

KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER PATOGEN HAWAR

BATANG BERLENDIR PADA TANAMAN

MELON (*Cucumis melo* L.) DAN MENTIMUN (*Cucumis sativus* L.)

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF

CAUSAL ORGANISM OF GUMMY STEM BLIGHT IN MUSKMELON

(*Cucumis melo* L.) AND CUCUMBER (*Cucumis sativus* L.)

PRABOWO LESTARI

P4100210001



MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN

PROGRAM PASCA SARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2013

**KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER PATOGEN
HAWAR BATANG BERLENDIR PADA TANAMAN
MELON (*Cucumis melo* L.) DAN MENTIMUN (*Cucumis sativus* L.)**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Master

Program Studi

Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Disusun dan Diajukan Oleh:

PRABOWO LESTARI

Kepada

**MAGISTER ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
PROGRAM PASCA SARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

TESIS

KARAKTERISASI MORFOLOGI DAN MOLEKULER PATOGEN
HAWAR BATANG BERLENDIR PADA TANAMAN
MELON (*Cucumis melo* L.) DAN MENTIMUN (*Cucumis sativus* L.)

Disusun dan diajukan oleh:

PRABOWO LESTARI
Nomor Pokok P4100210001

Dinyatakan memenuhi syarat melakukan ujian tesis

Menyetujui

Komisi Penasehat,

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

Dr. Ir. Ade Rosmana, DEA
Anggota

Ketua Program Studi
Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Direktur Program Pascasarjana
Universitas Hasanuddin

Prof. Dr. Ir. Nurariaty Agus, M.S

Prof. Dr. Ir. Mursalim

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : PRABOWO LESTARI

Nomor Mahasiswa : P4100210001

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 pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Januari 2013

Yang menyatakan

PRABOWO LESTARI

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah yang telah dianugerahkan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Program Pendidikan S2 pada Program Magister Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan, Program Pasca Sarjana, Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa keberhasilan penulis ini tidak lepas dari kontribusi dari berbagai pihak, baik berupa arahan, petunjuk, bimbingan, koreksi, informasi maupun berupa materi sejak diterima menjadi mahasiswa Program Magister Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin hingga selesainya penulisan tesis ini.

Dengan ketulusan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Prapto Waluyo, Ibu Sami, istriku tercinta Cahyaningsih Agustin, S.Sos., anak-anakku Annida Tazkia Aulia dan Muhammad Arya Pradipta atas segala doa, cinta, kasih sayang, dorongan semangat yang selalu diberikan kepada penulis. Juga kepada Adik-adikku tersayang Pribekti, Pratono, dan Pratiwi, SE., atas bantuan, dorongan semangat, serta doa yang selalu diberikan.

Pada kesempatan ini penulis menghaturkan banyak terima kasih dengan penuh ketulusan dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada;

1. Ketua Komisi Penasehat, Ibu Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, MSc., dan Bapak Dr. Ir. Ade Rosmana, DEA. Sebagai Anggota Komisi Penasehat, yang telah banyak meluangkan waktunya memberikan bimbingan dan arahan dengan penuh keikhlasan selama penulis melaksanakan penelitian hingga selesainya penulisan tesis ini.
2. Ketua Program Studi IHPT, Ibu Prof. Dr. Ir. Nuarariaty Agus, MS., atas segala waktu dan kerjasamanya yang banyak memberikan masukan dan arahan selama penulis menempuh pendidikan.
3. Kepala Balai Besar Karantina Pertanian, Makassar, Bapak Drs. Hermansyah, SH., MM., atas kerjasama, bimbingan serta arahan yang diberikan sehingga penelitian ini dapat berlangsung.
4. Kepala Laboratorium Balai Besar Karantina Pertanian, Makassar, Ibu Ir. Syahriani Kadir, atas fasilitas, kerjasama, bimbingan, serta arahan selama penelitian berlangsung.
5. Teman-teman POPT di Laboratorium Balai Besar Karantina Pertanian, Makassar atas bantuan dan kerjasamanya selama penelitian berlangsung.
6. Staf Laboratorium. Bioteknologi Pertanian Universitas Hasanuddin, dan rekan-rekan mahasiswa Magisster Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan UNHAS Angkatan 2010 yang telah memberikan bantuan, saran, dan kerjasamanya selama penulis menyelesaikan studi.

