*) disease. *Australasian Plant Pathology* 43: 177-191.
- Ebbole, D. J. 2007. *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 45: 437-456.
- Faatih, M. 2009. Isolasi dan digesti DNA kromosom isolation and digestion of chromosomal DNA. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, 10(1): 61-67.
- FAO. 2016. FAO Rice Market Monitor (RMM) Volume XIX, Issue No. 4 December 2016. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. URL: <http://www.fao.org/economic/est/publication/rice-publication/rice-market-monitor-rmm/en/>. Diakses 12 Mei 2019.
- Fatchiyah, E.L. Arumningtyas, S. Widyarti, S. Rahayu. 2011. *Biologi molekuler prinsip dasar analisis*. Erlangga. Jakarta. Hal. 48-57
- Fernandez, J. and Wilson, R. (2014). Cells in cells: morphogenetic and metabolic strategies conditioning rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Protoplasma*. 251: 37-47.
- Fitrianna, Y. 2011. Uji ketahanan 48 galur padi terhadap penyakit blast (*Pyricularia oryzae*) ras 001. Skripsi. Bogor: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor.
- Fukuta, Y., Xu, D., Kobayashi, N., Jeanie, M., Yanoria, T., Hairmansis, A., Hayashi, N. 2009. Genetic characterization of universal differential varieties for blast resistance developed under the IRRI-Japan Collaborative Research Project using DNA markers in rice (*Oryza sativa* L.). pp. 35-68. In Yoshimichi Fukuta. Casiana M, Crus V, Kabayashi N. (Eds.). Development and characterization of blast resistance using differential varieties in rice. *JIRCAS Working report* No. 63. Tsukuba. Japan.
- Gaffar, S. 2007. *Buku ajar biologi molekuler*. Jurusan Kimia, Fakultas MIPA. Universitas Padjajaran: Bandung.
- Galhano, R. and Talbot, N. J. (2011). The biology of blast: Understanding how *Magnaporthe oryzae* invades rice plants. *Fungal Biology Reviews*. 25: 61-67.
- Gerena, J.L. 2006. *Mapping QTL controlling durable resistance to rice blast in the cultivar Oryzica llanos 5*. Disertasi. Manhattan, Kansas:

Department of Plant Pathology Collage of Agriculture. Kansas State University.

- Hai LH, Kim PV, Du PV, Thuy TTT, & Thanh DN. 2007. Grain yield and grain-milling quality as affected by rice blast disease (*Pyricularia grisea*), at My Thanh Nam, Cai Lay, Tien Giang. *Omonrice* 15:102-107.
- Hanum, C. 2008. *Teknik budidaya tanaman* Jilid 2. Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan. Jakarta.
- Hasanah, I. 2007. *Bercocok tanam padi*. Azka Mulia Media. Jakarta.
- Hasanuddin, A. 2004. Pengendalian hama dan penyakit padi: upaya tiada henti. Puslitbangtan. Badan Litbang Pertanian. Hal. 45-61.
- Hawksworth, D. L., McNeill, J., de Beer, Z. W. and Wingfield, M. J. 2013. Names of fungal species with the same epithet applied to different morphs: how to treat them. *IMA Fungus*. 4:53–56
- Hayashi, N and Fukuta, Y. 2009. Proposal for a new international system of differentiating races of blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) by using LTH monogenic lines in rice (*Oryza sativa* L.). *JIRCAS Working Report*. 63: 11-15.
- Hebert, T.T. 1971. The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology*. 61: 83-87.
- Hemi,T. and J. Imura. 1989. On the relation of air humidity to conidial formation in the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* and the characteristics in the germination of conidia produced by strain showing different pathogenicity. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 9: 147-156.
- Hernandez, P., Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G. and Martin, A. 2001. Development of SCAR Markers in olive (*Olea europea*) by direct sequencing of RAPD products: Applications in olive germplasm evaluation and mapping. *Theoretical and Applied Genetics*. 103: 788-791.
- Ikedo, K.I., Nakayashiki, H., Kataoka, T., Tamba, H., Hashimoto, Y., Tosa, Y. and Mayama, S. 2002. Repeat-induced point mutation (RIP) in *Magnaporthe grisea*: Implication on its sexual cycle in the natural field context. *Mol Microbiol*. 45(5):1355-1364
- International Rice Research Institute [IRRI]. 1996. *Standard evaluation system manual*. IRRI, Manila, Philippines.
- International Rice Research Institute [IRRI]. 2013. *Standart evaluation system for rice*. 5thed. IRRI, Manila, Philippines.

- Igarashi, S., Utiamada, C., Igarashi, L., Kazuma, A., and Lopes, R. 1986. *Pyricularia* em trigo. 1. Ocorrência de *Pyricularia* sp. no estado do Paraná. *Fitopatologia Brasileira*. 11: 351-352.
- Izha, M.N.Y. 2018. *Karakteristik morfologi, penyebaran ras dan analisa gen virulensi pada isolat-isolat Pyricularia oryzae (teleomorph: Magnaporthe oryzae) dari Kabupaten Pinrang*. Tesis. Makassar: Pascasarjana, Universitas Hasanuddin.
- Joko dan Tasliah. 2004. Perkembangan bioteknologi untuk menanggulangi penyakit blas. *Warta Balitbio*. 24: 5-7.
- Joshi, M. and Deshpande, J.D. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *Int jour of biomed res [Internet]*.1(5):81–97. URL: <https://ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>. Diakses 15 April 2020.
- Kang, S. and Lee, Y. H. 2000. Population structure and race variation of the rice blast fungus. *Plant Pathol. J.* 16:1-8.
- Kankanala, P., Czymmek, K. and Valent, B. 2007. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *The Plant Cell*. 19: 706-724.
- Kato, H. 2001. Rice blast disease. *Pesticide Outlook*. 12: 23-25.
- Kato, H., Yamamoto, M., Yamaguchi-Ozaki, T., Kadouchi, H., Iwamoto, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Mayama, S. and Mori, N. 2000. Pathogenicity, mating ability and DNA restriction fragment length polymorphisms of *Pyricularia* populations isolated from Gramineae, Bambusideae and Zingiberaceae plants. *Journal of General Plant Pathology* 66: 30-47.
- Keon J.P., James, C.S. and Court, S. Baden-Daintree C., Bailey A.M., Burden R.S., Bard M., and Hargreaves J.A.1994. Isolation of *Erg2* gene, encoding sterol delta 8 to delta isomerase, from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis* *Curr. Genet.* 25(6): 531-537.
- Kharisma S. D., Cholil, A., Aini L. Q. 2013. Ketahanan beberapa genotipe padi hibrida (*Oryza sativa* L.) terhadap *Pyricularia oryzae* Cav. penyebab penyakit blas daun padi. *Jurnal HPT*. 1(2):19-27.
- Khemruk, W. 2016. *Plant pathogenic magnaporthales in Australia, with particular reference to Pyricularia oryzae on wild and cultivated rice*. Tesis. Australia: *The University of Queensland*. Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation
- Khush G.S and Jena, K. 2009. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.), *Advances in genetics, genomics and control of rice blast*. (Eds.) Wang, G. and

