

SKRIPSI
IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER CENDAWAN
PENYEBAB GEJALA MATI AKAR PADA TANAMAN KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) DARI BEBERAPA KABUPATEN

Disusun dan diajukan oleh:

RESKI FEBRIANI
(G111 16 065)



Pembimbing
Prof. Dr. Ir. Ade Rosmana, M.Sc.
Asman, S.P., M.P

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
DEPARTEMEN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

**IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER CENDAWAN
PENYEBAB GEJALA MATI AKAR PADA TANAMAN KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) DARI BEBERAPA KABUPATEN**

**OLEH :
RESKI FEBRIANI
(G111 16 065)**

**Skripsi
Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan
Sebagai Salah Satu Syarat
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Pertanian**

**Pada
Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin**

DEPARTEMEN HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

MAKASSAR

2021

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**IDENTIFIKASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER CENDAWAN
PENYEBAB GEJALA MATI AKAR PADA TANAMAN KAKAO
(*Theobroma cacao* L.) DARI BEBERAPA KABUPATEN**

Disusun dan diajukan oleh:

RESKI FEBRIANI

G111 16 065

**Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Program Studi Agroteknologi Fakultas
Pertanian Universitas Hasanuddin pada tanggal 17 Februari 2021 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan**

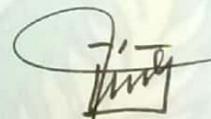
Menyetujui,

Pembimbing Utama,



Prof. Dr. Ir. Ade Rosmana, M. Sc.
Nip. 19610603 198702 2 001

Pembimbing Pendamping,



Asman, S.P., M.P.
Nip. 19811114 201404 1 001

Ketua Departemen,



Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M. Sc.
Nip. 19650316 198903 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Reski Febriani
NIM : G111 16 065
Program Studi : Agroteknologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul

Identifikasi Morfologi dan Molekuler Cendawan Penyebab Gejala Mati Akar pada
Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) dari Beberapa Kabupaten

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan
tulisan orang lain bahwa Skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil
karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau
keseluruhan Skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima
sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 18 Februari 2021

Yang Menyatakan


Reski Febriani)

ABSTRAK

RESKI FEBRIANI (G111 16 065) “Identifikasi Morfologi dan Molekuler Cendawan Penyebab Gejala Mati Akar pada Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) dari Beberapa Kabupaten”. Dibimbing oleh Ade Rosmana dan Asman.

Gejala mati akar tanaman kakao ditandai dengan rontoknya rambut-rambut akar dan kerusakan jaringan vaskular yang merupakan alat transport air dan nutrisi. Tujuan dalam penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi secara morfologi dan molekuler cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao yang berasal dari Kabupaten Bantaeng, Kolaka Utara dan Luwu Timur. Metode penelitian terdiri dari (1) perbanyakan isolat, (2) identifikasi morfologi (makroskopis dan mikroskopis), (3) identifikasi molekuler (ekstraksi DNA, amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer universal ITS4 dan ITS5, sekuensing DNA). Hasil identifikasi morfologi dan molekuler dari keempat belas cendawan menunjukkan terdapat tiga spesies cendawan yang teridentifikasi sebagai penyebab gejala mati akar yaitu *Lasiodiplodia theobromae* (LasioKB, LasioKK2, LasioKL5, LasioKL6, LasioKL7 dan LasioKL10), *Lasiodiplodia citricola* (LasioKL1, LasioKL3, LasioKL4 dan LasioKL8), *Lasiodiplodia brasiliensis* (LasioKK1 dan LasioKL9) dan satu isolat lainnya (LasioKK3) tidak teridentifikasi secara molekuler.

Kata Kunci: Gejala mati akar, identifikasi morfologi dan molekuler.

ABSTRACT

RESKI FEBRIANI (G111 16 065) ” Morphology and Molecular Identification of Fungi Causing Root Death Symptoms in Cocoa (*Theobroma cacao* L.) from Several Districts”. Supervised by Ade Rosmana and Asman.