Kepada semua pihak yang tidak sempat disebutkan namanya satu persatu, penulis ucapkan banyak terima kasih, semoga amal ibadah yang telah kita lakukan senantiasa diterima dan mendapat rahmat dari Allah SWT.

Akhirnya penulis berharap semoga tesis ini dapat memberikan manfaat bagi pengembangan ilmu dan pembangunan pertanian yang berkelanjutan.

Makassar, Januari 2013

PENULIS

ABSTRAK

PRABOWO LESTARI, Karakterisasi Morfologi dan Molekuler Patogen Hawar Batang Berlendir pada Tanaman Melon (*Cucumis melo* L.) dan Mentimun (*Cucumis sativus* L.) (dibimbing oleh Tutik Kuswinanti dan Ade Rosmana)

Hawar batang berlendir adalah penyakit utama pada Cucurbitaceae; termasuk melon dan mentimun, namun masih belum terdapat informasi tentang patogen penyakit hawar batang berlendir. Gejala penyakit hawar batang berlendir sering dijumpai pada tanaman semangka, melon, mentimun, dan paria di beberapa wilayah di Indonesia. Patogen hawar batang berlendir masih termasuk sebagai Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina kategori A1 di Indonesia. Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan identifikasi terhadap organisme penyebab timbulnya gejala penyakit hawar batang berlendir yang diisolasi dari empat area di Indonesia dengan menggunakan karakter morfologi dan molekuler (ITS-PCR).

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Karantina Tumbuhan Balai Besar Karantina Pertanian Makassar dan di Laboratorium Biotek Pusat Kegiatan Penelitian Universitas Hasanuddin, Makassar. Pengambilan sampel tanaman bergejala penyakit dilakukan di Batanghari, Purwakarta, Klaten, dan Makassar. Metode Karakterisasi dilakukan secara morfologi dengan pengamatan bentuk dan ukuran tubuh buah dan spora dan secara molekuler dengan metode ITS-PCR.

Berdasarkan karakter morfologi (bentuk dan ukuran tubuh buah) isolat dari Batanghari adalah *Didymella bryoniae*, isolat dari Purwakarta adalah *Phoma cucurbitacearum*, isolat dari Klaten adalah *Phoma cucurbitacearum*. Tahap seksual patogen adalah *Didymella bryoniae*, dan fase aseksual patogen adalah *Phoma cucurbitacearum*. Hasil amplifikasi DNA menunjukkan ukuran area Internal Transcribed Spacer rDNA patogen hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun berada pada kisaran 500-600 pasangan basa yang identik dengan *Didymella bryoniae*.

ABSTRACT

PRABOWO LESTARI, Morphological and Molecular Characterization of Causal Organism of Gummy Stem Blight in The Muskmelon (*Cucumis melo* L.) and Cucumber (*Cucumis sativus* L.) (Supervised by Tutik Kuswinanti and Ade Rosmana).

Gummy stem blight (GSB) is the major disease in the Cucurbitaceae; including melons and cucumbers, however no detailed information about the causal agent of the disease. GSB disease symptoms often found in watermelon, muskmelon, cucumber, and a pariah in several areas of Indonesia. But the causal organism of the disease still included as A1 category of Quarantine Plant Pest List in Indonesia. Based on this fact, the research was signed to identify the causal organism of GSB symptoms isolated from four different areas in Indonesia by using of morphological and molecular characters (ITS-PCR).

This research was conducted at the Plant Quarantine Laboratorium of Agricultural Quarantine Agency of Makassar and Biotechnology Laboratory Research Center of Hasanuddin University, Makassar. Sampling performed in Batanghari, Purwakarta, Klaten, and Makassar. Morphological characterization method performed by observing the shape and size of fruiting bodies and spores, and molecular by ITS-PCR method.

Based on morphological characters (shape and size of fruiting bodies and spores), causal organism of GSB on cucumber plants in Batanghari is *Didymella bryoniae*, pathogens of GSB in the muskmelon in Purwakarta is *Phoma cucurbitacearum*, pathogens of GSB in the muskmelon in Klaten is *Phoma cucurbitacearum*. Sexual stage of the pathogen is *Didymella bryoniae* and asexual stage of the pathogen is *Phoma cucurbitacearum*. The DNA amplification results showed that the size of rDNA Internal Transcribed Spacer area of GSB pathogens in muskmelon and cucumber in the range of 500-600 base pairs, identical to *Didymella bryoniae*.