- Valent, B. (Germany: Springer Science Business Media B.V). pp. 1-10.
- Kim, S. G., Kim, K. W., Park, E. W., Choi, D. 2002. Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanism of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*. 92: 1095-1103.
- Kito, H., Sato, J., Takahashi, Y., Fukiya, S., Sone, T. and Tomita, F. 2002. Occan, a new transposon-like sequence in *Magnaporthe grisea* [abstrak]. In: *Abstracts 3rd International Rice Blast Conference*; Ibaraki, 11-14 Sept 2002. Japan: Tsukuba International Congress Center-Epochal Tsukuba- Tsukuba Science City. Abstr no 29. pp. 15.
- Klaubauf, S., Tharreau, D., Fournier, E., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., de Vries, R. P. and Lebrun, M. H. 2014. Resolving the polyphyletic nature of *Pyricularia* (Pyriculariaceae). *Studies in Mycology*. 79: 85-120.
- Koutroubas S. D, Katsantonis D, Ntanos D. A, and Lupotto E. 2009. Blast disease influence on agronomic and quality traits of rice varieties under Mediterranean conditions. *Turk. J. Agric. for Forestry* 33: 487-494.
- Krause, R. A. and Webster, R. K. (1972). The morphology, taxonomy, and sexuality of the rice stem rot fungus, *Magnaporthe salvinii* (*Leptosphaeria salvinii*). *Mycologia*. 64: 103-114.
- Kubo, M. and Purevdorj, M. 2004. The Future of rice production and consumption. *Journal of Food Distribution Research*. 35(1): 128-142.
- Lau, G. W. And Ellingboe, A. H. 1993. Genetic analysis of mutations to increased virulence in *Magnaporthe grisea*. *Phytopathology*. 83: 1093-1096.
- Lehninger, A. L. 1982. *Dasar-dasar biokimia. jilid 1*. Erlangga. Jakarta.
- Leung, H., R.J. Nelson, and J.E. Leach. 1993 Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv. Plant Pathol.*10:157-205.
- Lestari, P., Wawan, Priyatno, T. P., Enggarini, W., Reflinur dan Suryadi, Y. 2014. Isolasi, identifikasi dan karakterisasi cendawan blas *Pyricularia oryzae* hasil rejuvenasi. *Buletin Plasma Nutfah* 20(1): 19-26
- Luo, J. and Zhang, N. 2013. *Magnaportheiopsis*, a new genus in Magnaporthaceae (Ascomycota). *Mycologia*. 105(4): 1019-1029.
- Madigan, M.T., Martinko, J. M. and Parker, J. 2000. "*Biology of microorganisms*". 9th edition. Prentice Hall International, Inc., New Jersey.

- Makarim, A. K. dan Suhartatik, E. 2009. *Morfologi dan fisiologi tanaman padi*. Sukabumi, Subang: Balai Besar Penelitian Tanaman Padi.
- Meena, B. S. 2005. *Morphological and molecular variability of rice blast pathogen Pyricularia grisea*. Master Thesis. Dharwal Univ. of Agric. Sci. 87 p.
- Mew, T. W., A.K.M. Shahjahan, and V. Mariappan. 1986. Diseases and disease management of rainfed lowland rice. Pages 339-348 in Progress in rainfed lowland rice. International Rice Research Institute, P.O. Box 933, Nasution A. dan N. Usyati. 2015. Observasi ketahanan varietas padi lokal terhadap penyakit blas (*Pyricularia grisea*) di rumah kaca. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat BIODIV Indonesia* 1(1): 19-22. Manila, Philippines.
- Motallebi, P. Javan-Nikkhah, M., Okhovvat, S.M., Fotouhifar, K.B., Bargnil, M. 2009. Vegetative compatibility groups within Iranian populations of *Magnaporthe grisea* species complex from rice and some grasses. *J Plant Pathol.* 91(2): 469-473.
- Muladno. 2002. *Teknologi rekayasa genetika*. Pustaka Wirausaha Muda-USESE Foundation. Bogor.
- Murata, N., Aoki, T., Kusaba, M., Tosa, Y. and Chuma, I. 2014. Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in Magnaporthaceae. *Journal of General Plant Pathology.* 80: 66-72.
- Nandy, S., N. Manda, P. K. Bhowmik, M. A. Khan, and S. K. Basu. 2010. Sustainable management of rice blast (*Magnaporthe grisea* (Habbert) Bar.): 50 years of research progress in molecular biology. In Arya and A.E. Parello (Eds.) Management of fungal plant pathogens. CAB International. pp. 92-106.
- Nasution A. dan N. Usyati. 2015. Observasi ketahanan varietas padi lokal terhadap penyakit blas (*Pyricularia grisea*) di rumah kaca. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat BIODIV Indonesia* 1(1): 19-22.
- Nurfadillah. 2016. Uji Potensi dan kompatibilitas bakteri agens hayati untuk pengendalian *Pyricularia oryzae* penyebab penyakit blas pada padi. Skripsi. Bogor: Departemen Proteksi Tanaman. Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor.
- Okada, M. and Yaegashi, H. 1985. Blast disease of two rowed barley. *Proc. Kanto-Tosan Plant Protect. Soc.* 32: 50-51.
- Osbourn, A. E. 1996. Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Ou, S. H. 1985. *Rice blast disease*. (2nd edition). England: Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. 380 p

- Phillips, D., Chandrashekar, M. and McLean, G. (1992). Evaluation of potential disease and pest risks associated with paddy as a contaminant of milled rice imported into Australia. *FAO Plant Protection Bulletin*. 40: 4-20.
- Paoletta P. 1998. *Introduction to Molecular Biology*. McGraw-Hill Companies. New York.
- Paran, I. and Michelmore, R. W. 1993. Development of Reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 985-999.
- Park, M. J. and Shin, H. D. 2009. A new species of *Pyricularia* on *Commelina communis*. *Mycotaxon*. 108: 449-456.
- Purnamaningsih, R. 2006. Induksi kalus dan optimasi regenerasi empat varietas padi melalui kultur in vitro. Balai Besar Penelitian dan Pengawasan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian. Bogor. *Jurnal AgroBiogen*. 2(2): 74-80.
- Rais, S. A., Silitonga, T. S., Budiarti, S. G. dan Nasution, A. 2001. Evaluasi ketahanan plasma nutfah padi dan jagung terhadap penyakit. *Dalam: Balai Penelitian Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Pangan, editor. Prosiding Seminar Hasil Penelitian Rintisan dan Bioteknologi Tanaman, Bogor, 26-27 Desember 2001*. Bogor: BPP Press. Hal. 52-62.
- Reflinur, Bustamam, M., Widyastuti, U. dan Aswidinnoor, H. 2005. Keragaman genetik cendawan *Pyricularia oryzae* berdasarkan primer spesifik gen virulensi. *J. Biotek. Pertanian* 10: 55-60.
- Reflinur. 2005. *Keragaman genetik cendawan Pyricularia grisea berdasarkan primer spesifik gen virulensi dan interaksinya terhadap gen ketahanan padi*. Tesis. Bogor: Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Rianingsih. 2017. *Studi keragaman ras Isolat Pyricularia oryzae Cavara penyebab penyakit blas pada tanaman padi dari beberapa Kabupaten di Sulawesi Selatan*. Tesis. Makassar: Pascasarjana, Universitas Hasanuddin.
- Rodrigues, F. A., McNally, D. J., Datnoff, L. E. and Jones, J. B. 2004. Silicon enhances the accumulation of diterpenoid phytoalexins in rice: a potential mechanism for blast resistance. *Phytopath*. 94: 177-183.
- Rossmann, A. Y., Howard, R. J. and Valent, B. 1990. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fungus. *Mycologia*. 82: 509-512.
- Schleif, R. 1993. *Molecular and cellular biology*. Wadsworth Inc, Belmont.