Symptoms of cocoa root death are characterized by the loss of root hairs and damage of vascular tissue which is important for transporting water and nutrition. The purpose of this study was to identify morphologically and molecularly the fungus causing root-death symptoms in cocoa from Bantaeng, North Kolaka and East Luwu districts. The research method consisted of (1) isolate propagation, (2) morphological identification (macroscopic and microscopic), (3) molecular identification (DNA extraction, DNA amplification using PCR techniques using universal primers ITS4 and ITS5, DNA sequencing). The morphological and molecular identification obtained fourteen fungi identified as *Lasiodiplodia theobromae* (LasioKB, LasioKK2, LasioKL5, LasioKL6, LasioKL7 and LasioKL10), *Lasiodiplodia citricola* (LasioKL4, LasioKL3, LasioKL3), *Lasiodiplodia brasiliensis* (LasioKK1 and LasioKL9) and one other isolate (LasioKK3) were not identified molecularly.

Keywords: Symptoms of root death, morphological and molecular identification.

KATA PENGANTAR
بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Assalamualaikum warohmatullahi wabarokatuh

Segala puji dan syukur penulis haturkan kehadiran Allah SWT atas berkah, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **Identifikasi Morfologi dan Molekuler Cendawan Penyebab Gejala Mati Akar pada Tanaman Kakao (*Theobroma cacao* L.) dari Beberapa Kabupaten** sebagai syarat untuk menyelesaikan studi di Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin. Tak lupa pula shalawat dan salam penulis kirimkan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW yang kita nanti-nantikan syafa'atnya di akhirat kelak.

Terselesaikannya skripsi ini tidak terlepas dari bantuan moril maupun materil serta kerja sama dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang tulus serta penghargaan tak terhingga kepada:

1. Ayahanda tercinta Abdul Maulid dan Ibunda tersayang Nuraeni, serta Saudara dan Saudariku Aldi Islamsyah (Alm.), Alwi Kurniawan dan Diva Islamiyati yang telah memberikan doa, dukungan, cinta dan kasih sayang yang tidak ternilai harganya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Ade Rosmana M. Sc. dan Asman S.P., M.P. selaku pembimbing yang dengan sabar dan ikhlas meluangkan waktu, tenaga dan pikiran demi membimbing penulis sejak awal penelitian hingga selesainya skripsi ini.

3. Prof. Dr. Ir. Baharuddin. Dipl. Ing. Agr, Prof. Dr. Ir. Sylvia Sjam M. S., dan Muhammad Junaid, S.P., M.P., Ph.D. selaku tim penguji yang telah memberikan kritik, saran dan masukan yang membangun sehingga penulis dapat menyempurnakan skripsi ini.
4. Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti. M. Sc. selaku dosen pembimbing akademik, terima kasih atas arahan dan motivasi yang telah diberikan.
5. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Agroteknologi terkhusus Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan atas ilmu dan didikannya selama penulis menempuh pendidikan.
6. Teman-teman ‘‘Survival Squad’’ Fajriah Nurhidaya, Fitriani T., Rafika Ramadhani, Anindita Pratiwi dan Liana Irene Mangetan yang telah mendampingi dan terus men-support penulis dari semester satu sampai menjalankan tugas akhir.
7. Saudara-saudari para penghuni lab penyakit, Andi Alfian Darmawan, Ummul Khalifah, Andi Khusnul Fatima Bahar, Vietgar Membalik, Rohani Islami, Dini Aminarti, dan Islah Noviarni, sahabat yang telah membantu dan menemani dalam suka duka selama menjalankan penelitian di tempat bersejarah ‘‘Laboratorium Penyakit Tumbuhan’’ Fakultas Pertanian, Unhas.

Semoga Allah SWT selalu memberikan limpahan rahmat-Nya dan membalas semua kebaikan pihak yang telah membantu penulis. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi semua pihak yang membutuhkan.