DAFTAR ISI

1.	BAB I PENDAHULUAN	1
	A. Latar Belakang	1
	B. Rumusan Masalah	5
	C. Tujuan Penelitian	5
	D. Kegunaan Penelitian	6
2.	BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
	A. Penyakit Hawar Batang Berlendir	7
	B. Diagnosis Penyakit Hawar Batang Berlendir.....	21
	C. Kerangka Pikir	34
3.	BAB III METODE PENELITIAN	35
	A. Tempat dan Waktu Penelitian	36
	B. Metode Penelitian	36
4.	BAB IV HASIL & PEMBAHASAN.....	43
	A. Karakterisasi Morfologi.....	43
	B. Karakterisasi Molekuler.....	53
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	57
	A. Kesimpulan.....	57
	B. Saran.....	57
6.	DAFTAR PUSTAKA	59
7.	LAMPIRAN.....	63

DAFTAR GAMBAR

1. Gejala penyakit Hawar Batang Berlendir pada batang tanaman melon.....	11
2. Gejala penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon yang mengeluarkan lendir berwarna.....	12
3. Piknidia, tubuh buah aseksual, muncul pada batang terinfeksi sebagai bintik-bintik kecil warna hitam.....	13
4. Peritesia, askus, dan askospora cendawan <i>Didymella bryoniae</i>	1
5	
5. Piknidia dan konidia <i>Phoma cucurbitacearum</i>	16
6. Siklus hidup patogen hawar batang berlendir.....	18
7. Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian dan Daerah Ribosomal DNA dan lokasi primer.....	32
8. Kerangka pikir penelitian.....	35
9. Gejala penyakit pada batang tanaman.....	44
10. Gejala penyakit pada daun tanaman.....	45
11. Grafik intensitas penyakit hawar batang berlendir.....	46
12. Pengamatan morfologi Isolat Batanghari.....	48
13. Pengamatan morfologi Isolat Purwakarta.....	49
14. Pengamatan morfologi Isolat Klaten.....	50
15. Pengamatan morfologi Isolat Makassar.....	52
16. Pertumbuhan patogen hawar batang berlendir secara in vitro.....	53
17. Elektroforesis hasil ekstraksi DNA dari lima isolat.....	54
18. Hasil amplifikasi DNA lima isolat patogen hawar batang berlendir.....	55

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Sekuen nukleotida area internal transcribed spacer rDNA <i>Didymella bryoniae</i> dari Genbank dengan pencarian BLAST.....	42
---	----

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Pertumbuhan patogen hawar batang berlendir pada media agar kentang dekstroza.....	63
Lampiran 2. Tabel Hasil pengamatan Intensitas Penyakit Hawar Batang Berlendir pada tanaman melon dan mentimun.....	64
Lampiran 3. Tabel Ukuran Peritesia, Askus, dan Askospora Patogen Hawar Batang Berlendir pada Tanaman Mentimun di Batanghari.....	65
Lampiran 4. Tabel Ukuran Piknidia dan Konidia Patogen Hawar Batang Berlendir pada tanaman melon.....	67
Lampiran 5. Tabel Ukuran Patogen Antraknosa pada Tanaman Melon di Makassar.....	69

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Tanaman melon (*Cucumis melo* L.) dan mentimun (*Cucumis sativus* L.) merupakan anggota Famili Cucurbitaceae yang telah dibudidayakan secara luas oleh petani di Indonesia. Di Indonesia, areal penanaman melon tersebar mulai dari Jawa Barat, Jawa Tengah, sampai Jawa Timur. Pertanaman melon juga telah dijumpai di Sumatera Kalimantan (Anonim, 2011), Bali dan Sulawesi (Anonim, 2007). Di Sulawesi Selatan, tanaman melon dibudidayakan di Kabupaten Takalar dan Kabupaten Barru.

Mentimun merupakan sayuran yang digemari masyarakat di Indonesia. Tanaman mentimun dibudidayakan secara luas oleh petani di Jawa Barat, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bengkulu dan Aceh (Wijoyo, 2012).