- Saleh, D., Xu, P., Shen, Y., Li, C., Adreit, H., Milazzo, J., Ravigne, V., Bazin, E., NOTTÉGHM, J. L. and Fournier, E. 2012. Sex at the origin: an Asian population of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* reproduces sexually. *Molecular Ecology*. 21: 1330-1344.
- Siregar, H. 1981. Budi daya tanaman padi di Indonesia. Sastra Hudaya. Bogor.
- Santoso dan Nasution, A. 2008. Pengendalian penyakit blas dan penyakit cendawan lainnya. Buku Padi 2. Hlm. 531-563. *Dalam: Darajat A.A., A. Setyono, A.K. Makarim, dan A. Hasanuddin (Eds.). Padi Inovasi Teknologi. Balai Besar Penelitian Tanaman Padi. Sukamandi. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian*
- Santoso, Nasution, A., Utami, D. W., Hanarida, I., Ambarwati, A. D., Moeljopawiro, S. dan Tharreau, D. 2007. Variasi genetik dan spectrum virulensi patogen blas pada padi asal Jawa Barat dan Sumatera. *Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 26(3): 150-155.
- Scardaci, S. C., R. K. Webster, C. A. Greer, J. E Hill, J. G. Williams, R. G. Muters, D.M. Brandon, K.S. McKenzie, and J.J. Oster. 1997. Rice blast: A new disease in California. Agronomy Fact Sheet Series 1997-2. Davis, CA, USA: Department of Agronomy and Range Science, University of California.
- Scheuermann, K. K., de Andrade, A., Wickert, E., Raimondi, J. V. and Marschalek, R. 2012. *Magnaporthe oryzae Genetic Diversity and its Outcomes on the Search for Durable Resistance*. *Dalam: Caliskan, M. (Ed.) The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity*. INTECH Open Access Publisher. pp. 331-356.
- Seebold KW, Datnof JLE, Correa-victoria FJ, Kuchare KTA and Snyder GH. 2004. Effect of silicon, nitrogen, and fungicides on the control of leaf and neck blast in upland rice. *Plant Dis*. 88(3):253-258.
- Sesma, A., and Osbourn, A. E. 2004. The rice leaf blast pathogen undergoes developmental processes typical of root-infecting fungi. *Nature*. 431: 582-586.
- Shafaullah, Khan, M. A., Khan, N. A., Salim-il-Yasin, and Mahmood, Y. 2011. Response of rice germplasm to blast disease under field conditions. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 23(1): 52-55.
- Skamnioti, P., and Gurr, S. J. 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends in Biotechnology*. 27: 141-150.
- Soubabere, O., Jorge, V., Notteghem, J. L., Lebrun, M. H. and Tharreau, D. 2001. Sequence characterized amplified region markers for the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecular Ecology Notes*. 1: 19-21.

- Struck, C. 2006. Infection strategies of plant parasitic fungi. In "*The epidemiology of plant diseases*" (B. M. Cooke, D. G. Jones and B. Kaye (Eds.)), Springer Netherlands. pp. 117-137.
- Srivastava, D., Shamim, Md., Kumar, D., Pandey, P., Khan, N. A. and Singh, K. N. 2014. Morphological dan molecular characterization of *Pyricularia oryzae* causing blast diseases in rice (*Oryza sativa*) from North India. *International Journal of Scientific and Research Publications*. 4(7): 1-9.
- Subhankar, R. B. and Chattoo, B. B. 2005. Rice blast fungus sequenced. *Current Science*. 89(6): 930-931.
- Sucipto, I. 2016. *Eksplorasi bakteri dan cendawan endofit sebagai agens pengendali penyakit blas (Pyricularia oryzae) pada padi sawah*. Tesis. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Sudir, Nasution, A., Santoso, dan Nuryanto, B. 2014. Penyakit blas *Pyricularia grisea* pada tanaman padi dan strategi pengendaliannya. *Jurnal Iptek Tanaman Pangan*. 9(2): 85-96.
- Suganda, T., E. Yulia, F. Widiyanti, dan Hersanti. 2016. Intensitas penyakit blas (*Pyricularia oryzae* Cav.) pada padi varietas Ciherang di lokasi endemik dan pengaruhnya terhadap kehilangan hasil. *Jurnal Agrikultura*. 27(3): 154-159.
- Suwandi, Hamidson, H. dan Muslim, A. 2016. Penekanan penyakit blas leher malai padi menggunakan ekstrak kompos jerami padi. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 12(3): 104-108.
- Sweigard, J. A., Chumley, F. G. and Valent, B. 1992. Disruption of *Magnaporthe grisea* cutinase gene. *Mol. Gene Genet*. 232: 183-190.
- Syahputra, A., Mutaqin K. H , Damayanti T. A., 2016. Komparasi metode isolasi DNA patogen antraknosa dan bulai untuk deteksi PCR. *J Fitopatol Indones*. 12(4): 124-132
- Taheri, P., and Irannejad, A. (2014). Genetic structure of various *Magnaporthe oryzae* populations in Iran and Uruguay. *Australasian Plant Pathology*. 43: 287–297.
- Talbot, N.J. 2003. On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology* 57: 177-202.
- Tan, S. C, Yiap, B.C. 2009. Review article DNA, RNA and protein extraction: the past and the present. *J Biomed Biotech*. 2009: 1-10.
- Taufik, M. 2011. Evaluasi ketahanan padi gogo lokal terhadap penyakit blas (*Pyricularia oryzae*) di lapang. *Agriplus*. 21(1): 68-74.
- TeBeest, D.O., Guerber, C. and Ditmore, M. 2007. Rice Blast. *Journal of Plant Disease*. 10: 109-113.

- Teng, P. S., Klein-Gebbinck, H.W. and Pinnschmidt, H. 1991. An Analysis of the blast pathosystem to guide modeling and forecasting. *In: Rice blast modeling and forecasting*. International Rice Research Institute Los Banos. The Philippines. pp. 1-30.
- Tenjo, F. A. and J. E. Hamer. 2002. Pathogenic development in *Magnaporthe grisea*. p. 399-418. In J.W. Goethe (Ed.) *Molecular biology of fungal development*. Germany: Universitat Frankfurt
- Tharreau, D., Fudal, I., Andriantsimialona, D., Santoso, Utami, D., Fournier, E., Lebrun, M.-H. and Nottéghem, J.-L. 2009. World population structure and migration of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *In "Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease"* (G.-L. Wang and B. Valent, Eds.), Springer Netherlands. pp. 209-215.
- Theerakulpisut, P., N. Kanawapee, D., Maensiri, S., Bunnag and Chantaranothai, P. 2008. Development of species-specific SCAR markers for identification of three medicinal species of *Phyllanthus*. *Journal of Systematics and Evolution*. 46(4): 614-621.
- Thomas, K.M 1940. Detailed administration report of the government mycologist, Madras, for the year 1939-40. Madras Dept. Agr. Rept. 1939-40. *rev. Appl. Mycol.* 20(4): 148-150
- Thongkantha, S., Jeewon, R., Vijaykrishna, D., Lumyong, S., McKenzie, E. H. C. and Hyde, K. D. (2009). Molecular phylogeny of Magnaporthaceae (Sordariomycetes) with a new species *Ophioceras Chiangdaoense* from *Dracaena loureiroi* in Thailand. *Fungal Diversity*. 34: 157-173.
- Ulfah, N., Dwitya, R., Suwarman dan Kusprayogie, Y. 2013. Prakiraan Serangan 7 OPT Padi MK. 2013. *Buletin Peramalan OPT*. Vol: 12. No. 1. Karawang: Balai Besar Peramalan Organisme Pengganggu Tanaman (BBPOPT).
- Urashima, A. S., Igarashi, S. and Kato, H. (1993). Host range, mating-type and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Disease* 77: 1211-1216.
- Utami, D. W., Aswidinnoor, H., Moelyopawiro, S., Hanarida, I., dan Reflinur. 2006. Pewarisan ketahanan penyakit blas (*Pyricularia grisea* Sacc.) pada persilangan Padi IR64 dengan *Oryza rufipogon* Griff. *J. Hayati* 13(3): 107-112.
- Valent, B. and Chumley, F. G. 1994. Avirulence genes and mechanisms of genetic instability in rice blast fungus. pp. 111-134. In R.S. Zeigler, S.A. Leong, and P.S. Teng (Eds.). *Rice Blast Disease*. Wallingford (UK): CAB International-IRRI, Manila, Philippines.
- Wang, X., S. Lee, J. Wang, J. Ma, T. Bianco, and Y. Jia. 2014. Current advances on genetic resistance to rice blast disease. Chapter 7 in