Wassalamualaikum warohmatullahi wabarokatuh

Makassar, Februari 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan dan Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Sifat-Sifat Umum <i>Lasiodiplodia</i> sp.....	4
2.2 Identifikasi secara Morfologi.....	5
2.3 Identifikasi secara Molekuler.....	8
BAB III. METODE PENELITIAN.....	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	13
3.2 Alat dan Bahan.....	13
3.2.1 Alat.....	13
3.2.2 Bahan.....	13
3.3 Metode Pelaksanaan.....	14
3.3.1 Perbanyakkan Isolat.....	14
3.3.2 Karakterisasi Morfologi.....	15
3.3.2.1 Pengamatan Makroskopis.....	15
3.3.2.2 Pengamatan Mikroskopis.....	15
3.3.3 Karakterisasi Molekuler.....	15
3.3.3.1 Ekstraksi DNA.....	15
3.3.3.2 Amplifikasi DNA dengan PCR.....	15
3.3.3.3 Sekuensing.....	16
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	17
4.1 Hasil.....	17

4.1.1	Identifikasi Morfologi.....	17
1.1.2	Identifikasi Molekuler	24
4.2	Pembahasan	26
BAB V. PENUTUP.....		31
5.1	Kesimpulan.....	31
5.2	Saran.....	31
DAFTAR PUSTAKA		32
LAMPIRAN.....		35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Hasil Elektroforesis Produk PCR empat belas isolat cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao	24
--	----

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Isolat-isolat cendawan yang akan diidentifikasi secara morfologi dan molekuler	14
Tabel 2. Karakteristik makroskopis empat belas isolat cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao di media PDA	17
Tabel 3. Karakteristik mikroskopis empat belas isolat cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao	20
Tabel 4. Hasil BLAST empat belas isolat cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao	25

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Empat belas isolat cendawan yang diidentifikasi dari tanaman kakao pada media PDA	35
Lampiran 2. Komposisi Reagen PCR	36
Lampiran 3. Kit ekstraksi (TIANamp Genomic DNA kit) yang digunakan dalam ekstraksi DNA.....	36
Lampiran 4. Alur Kerja Ekstraksi DNA	37
Lampiran 5. Alur Kerja Amplifikasi DNA dengan PCR.....	38
Lampiran 6. Alur Kerja Elektroforesis Produk PCR	39
Lampiran 7. Foto Proses Kerja	40
Lampiran 8. Hasil Sekuensing Isolat LasioKB (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>).....	41
Lampiran 9. Hasil Sekuensing Isolat LasioKK1 (<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>)	42
Lampiran 10. Hasil Sekuensing Isolat LasioKK2 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>)...	43
Lampiran 11. Hasil Sekuensing Isolat LasioKK3 (Tidak teridentifikasi)	44
Lampiran 12. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL1 (<i>Lasiodiplodia citricola</i>).....	45
Lampiran 13. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL2 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) ...	46
Lampiran 14. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL3 (<i>Lasiodiplodia citricola</i>).....	47
Lampiran 15. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL4 (<i>Lasiodiplodia citricola</i>).....	48
Lampiran 16. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL5 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) ...	49
Lampiran 17. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL6 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) ...	50
Lampiran 18. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL7 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) ...	51
Lampiran 19. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL8 (<i>Lasiodiplodia citricola</i>).....	52
Lampiran 20. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL9 (<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>)....	53
Lampiran 21. Hasil Sekuensing Isolat LasioKL10 (<i>Lasiodiplodia theobromae</i>) .	54

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao (*Theobroma cacao* L.) merupakan salah satu komoditas perkebunan di Indonesia yang memiliki peranan penting bagi perekonomian nasional untuk peningkatan devisa negara. Berdasarkan data Program Gerakan Nasional (Gernas) 2012, Indonesia memiliki sentra perkebunan kakao yang tersebar di beberapa provinsi antara lain: Sulawesi (63,8%), Sumatera (16,3%), Jawa (5,3%), Nusa Tenggara Timur, Nusa Tenggara Barat dan Bali (4,0%), Kalimantan (3,6%), Maluku dan Papua (7,1%). Data tersebut menunjukkan bahwa Sulawesi merupakan provinsi yang memiliki luas areal perkebunan kakao tertinggi dibandingkan dengan wilayah lainnya (Ditjenbun, 2013).