- Rice-Germplasm, Genetics and Improvement (W. Yan and J. Bao. Eds.). URL: <http://www.intechopen.com/books/rice-germplasmgenetics-and-improvement/current-advances-on-genetic-resistance-to-rice-blast-disease>. Diakses 15 Januari 2020.
- Watson, J. D., T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine and R. Losick. 2004. Molecular biology of the gene. 5th edition. Benjamin Cumming. pp. 681-683.
- Wilson, R. A. and Talbot, N. J. 2009. Under Pressure: Investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Nature Reviews Microbiology*. 7: 185-195.
- Windarsih, G. 2014. *Aplikasi marka molekuler untuk seleksi ketahanan blas pada populasi padi haploid ganda*. Tesis. Bogor: Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Wingfield, M. J., De Beer, Z. W., Slippers, B., Wingfield, B. D., Groenewald, J.Z., Lombard, L. and Crous, P.W. 2012. One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13: 604-613.
- Yadav, M. K, Aravindan, S., Mukherjee, A. K, Bag, M. K, and Lenka, S. 2015. Sheath rot: Emerging threat to rice production. *Everyman's Science*. L(5): 286-288
- Yuliani D. dan Maryana Y. E. 2014. Integrasi teknologi pengendalian penyakit blas pada tanaman padi di lahan sub-optimal. *Dalam: Herlinda S, Suwandi, Taqwa FH, Tanbiyaskur, Handayanto E, Sarjan, Aini N, Rajiman, Mardhiana (Eds). Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal*. PUR-PLSO UNSRI. Palembang 26-27 September 2014. pp. 835-845
- Yulianto, Sutoyo, dan Prayudi, B. 2014. Penyebaran penyakit blas pada tanaman padi di dataran rendah dan dataran tinggi Jawa Tengah. Seminar Hasil-Hasil Penelitian Pengkajian DIPA-APBN 2013 BPTP Jawa Tengah. Ungaran.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Zeigler, R. S. 1998. Recombination in *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Phytopathol*.36:249-275.
- Zeigler R. S, Tohme J, Nelson R, Levy M, and Correa-Victoria FJ. 1994. Lineage exclusion: A proposal for linking blast population analysis to resistance breeding. Rice blast disease. CAB International IRR 267-292.
- Zeigler, R., Cuoc, L., Scott, R., Bernardo, M., Chen, D., Valent, B. and Nelson, R. (1995). The relationship between lineage and virulence in *Pyricularia grisea* in the Philippines. *Phytopathology*. 85: 443-451

Zulaikha, Soekarno B. P, Nurmansyah, Ali. 2018. Pemodelan keparahan penyakit blas pada tanaman padi di Kabupaten Subang. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 14(2): 47-53.

LAMPIRAN

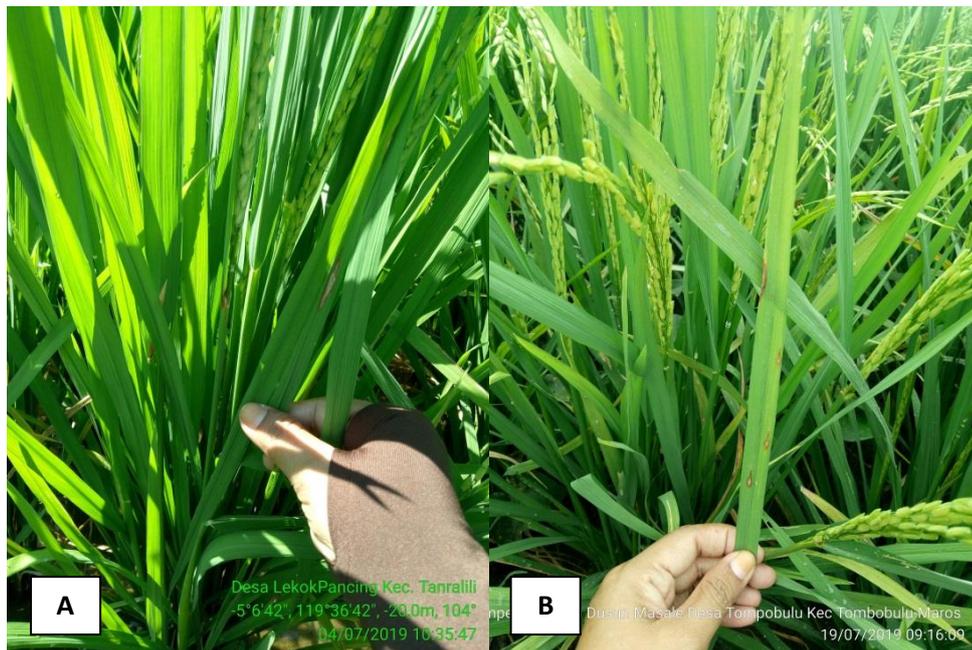
Lampiran 1. Tanaman padi yang terserang blas di delapan Kecamatan Kabupaten Maros



Gambar Lampiran 1a. Tanaman padi terserang blas di Kecamatan Bantimurung (A) dan di Kecamatan Simbang (B)



Gambar Lampiran 1b. Tanaman padi terserang blas di Kecamatan Maros Baru (A) dan di Kecamatan Moncongloe (B).



Gambar Lampiran 1c. Tanaman padi terserang blas di Kecamatan Tanralili (A) dan di Kecamatan Tombobulu (B)



Gambar Lampiran 1d. Tanaman padi terserang blas di Kecamatan Mandai (A) dan di Kecamatan Lau (B)

Lampiran 2. Deskripsi Varietas Padi

CIHERANG

| | |
|----------------------------------|--|
| Nomor seleksi | : S3383-1D-PN-41-3-1 |
| Asal persilangan | : IR18349-53-1-3-1-3/3*IR19661-131-3-1-3//4*IR64 |
| Golongan | : Cere |
| Umur tanaman | : 116-125 hari |
| Bentuk tanaman | : Tegak |
| Tinggi tanaman | : 107-115 cm |
| Anakan produktif | : 14-17 batang |
| Warna kaki | : Hijau |
| Warna batang | : Hijau |
| Warna telinga daun | : Tidak berwarna |
| Warna lidah daun | : Tidak berwarna |
| Warna daun | : Hijau |
| Muka daun | : Kasar pada sebelah bawah |
| Posisi daun | : Tegak |
| Daun bendera | : Tegak |
| Bentuk gabah | : Panjang ramping |
| Warna gabah | : Kuning bersih |
| Kerontokan | : Sedang |
| Kerebahan | : Sedang |
| Tekstur nasi | : Pulen |
| Kadar amilosa | : 23% |
| Indeks Glikemik | : 54 |
| Bobot 1000 butir | : 28 g |
| Rata-rata hasil | : 6,0 t/ha |
| Potensi hasil | : 8,5 t/ha |
| Ketahanan terhadap Hama Penyakit | : Tahan terhadap wereng coklat biotipe 2 dan agak tahan biotipe 3 Tahan terhadap hawar daun bakteri strain III dan IV |
| Anjuran tanam | : Baik ditanam di lahan sawah irigasi dataran rendah sampai 500 m dpl. |
| Pemulia | : Tarjat T, Z. A. Simanullang, E. Sumadi dan Aan A. Daradjat |
| Dilepas tahun | : 2000 |

MEKONGGA

| | |
|-----------------------------|---|
| Nomor seleksi | : S4663-5D-KN-5-3-3 |
| Asal persilangan | : A2790/2*IR64 |
| Golongan | : Cere |
| Umur tanaman | : 116-125 hari |
| Bentuk tanaman | : Tegak |
| Tinggi tanaman | : 91-106 cm |
| Anakan produktif | : 13-16 batang |
| Warna kaki | : Hijau |
| Warna batang | : Hijau |
| Warna telinga daun | : Tidak berwarna |
| Warna lidah daun | : Tidak berwarna |
| Warna daun | : Hijau |
| Muka daun | : Agak kasar |
| Posisi daun | : Tegak |
| Daun bendera | : Tegak |
| Bentuk gabah | : Ramping panjang |
| Warna gabah | : Kuning bersih |
| Kerontokan | : Sedang |
| Tekstur nasi | : Pulen |
| Kadar amilosa | : 23% |
| Indeks glikemik | : 88 |
| Bobot 1000 butir | : 28 g |
| Rata-rata hasil | : 6,0 t/ha |
| Potensi hasil | : 8,4 t/ha |
| Ketahanan terhadap Penyakit | : Agak tahan terhadap hawar daun bakteri strain IV |
| Ketahanan terhadap Hama | : Agak tahan terhadap wereng coklat biotipe 2 dan 3 |
| Anjuran tanam | : Baik ditanam di lahan sawah dataran rendah sampai ketinggian 500 m dpl |
| Instansi pengusul Pemulia | : Balitpa dan BPTP Sultra : Z. A. Simanullang, Idris Hadade, Aan A. Daradjat, dan Sahardi |
| Tim peneliti | : B. Suprihatno, Y. Samaullah, Atito DS., Ismail B. P., Triny S. Kadir, dan A. Rifki |
| Teknisi | : M. Suherman, Abd. Rauf Sery, Uan D., S. Toyib S. M., Edi S. MK, M. Sailan, Sail Hanafi, Z. Arifin, Suryono, Didi dan Neneng S |
| Dilepas tahun | : 2004 |

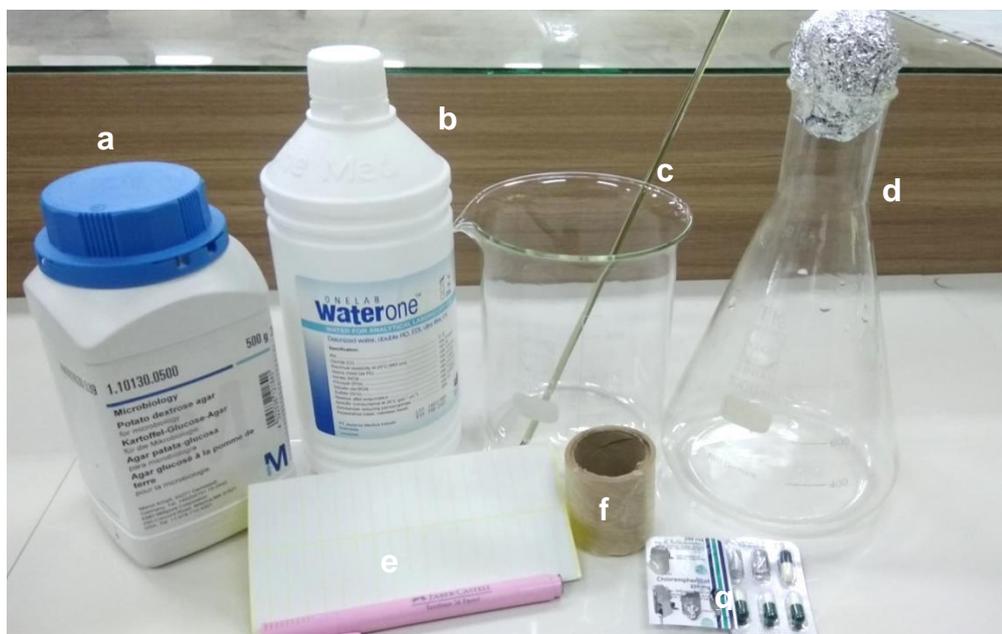
INPARI 4

| | |
|-----------------------------|--|
| Nomor Persilangan | : BP2280-1E-12-2 |
| Asal persilangan | : S4384F-14-1/Way Apo Buru/S4384F-14-1 |
| Golongan | : Cere |
| Umur tanaman | : 115 hari |
| Bentuk tanaman | : Sedang |
| Tinggi tanaman | : 95-105 cm |
| Anakan produktif | : 16 anakan |
| Warna kaki | : Hijau |
| Warna telinga daun | : Putih |
| Warna lidah daun | : Hijau |
| Warna daun | : Hijau |
| Permukaan daun | : Kasar |
| Posisi daun | : Tegak |
| Posisi daun bendera | : Tegak |
| Warna batang | : Hijau |
| Kerebahan | : Sedang |
| Kerontokan | : Sedang |
| Bentuk gabah | : Panjang dan Ramping |
| Warna gabah | : Kuning bersih |
| Rata-rata hasil | : 6,04 t/ha |
| Potensi hasil | : 8,80 t/ha GKG |
| Bobot 1000 butir | : 25 g |
| Tekstur nasi | : Pulen |
| Kadar amilosa | : 21,07% |
| Ketahanan terhadap Hama | : Agak rentan terhadap hama Wereng Batang Coklat Biotipe 1,2 dan 3 |
| Ketahanan terhadap penyakit | : Agak tahan terhadap penyakit Hawar Daun Bakteri strain III dan IV serta agak rentan strain VIII, agak tahan terhadap Hawar Daun Bakteri strain IV dan VIII, agak tahan penyakit virus tungro inokulum varian 073 dan 031 |
| Keterangan | : Cocok ditanam pada lahan irigasi dengan ketinggian sampai 600 m dpl. |
| Pemulia | : Aan A. Daradjat, dan Bambang Suprihatno. |
| Peneliti | : I.N. Widiarta, Baehaki S.E., Triny S.K., S. Dewi Indrasari, Prihadi Wibowo, Omi Syahromi, Nafisah, Cucu Gunarsih, Estria Furry P. |
| Teknisi | : Toyib S. Ma`ruf, Maman Suherman, Meru, Uan Sudjanang, M. Sailan, Zaenal Arifin, Karmita, Sukanda, Suwarsa, Dede Munawar. |
| Pengusul | : Balai Besar Penelitian Tanaman Padi |
| Alasan utama dilepas | : Lebih tahan terhadap HDB Strain IV daripada Ciherang, hasil dan mutu sama dengan Ciherang |
| Dilepas tahun | : 2008 |