Tiga provinsi di Sulawesi yang menjadi sentra utama produksi kakao di Indonesia, yaitu Sulawesi Tengah (19,01%), Sulawesi Selatan (17,22%) dan Sulawesi Tenggara (16,28%). Namun, perkembangan produksi kakao Indonesia pada periode 2010-2019 juga berfluktuasi dan cenderung menurun dengan rata-rata pertumbuhan sebesar 2,60%. Pada tahun 2010 produksi kakao Indonesia sebesar 837.918 ton kemudian tahun 2019 (estimasi Ditjen Perkebunan) menjadi sebesar 596.477 ton (Rohmah Y., 2019). Penurunan produksi kakao dapat dipengaruhi oleh banyak faktor, diantaranya adalah masalah budidaya yang kurang intensif, penurunan vigor tanaman karena penuaan, serta hama dan penyakit tanaman. Yang terakhir memegang peranan penting dalam penurunan produksi kakao (Rosmana, 2006).

Bagian tanaman yang diserang penyakit menimbulkan berbagai gejala tergantung dari patogen yang menyerang tanaman tersebut. Pada tanaman kakao salah satu bagian tanaman yang diserang penyakit yaitu akar tanaman. Gejala yang timbul pada akar tanaman kakao salah satunya adalah gejala mati akar. Gejala mati akar ini sangat berbahaya bila terkena pada tanaman karena akar tanaman merupakan bagian tanaman yang menyerap unsur hara dan air bagi tanaman, kedua hal tersebut sangat penting untuk mendukung pertumbuhan dan perkembangan tanaman.

Gejala mati akar ditandai dengan rontoknya rambut-rambut pada akar tanaman dan juga menyebabkan kematian pada jaringan vaskular yang merupakan alat transport materi pada tumbuhan. Gejala tersebut mirip dengan gejala *dieback* pada ranting kakao yang disebabkan oleh *Lasiodiplodia* spesies. Penyakit ini merupakan salah satu patogen yang dapat menyebabkan penurunan produksi kakao karena berakibat pada kematian pada jaringan vascular, yaitu alat transport materi pada tumbuhan. *Lasiodiplodia* spesies adalah salah satu patogen dengan distribusi di seluruh dunia baik daerah tropis maupun subtropis yang menyebabkan berbagai jenis penyakit pada berbagai jenis tanaman serta memiliki rentang inang lebih dari 280 spesies tanaman (Sathya *et al.*, 2017). Penyakit yang ditimbulkannya adalah seperti mati ranting (*dieback*), kanker dan lain-lain, terutama pada tanaman berkayu (Alejandra *et al.*, 2014).

Lasiodiplodia spesies bersifat saprofitik tetapi dianggap sebagai patogen laten, ditemukan sebagai endofit dalam jaringan tanaman yang sehat dan menjadi patogen ketika inangnya dilemahkan atau ditekan (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005). Pada tanaman kakao, gejala kerusakan yang diakibatkan oleh

Lasiodiplodia spesies terjadi pada pucuk yang dimulai dengan bercak klorosis dan nekrosis daun serta defoliasi lalu menjadi kecoklatan pada jaringan vaskular batang. Dalam beberapa kasus, gejala daun lebih jarang tetapi batang mungkin masih terinfeksi (Kwame R., 2009).

Identifikasi patogen merupakan hal dasar dari semua aspek yang berhubungan dengan ilmu penyakit tanaman. Identifikasi setidaknya harus dilakukan secara konvensional dan molekuler untuk mendapatkan hasil yang akurat. Identifikasi awal yang akurat dapat dijadikan dasar dalam strategi pengendalian suatu penyakit tanaman yang efektif dan efisien. Identifikasi secara konvensional yaitu berdasarkan karakteristik morfologi, sedangkan identifikasi secara molekuler didasarkan pada penggunaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Atas dasar uraian diatas, maka perlu dilakukannya penelitian mengenai identifikasi morfologi dan molekuler cendawan penyebab mati akar pada tanaman kakao.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka diperoleh rumusan masalah yaitu:
Apakah gejala mati akar pada tanaman kakao disebabkan oleh cendawan *Lasiodiplodia* sp.?

1.3 Tujuan dan Kegunaan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara morfologi dan molekuler cendawan penyebab mati akar pada tanaman kakao yang berasal dari Kabupaten Bantaeng, Kolaka Utara dan Luwu Timur. Kegunaan penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi serta menjadi bahan acuan dalam mengidentifikasi cendawan penyebab gejala mati akar pada tanaman kakao.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sifat-Sifat Umum *Lasiodiplodia* sp.

Botryosphaeriaceae adalah kelompok cendawan yang beragam yang menampung banyak spesies yang tersebar di banyak genera anamorph, yang paling terkenal adalah *Diplodia*, *Lasiodiplodia*, *Neofusicoccum*, *Pseudofusicoccum*, *Dothiorella* dan *Sphaeropsis*. Anggota *Botryosphaeriaceae* memiliki distribusi di seluruh dunia dan terdapat pada berbagai macam tanaman inang termasuk monokotil, dikotil, gymnospermae, dan angiospermae, di mana mereka ditemukan sebagai saprofit, parasit, dan endofit (Crous *et al.* 2006; Begoude, *et al.* 2010).

Lasiodiplodia Ellis & Everh. secara resmi diperkenalkan di Clendenin (1896), dan dicirikan oleh *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. (Phillips *et al.* 2013). *Lasiodiplodia* telah dianggap sebagai kemungkinan sinonim dari *Diplodia* Fr. (Denman *et al.* 2000), sementara kehadiran pycnidial paraphyses, longitudinal striations pada konidia dewasa, dan hasil studi filogenetik menunjukkan bahwa ia terpisah dari *Diplodia* sebagai genus yang terdefinisi dengan baik (Sutton 1980, Zhou dan Stanosz 2001, Slippers *et al.* 2004, Phillips *et al.* 2008, 2013, Prasher dan Singh 2014). Padahal ciri morfologi *Lasiodiplodia* spp. cukup sebanding, ciri-ciri pycnidia, konidia dan paraphyses telah banyak digunakan dalam membedakan *Lasiodiplodia* dari genera *Botryosphaeriaceae* lain serta membedakan spesies yang berbeda dalam *Lasiodiplodia* (Dou *et al.*, 2017).

Salah satu spesies dari genus *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., secara geografis tersebar luas tetapi paling umum di daerah tropis dan

subtropic serta telah dikaitkan dengan sekitar 500 inang. Patogen tanaman yang tampaknya tidak terspesialisasi ini telah dilaporkan menyebabkan berbagai penyakit, termasuk penyakit mati, busuk akar, busuk buah, bercak daun dan *witches broom* di antara banyak penyakit lainnya. *Lasiodiplodia* juga termasuk cendawan yang berperan sebagai endofit (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005; Alves *et al.*, 2008).

Pavlic *et al* (2004) menemukan bahwa isolat *Lasiodiplodia* spp. dari Amerika Serikat, Amerika Selatan, Afrika Selatan dan Asia biasanya memiliki konidia yang berukuran 18-30 x 10-15 μm . Warna isolat bervariasi dari abu-abu, putih keabu-abuan, putih, hitam keabu-abuan, coklat keabu-abuan, abu-abu kehitaman dan putih kehitaman pada tahap awal pertumbuhan (Sathya *et al.*, 2017). Konidia imatur berbentuk uniseluler dan terbentuk septat setelah 25 hari kultur dengan ukuran 16-20 x 6-9 μm . Konidia dewasa terbentuk setelah 35 hari kultur dengan ukuran 16-20 x 6-9 μm , berbentuk lonjong dan berwarna septate dan agak coklat. Pycnidia terbentuk setelah 20 hari kultur. Awalnya, konidia berbentuk uniseluler, hialin, granulosa, subovoid sampai ellipsoid, berdinding tebal dan septae (Febbiyanti *et al.*, 2019).

2.2 Identifikasi secara Morfologi

Hal pertama dan penting dilakukan dalam mengelola penyakit tanaman adalah identifikasi yang akurat. Beberapa penyakit dapat diidentifikasi dengan cepat melalui pengamatan gejala, tetapi banyak penyakit yang lain diperlukan identifikasi melalui gejala, tanda dan postulat Koch atau pengujian lain di laboratorium untuk diagnosis dan identifikasi. Prosedur laboratorium yang dikerjakan mungkin memerlukan waktu beberapa hari atau minggu untuk

menyelesaikan diagnosis dan identifikasi tersebut, untuk beberapa kasus relatif insensitif (Flynn 1994; Henuk, 2010).