INPARI 7 LANRANG

| | | |
|----------------------------------|---|--|
| Nomor pedigri | : | RUTTST96B-15-1-2-2-2-1 |
| Asal persilangan | : | S3054-2D-12-2/Utri Merah-2 |
| Golongan | : | Cere |
| Umur tanaman | : | 110-115 hari |
| Bentuk tanaman | : | Tegak |
| Tinggi tanaman | : | 104 ±7 cm |
| Anakan produktif | : | 16 ± 3 anakan |
| Warna kaki | : | Hijau |
| Warna batang | : | Hijau |
| Warna telinga daun | : | Putih |
| Warna lidah daun | : | Hijau |
| Warna daun | : | Hijau |
| Muka daun | : | Kasar |
| Posisi daun | : | Tegak |
| Daun bendera | : | Tegak |
| Bentuk gabah | : | Panjang (P=7,06mm ; L=2,20 mm; P/L=3,21) |
| Warna gabah | : | Kuning bersih |
| Kerontokan | : | Sedang |
| Kerebahan | : | Sedang |
| Tekstur nasi | : | Pulen |
| Kadar amilosa | : | 20,78% |
| Bobot 1000 butir | : | 27,4 g |
| Rata-rata hasil | : | 6,23 ton/ha |
| Potensi hasil | : | 8,7 ton/ha |
| Ketahanan terhadap Hama Penyakit | : | Agak rentan terhadap hama WBC biotipe 1, 2 dan 3 Agak tahan terhadap penyakit HDB ras III, dan agak rentan ras IV dan VIII; serta rentan terhadap penyakit virus Tungro inokulum no. 073 dan 031, agak tahan penyakit virus tungro inokulum no. 013 |
| Anjuran tanam | : | Cocok ditanam di ekosistem sawah dataran rendah sampai ketinggian 600 dpl. |
| Instansi Pengusul | : | Balai Besar Penelitian Tanaman Padi, Loka Penelitian Tanaman Tungro, Lanrang dan BPTP Sulawesi Selatan |
| Pemulia | : | Aan Andang Daradjat, Nafisah dan Bambang Suprihatno |
| Peneliti | : | I NyomanWidiarta, Jumanto, Burhanuddin, A. Yasin Said, Sahardi, Ahmad Muliadi, R. Heru Praptana, Baehaki SE, Triny SK, Prihadi Wibowo, Cucu Gunarsih, Ali Imron, Idris Hadade |
| Teknisi | : | Thoyib S. Ma'ruf, Maman Suherman, Meru, Uan Sudjanang, Sukanda, Suwarsa, Dede Munawar, Abd. Rauf Serry dan Abd. Hanid |
| Dilepas tahun | : | 2009 |

Lampiran 3. Bahan dan Alat Pembuatan Media PDA (Potato Dextrose Agar)



Gambar Lampiran 3a. Bahan pembuatan media PDA. a. PDA sintesis. b. Akuades. c. Beaker glass dan batang pengaduk. d. Erlenmeyer dan sumbat. e. Label. f. Plastik wrapping. g. Chloramphenicol (anti bakteri)



Gambar Lampiran 3b. Alat membuat media PDA. a. Hot plate magnetic stirrer. b. Autoclave

Lampiran 4. Bahan dan alat metode inkubasi kertas saring/*blotter* test (atas) dan PDA (Potato Dextrose Agar) (bawah).



Gambar lampiran 4a. Bahan dan alat yang digunakan pada blotter test. a. Akuades steril; b. NaOCl; c. Alkohol; d. Tisu; e. Botol rendam alat berisi *scalpel*, gunting, pinset, jarum preparat, *cork bohrer*; f. Cawan Petri untuk wadah sterilisasi permukaan; g. Kertas saring/*blotter*; h. Bunsen; i. Plastik *wrapping*; j. Korek gas; k. Label dan bolpoin



Gambar lampiran 4b. Bahan dan alat yang digunakan pada PDA test. a. Label; b. Bolpoin; c. PDA; d. Pinset; e. Alkohol; f. Plastik *wrapping*; g. Sampel yang akan *diplatting*; h. Bunsen; i. Korek gas

Lampiran 5. Tahapan metode inkubasi dengan kertas saring/blotter test



Sampel daun bergejala blas dipotong kecil



Sterilisasi permukaan rendam NaOCl 1% selama 3 menit dan bilas dengan akuades 2x selama 1 menit



Pengamatan, jika terdapat konidia maka dipindahkan ke media PDA



Inkubasi 12 jam gelap dan 12 jam terang 5-7 hari atau lebih.



Plating pada kertas blotter lembab

Lampiran 6. Tahapan metode inkubasi dengan PDA (Potato Dextrose Agar)



Sampel daun bergejala
blas dipotong kecil



Sterilisasi permukaan rendam NaOCl
1% selama 3 menit dan bilas dengan
akuades 2x selama 1 menit



Pengamatan, jika
terdapat konidia maka
dipindahkan kembali ke
cawan Petri berisi PDA
(rekultur)

Inkubasi 12 jam
gelap dan 12 jam
terang 5-7 hari
atau lebih.



Tuang media
pada cawan
Petri steril berisi
media PDA dan
plating sampel

Lampiran 7. Tahapan PCR *Pyricularia oryzae* terbagi menjadi empat tahap yaitu ekstraksi DNA, pembuatan *master mix* dan amplifikasi PCR, pembuatan gel agarosa dan elektroforesis

1. Ekstraksi DNA

- a. Tempatkan semua bahan dan alat di BSC. Kit ekstraksi DNA terdiri dari buffer GST, protease K, buffer GSB, ethanol absolut, buffer W1, wash buffer dan elution buffer.



- b. Langkah kerja ekstraksi

- 1) 25 gram cendawan dimasukkan ke tabung eppendorf 1,5 ml yang berisi akuades steril (catatan: untuk penyimpanan sementara di *freezer*, ketika akan diekstraksi terlebih dahulu disentrifus lalu buang supernatan).



- 2) Tambahkan 200 μ l buffer GST dan 20 μ l protease K.



- 3) Homogenkan miselia menggunakan mikropistol kemudian divortex secara cepat dan disentrifugasi selama 5 menit.



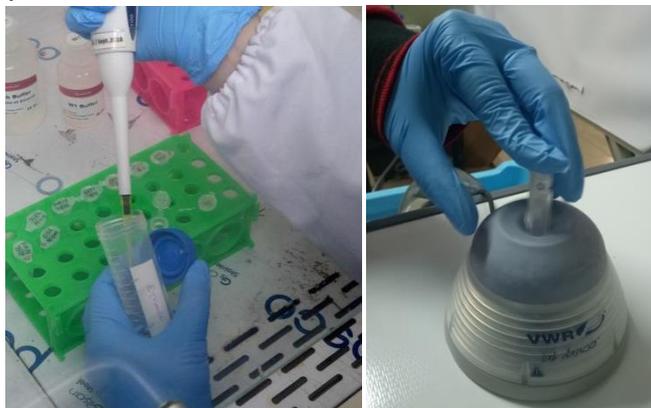
- 4) Inkubasi pada suhu 60 °C selama 12 jam hingga sampel menjadi *lysate*. Apabila masih terdapat gumpalan, maka dilakukan sentrifugasi selama 2 menit pada 14000-16000 rpm.



- 5) Supernatan dipindahkan secara hati-hati pada tabung mikrocentrifugasi baru ukuran 1,5 ml selanjutnya ditambahkan buffer GSB dan divortex.



- 6) Tambahkan 200 μ l ethanol absolut pada sampel lalu divortex perlahan selama 10 detik.



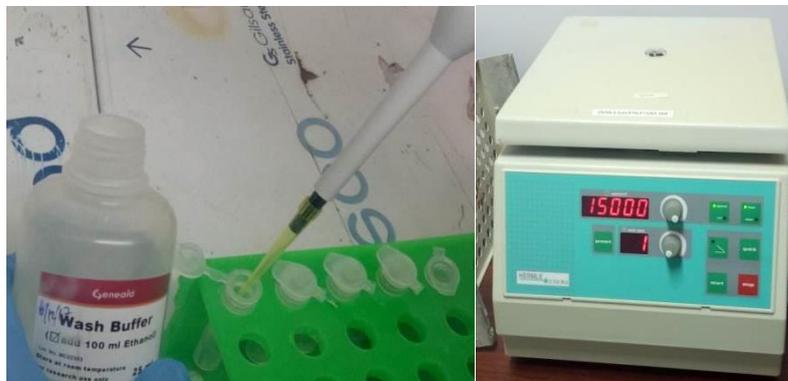
- 7) Sampel ditempatkan ke GD Column dalam tabung koleksi 2 ml lalu disentrifugasi 14000-16000 rpm selama 1 menit.



- 8) DNA yang tertampung pada GD column selanjutnya ditambahkan buffer W1 400 μ l dan disentrifugasi selama 30 detik.



- 9) Ditambahkan 600 μ l wash buffer dan disentrifugasi selama 30 detik.



- 10) Sampel dipindahkan ke GD Column baru lalu ditambahkan 100 μ l elution buffer kemudian disentrifugasi 14000-16000 rpm selama 30 detik hingga ditemukan DNA murni.



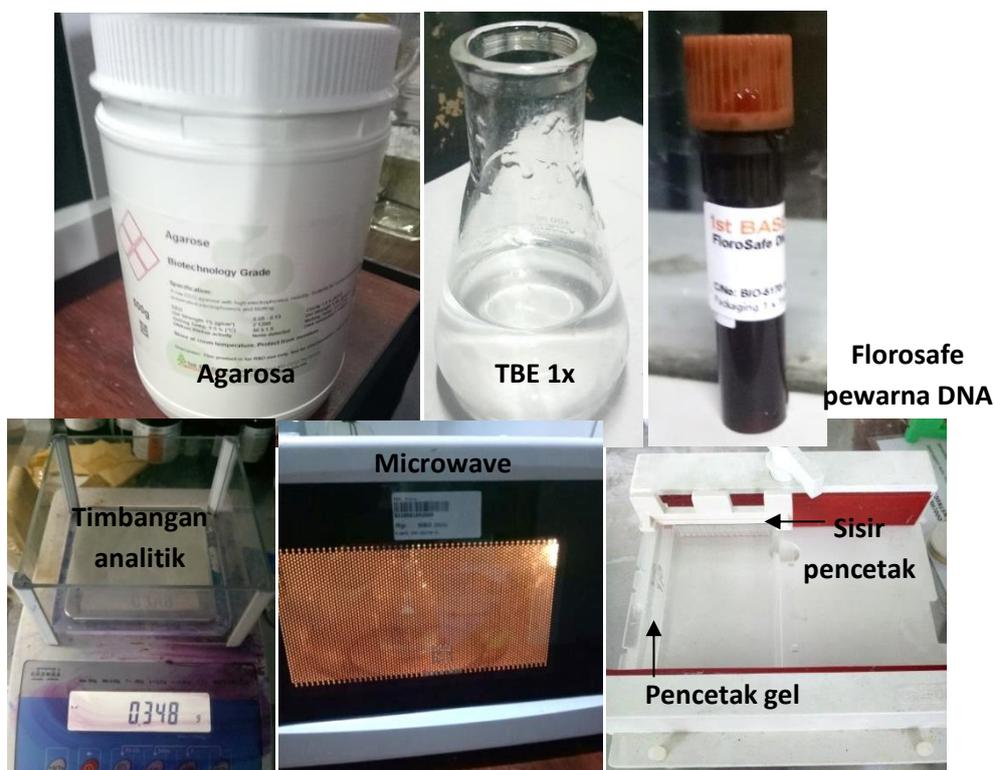
- 11) DNA murni siap digunakan dengan cara mencampur @ 5 μ l DNA murni ke tabung ependorf ukuran volume 0,5 ml yang berisi master mix @ 20 μ l



2. Pembuatan gel agarosa

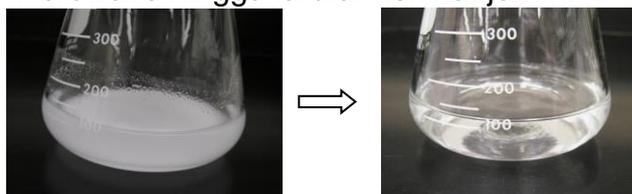
a. Persiapkan alat dan bahan

- Alat: cetakan agarosa dan sisir/comb untuk cetakan well/lubang, microwave, timbangan analitik dan spatula.
- Bahan: agarosa, TAE 1 x dan *florSAFE*.



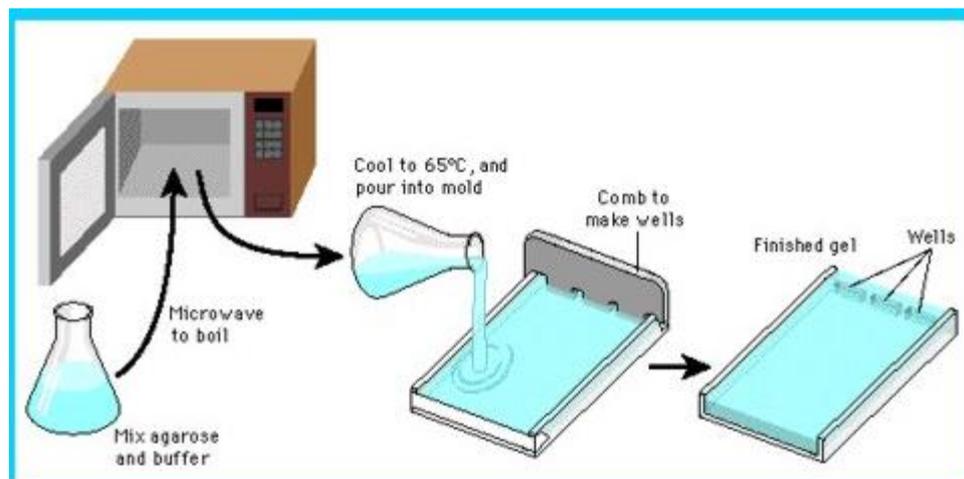
b. Langkah kerja

- 1) Untuk membuat 100 ml larutan agarosa 2% timbang 2 gram agarosa lalu tuang ke dalam botol kaca.
- 2) Melarutkan agarosa 2 gram dalam dalam TBE (Tris Borat EDTA)/TAE (Tris Acetic EDTA) 1x sampai volume 100 ml di erlenmeyer.
- 3) Panaskan larutan agarosa tersebut pada pemanas atau microwave hingga larutan terlihat jernih.



- 4) Keluarkan dari microwave. Sebelum larutan gel agarosa dituang ke dalam pencetak, tambahkan 6 μ l *florSAFE DNA stain (ready to use)* dan campur dengan larutan gel agarosa hingga homogen.

- 5) Biarkan larutan tersebut hingga hangat-hangat kuku atau suhu 65 °C, kemudian tuang larutan gel ke dalam pencetak gel yang telah dipasang sisir/*comb* untuk membuat lubang gel.
- 6) Setelah larutan gel agarosa memadat cabut *comb* dari gel dan masukkan cetakan dalam alat elektroforesis. Tuang bufer TBE 1x/TAE 1x ke dalam alat elektroforesis hingga gel terendam atau mencapai tinggi 1 mm di atas gel.



Gambar ilustrasi pembuatan gel agarosa
(http://fac.ksu.edu.sa/sites/default/files/4_agarose_gel_electrophoresis_age.pdf)

3. Pembuatan master mix dan Amplifikasi PCR

a. Persiapan alat dan bahan



- Alat: BSC, mesin PCR Bio-Rad, mikropipet, tabung eppendorf, rak tabung eppendorf, mikrotips, kotak es, bolpoin permanen.