Pengamatan dapat dilakukan dengan mata telanjang atau melalui mikroskop. Pengamatan di bawah mikroskop merupakan cara yang konvensional. Pengamatan di bawah mikroskop tanpa menggunakan cover slip dapat membantu melihat cara sporulasi, rangkaian spora atau kepala spora. Setelah melihat di bawah mikroskop, selanjutnya kunci identifikasi juga harus disiapkan pada tingkat divisi, kelas, ordo, famili, genus dan spesies yang kemudian dicocokkan berdasarkan pada karakteristik standar dan umum (Watanabe, 2002).

Spora merupakan salah satu karakteristik morfologi yang paling penting untuk identifikasi. Spora adalah unit ordispersal yang bertahan hidup, terdiri dari satu atau beberapa sel, yang mampu berkecambah untuk menghasilkan hifa baru. Spora cendawan dapat terbentuk melalui proses aseksual yang hanya melibatkan mitosis (mitospora), atau melalui proses seksual yang melibatkan meiosis (meiospora). Cara pembentukan meiospora mencerminkan sejarah evolusi dan dengan demikian klasifikasi untuk kelompok utama (filum) cendawan. Terdapat berbagai tipe spora yang dimiliki oleh cendawan (Carris *et al.*, 2012).

Meskipun berdasarkan morfologi spora maka cendawan dengan mudah dapat diklasifikasikan, tetapi beberapa cendawan mungkin diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi yang lain selain spora, misalnya hifa, miselia, tubuh buah, kebiasaan tumbuh dan berbagai organ morfologi yang secara alami dapat diamati dalam kultur (Barnett dan Hunter 1987; Henuk, 2010). Miselium sendiri terdiri dari sel tubular mikroskopis bercabang yang disebut hifa tumbuh melalui dan melintasi substrat atau sumber makanan, mengeluarkan enzim yang

memecah substrat kompleks menjadi senyawa sederhana yang dapat diserap kembali melalui dinding sel (Carris *et al.*, 2012).

Meskipun identifikasi secara morfologi penting, namun cara lain juga tidak dapat diabaikan, seperti identifikasi secara kultural dan fisiologi. Menurut Watanabe (2002), terdapat beberapa karakteristik kultur, morfologi dan fisiologi yang dapat dijadikan sebagai acuan dalam identifikasi penyakit tanaman, yaitu:

1. Karakteristik kultur :

Warna pada permukaan dan dasar koloni, bau, kuantitas hifa aerial, tekstur koloni permukaan (*cottony, shrunken, sloppy, resupinate, velvety, powdery atau floury, crustaceous, water soaked, embedded, yeast-like, sticky, homogenous atau heterogenous*, ada atau tidaknya elevasi), tepi koloni (halus, tidak beraturan, terbatas, menyebar), pola (*zonate, radiate, flowery, arachnoid*), pigmen eksudat (berwarna, transparan), organ yang dibentuk (struktur tubuh buah, *sklerotia, rhizomorf, synnema, sporodochia, stroma, setae*).

2. Karakteristik morfologi :

Ukuran (panjang, lebar, ketebalan, dan lain-lain), warna (mengacu pada warna standar yang dipetakan), bentuk hifa (septa, aseptat, lokasi septa, *clamp connection*, hyphopodia), appresoria, klamidospora, dan berbagai struktur yang berbeda pada masing-masing klas, bentuk perkecambahan (secara langsung melalui tabung kecambah, tidak langsung melalui zoospora), pola formasi struktur tubuh buah (*discrete, aggregate, caespitose*).

3. Karakteristik fisiologi :

Suhu (suhu pertumbuhan, suhu optimum untuk pertumbuhan, suhu kardinal untuk pertumbuhan, suhu rata-rata untuk pertumbuhan), kebutuhan media dan

nutrisi untuk pertumbuhan (yang cocok untuk sporulasi), reaksi terhadap reagent dan pewarna (*lactophenol*, *cotton blue*, *acid fuchsin*, KOH, FeSO₄, *melzer reagent*), resisten terhadap bahan kimia, anastomosis hifa, reaksi kultur, parasitit alami, patogenisitas.

2.3 Identifikasi secara Molekuler

Identifikasi secara molekuler adalah melakukan amplifikasi pada daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* dari DNA ribosom (rDNA). Identifikasi secara molekuler dapat dilakukan dengan menggunakan teknik PCR. *Polymerase Chain Reacton (PCR)* adalah suatu teknik sintesis dan amplifikasi DNA secara in vitro. Teknik ini pertama kali dikembangkan oleh Karry Mullis pada tahun 1985. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali hanya dalam beberapa jam. Dengan diketemukannya teknik PCR di samping juga teknik-teknik lain seperti sekuensing DNA, telah merevolusi bidang sains dan teknologi khususnya di bidang diagnosa penyakit genetik, kedokteran forensik dan evolusi molekular (Handoyo dan Rudiretna, 2001).

Menurut Winter (2005), DNA diamplifikasi dengan PCR pada reaksi enzim yang akan diinkubasi pada tiga suhu yang berbeda. Dalam pelaksanaannya, setiap PCR memiliki komponen-komponen utama yang diperlukan, yaitu:

1. Template DNA

Ini berisi urutan DNA yang akan diperkuat. DNA cetakan biasanya merupakan campuran kompleks dari banyak urutan berbeda, seperti yang ditemukan dalam DNA genom, tetapi molekul DNA apa pun yang berisi urutan target dapat digunakan. Asam ribonukleat (RNA) juga dapat digunakan untuk

PCR dengan terlebih dahulu membuat salinan DNA menggunakan enzim reverse transcriptase.

2. Primer oligonukleotida

Setiap PCR membutuhkan sepasang primer oligonukleotida. Ini adalah molekul DNA untai tunggal pendek (biasanya 20 basa) yang diperoleh dengan sintesis kimia. Urutan primer dipilih sehingga mereka mengikat dengan pasangan basa komplementer ke untai DNA yang berlawanan di kedua sisi urutan yang akan diamplifikasi.

3. DNA polimerase

Sejumlah DNA polimerase digunakan untuk PCR. Semuanya termostabil dan dapat menahan suhu tinggi (hingga 100°C) yang dibutuhkan. Enzim yang paling umum digunakan adalah DNA polimerase Taq dari *Thermus aquaticus*, bakteri yang ada di mata air panas. Peran DNA polimerase dalam PCR adalah menyalin molekul DNA. Enzim mengikat DNA untai tunggal dan mensintesis untai baru yang melengkapi untai asli. DNA polimerase membutuhkan daerah pendek DNA untai ganda untuk memulai. Dalam PCR, ini disediakan oleh primer oligonukleotida, yang membuat daerah beruntai ganda pendek dengan mengikat kedua sisi sekuens DNA untuk diamplifikasi. Dengan cara ini primer mengarahkan DNA polimerase untuk menyalin hanya urutan DNA target.

4. Deoksinukleotida trifosfat

Molekul-molekul ini sesuai dengan empat basa yang ada dalam DNA (adenin, guanin, timin, dan sitosin) dan merupakan substrat untuk DNA polimerase. Setiap PCR membutuhkan empat deoxynucleotide triphosphates

(dNTPs) (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), yang digunakan oleh DNA polimerase sebagai bahan penyusun untuk mensintesis DNA baru.