- Bahan:

| Komponen | Volume |
|---------------------------------------|--------------|
| Enzim Go Taq® polimerase | 12,5 µl |
| Green Master Mix | |
| Primer target <i>forward</i> (F) | 1 µl |
| Primer target <i>reverse</i> (R) | 1 µl |
| dH ₂ O/ air bebas nuklease | 5,5 µl |
| Cetakan DNA/ DNA template | 5 µl |
| Volume total | 25 µl |

Keterangan : Setelah PCR, analisa hasil PCR ke dalam gel agarosa dapat langsung dilakukan tanpa pencampuran dengan *loading dye*.

b. Langkah kerja

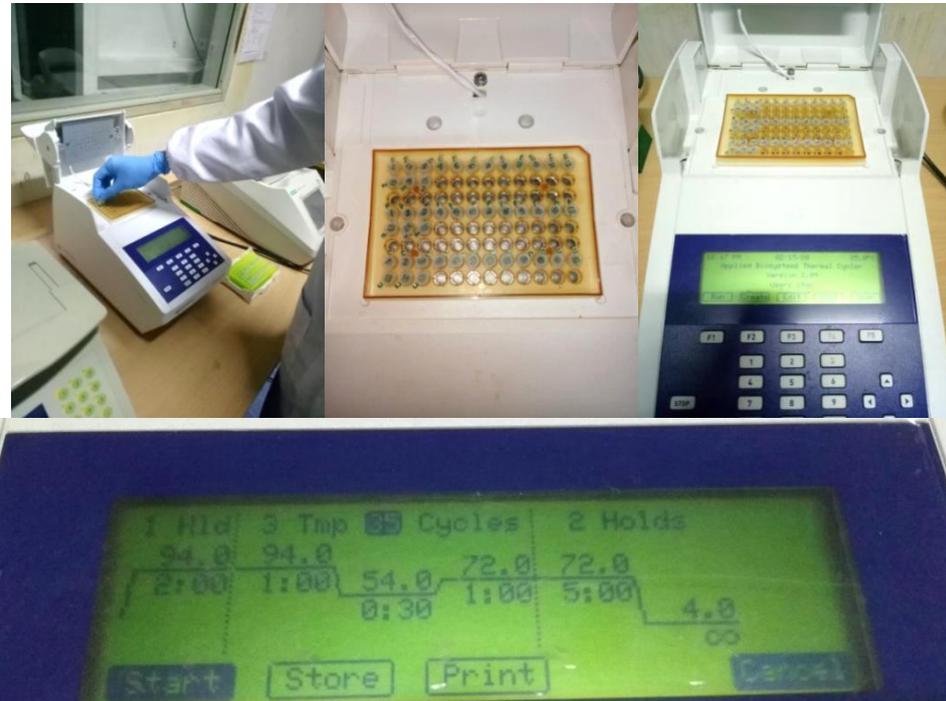
- 1) Setelah proses pencampuran seluruh komponen PCR selesai dilakukan di BSC, campurkan reaksi dengan cara mengetuk-ngetukkan tabung menggunakan jari telunjuk. Lalu sentrifus cepat (3000 rpm selama 10 detik) untuk menurunkan cairan yang menempel di dinding tabung.



- 2) Letakkan tabung PCR di atas block mesin thermal cycler dan operasikan program PCR sesuai dengan primer target untuk amplifikasi.

Siklus PCR yang dipakai untuk amplifikasi DNA adalah:

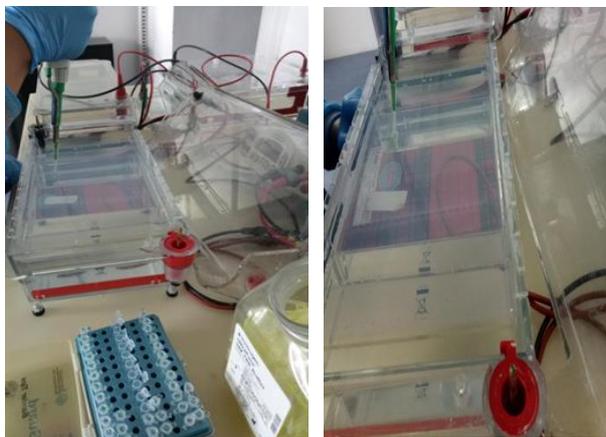
1. Denaturasi awal/inisiasi pada suhu 94 °C : 2 menit
 2. Denaturasi pada suhu 94 °C : 1 menit
 3. *Annealing*/perlekatan pada suhu 54 °C : 30 detik
 4. *Extension*/pemanjangan pada suhu 72 °C : 1 menit
- No 2 sampai 4 diulang sebanyak 35 kali
5. Ekstensi final 72 °C : 5 menit
 6. 4 °C : tak terhingga



- 3) Tube yang berisi master mix dan telah teramplifikasi PCR dikeluarkan dan siap dituang ke well/sumur gel agarosa sebanyak 6-8 μ l untuk proses elektroforesis.

4. Proses elektroforesis dan amplifikasi pita DNA

1. Siapkan bahan yang akan dielektroforesis (DNA dan *marker/ladder*). Letakkan bahan tersebut di atas es agar kondisi DNA tetap terjaga kualitasnya.
2. Masukkan 8 μ l sampel DNA ke dalam *well* agarosa gel.



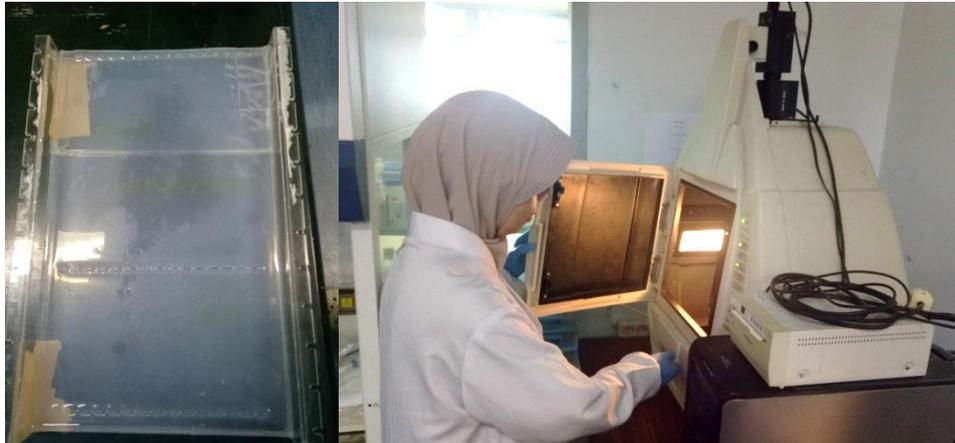
3. *Ladder/marker* sebanyak 1 mikronliter gel red dan 5 mikronliter gen Ruler (100 bp) dimasukkan ke dalam well gel pada bagian ujung/tepi.



4. Hubungkan alat elektroforesis dengan sumber arus dan program alat pada tegangan 100 Volt 400 Ampere selama 50 menit. Tutup tabung elektroforesis, masukkan kabel hitam dan kabel merah pada lubang yang sesuai



5. Setelah proses elektroforesis selesai, matikan sumber arus. Keluarkan gel dari tangki elektroforesis. Selanjutnya lihat penampakan DNA di ruang gelap dengan cahaya UV (gel dokumentasi)



6. Amati dan dokumentasikan hasil pengamatan untuk menganalisa amplicon tiap primer sesuai ukuran referensi dengan mensejajarkan pita DNA target (produk PCR) dengan marker yang memiliki skala penanda panjang DNA sesuai dengan panjang posisi pita DNA yang diharapkan.