Menurut Hill dan Stewart (1992), konsep sederhana PCR bergantung pada sintesis berulang dari DNA target oleh DNA polimerase. Ada tiga langkah yang diperlukan untuk mencapai sintesis ini, yang dilakukan berulang kali dan insusensi pada suhu yang berbeda dan terkontrol, memungkinkan penggandaan jumlah DNA setelah setiap siklus. Ketiga langkah tersebut adalah:

1. Denaturasi - inkubasi suhu tinggi (90-98 °C) yang melelehkan DNA beruntai ganda yang mengandung daerah target menjadi untaian terpisah.
2. Anil - penurunan suhu (biasanya ke 37-65 °C) untuk memungkinkan dua oligodeoksiribonukleotida sintesis (primer) ke anil ke situs yang mengapit wilayah DNA yang akan diperkuat. Primer ditambahkan ke campuran reaksi dalam kelebihan molar yang sangat besar untuk mendukung pembentukan kompleks target primer daripada renaturasi DNA target. Primer anil ke untaian berlawanan dari DNA dengan ujung 3' mereka saling berhadapan.
3. Perpanjangan - perubahan suhu ke optimal untuk DNA polimerase memungkinkan abstraksi deoksinukleotida (dNTP) dari campuran reaksi untuk sintesis DNA 5' sampai 3' yang diarahkan dari primer, menggunakan DNA target sebagai cetakan. Melalui proses ini primer digabungkan ke dalam produk PCR.

Produk PCR yang merupakan hasil dari proses PCR dapat dilanjutkan dengan melakukan proses sekuensing DNA. Sekuensing DNA adalah proses atau teknik penentuan urutan basa nukleotida pada suatu molekul DNA. Urutan tersebut dikenal sebagai sekuens DNA, yang merupakan informasi paling

mendasar suatu gen atau genom karena mengandung instruksi yang dibutuhkan untuk pembentukan tubuh makhluk hidup (Rogers, 2011). Sekuensing DNA dapat dimanfaatkan untuk menentukan identitas maupun fungsi dari gen atau fragmen DNA lainnya dengan cara membandingkan sekuensnya dengan sekuens DNA lain yang sudah diketahui (Glick, et al., 2010). Sekuensing DNA bertujuan untuk menentukan urutan basa nitrogen (adenin, guanin, sitosin, dan timin) suatu sampel DNA (Tasma, 2015).

Pada tahun 1977 metode sekuensing telah berkembang di Amerika yang dipelopori oleh Maxam dan Gilbert dan pada tahun 1974 di Inggris oleh Sanger. Ada dua metode Sekuensing DNA, yaitu metode Maxam dan Gilbert dan metode Sanger (Lilian *et al.* 2002; Jannah, 2014).

1. Metode Maxam dan Gilbert

Metode Maxam-Gilbert merupakan salah satu metode sekuensing yang diperkenalkan oleh Maxam dan Gilbert tahun 1977. Metode ini juga disebut dengan metode sekuensing kimiawi karena dalam pengaplikasiannya menggunakan komponen bahan kimia. Molekul DNA dipotong menggunakan piperidin, Pada metode ini digunakan label berupa pospat radioaktif pada bagian ujung 3'. Basa nukleotida dimodifikasi dengan beberapa komponen yaitu DMS (dimetil sulfat) untuk basa G, asam format untuk A+G, hidrazin untuk menghidrolis C dan T, serta garam yang tinggi untuk C. masing-masing diberikan pada 4 tube yang berbeda (Sulandari *et al.*, 2013).

2. Metode Sanger

Metode Sanger merupakan metode sekuensing yang di kenalkan oleh Sanger, Nicklen, Coulsen tahun 1977. Metode ini disebut juga dengan metode

sekuensing ezimatis karena menggunakan enzim dalam pengaplikasiannya. Metode ini yang sampai saat ini masih digunakan karena dinilai lebih efektif. Metode Sanger ini pembacaan urutan nukleotida dengan pemberhentian pada setiap urutan basanya. Metode ini menggunakan prinsip sama seperti metode PCR, namun siklus sekuensing ini berbeda dengan PCR. Pada metode PCR DNA template diamplifikasi menggunakan sepasang primer, bahan dNTP. Sedangkan pada metode sekuensing Sanger digunakan satu primer untuk satu arah pembacaannya, digunakan ddNTP modifikasi dNTP untuk memberhentikan amplifikasi dengan menghilangkan gugus hidroksil pada 3'. Hasil pita atau band dari sekuensing berupa pita yang terkumpul secara linier, dengan hasil berupa eksponen akumulatif (Tyautari, 2020).