Dalam budidaya tanaman melon dan mentimun, petani menghadapi berbagai jenis organisme pengganggu tumbuhan yang dapat menurunkan kuantitas, kualitas, dan kontinuitas produksi, serta harga produk (Untung, 2007). Beberapa penyakit tanaman yang sering ditemukan pada budidaya tanaman melon dan mentimun adalah layu *Fusarium* (*Fusarium oxysporum*), embun tepung (*Erysiphe cichoracearum*), layu bakteri (*Erwinia tracheiphila*), antraknosa

(*Colletotrichum lagenarium*) (Anonim, 2007; Semangun, 1994; Soedarya 2010; Wijoyo, 2012), kudis (*Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth.), bercak daun bersudut (*Pseudomonas lachrymans* (E.F. Sm. Et Bryan) Carsner), mosaik (virus mosaik semangka) (Semangoen, 1994), busuk cabang (*Botryodiplodia theobromae*), busuk leher (*Phytium ultimum*), *Cucumber Mosaic Virus* (Anonim 2007), dan *gummy stem blight* atau hawar batang berlendir (Soedarya, 2010). Menurut Paret *et al* (2010), hawar batang berlendir adalah penyakit utama pada Cucurbitaceae; termasuk semangka, melon, mentimun, labu, dan lain-lain.

Berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Nomor 93/Permentan/OT.140/12/2011 tentang Jenis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK), penyebab penyakit hawar batang berlendir (*gummy stem blight*) termasuk ke dalam kategori A1, yaitu OPTK yang belum terdapat di Indonesia, dan termasuk golongan I, yakni merupakan OPTK yang tidak dapat dibebaskan dari media pembawa organisme pengganggu tumbuhan karantina. Penyakit ini mempunyai beberapa tanaman inang yang termasuk keluarga Cucurbitaceae, yaitu *Citrullus vulgaris* (semangka), *Cucumis melo* (melon), *Cucumis sativus* (mentimun), *Cucurbita* spp., *Momordica charantia* (paria), *Sechium edule* (labu siam), dan *Solanum tuberosum* (kentang). Media pembawa dari OPTK ini adalah benih, bagian tanaman, dan media tanam. Di wilayah Asia, penyakit ini sudah terdapat di Negara; Banglades, Brunei, China, Taiwan, India, Irak,

Israel, Jepang, Korea Selatan, Laos, Malaysia, Myanmar, Pakistan, Philippina, Sri Lanka, dan Thailand.

Era globalisasi perdagangan memberikan tantangan, tetapi sekaligus terbukanya peluang akses pasar yang lebih luas bagi produk-produk pertanian, tidak hanya pasar domestik tetapi juga pasar global. Tantangan karantina tumbuhan dalam era globalisasi semakin besar seiring dengan semakin banyak dan cepatnya produk-produk pertanian sebagai media pembawa OPTK memasuki wilayah Negara Republik Indonesia dan sebaliknya. Dengan terbukanya pasar domestik, resiko masuknya OPTK semakin meningkat (Untung, 2007). Kegiatan perdagangan menjadi sarana bagi tumbuhan dan organisme pengganggu tumbuhan yang berasosiasi dengannya dapat ditransportasikan dengan cepat. Pada awal abad ke-19, benih banyak digunakan sebagai komoditas perdagangan, dan ini semakin meningkatkan potensi resiko terbawanya organisme pengganggu tumbuhan bersama dengan inangnya (Ebbels, 2003).

Berdasarkan uraian di atas maka perlu dilakukan identifikasi untuk mengetahui keberadaan patogen yang dianggap baru, termasuk patogen hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun. Karakterisasi morfologi dan karakterisasi secara molekuler terhadap patogen hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun dari beberapa lokasi di Indonesia perlu dilakukan, yang selanjutnya dapat digunakan untuk menentukan spesies patogen dengan akurat. Hasil

penelitian ini diharapkan bermanfaat untuk pengembangan metode deteksi terhadap patogen hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun, penentuan rekomendasi pengendalian penyakit yang tepat, dan penentuan status OPTK.

Berbagai macam teknik diagnostik dapat diterapkan untuk deteksi, identifikasi dan kuantifikasi patogen pada tanaman yang terinfeksi. Kecepatan, spesifisitas, sensitivitas, dan efektivitas biaya merupakan faktor utama yang dapat menentukan kesesuaian dan pilihan dari tes diagnostik (Narayanasamy, 2011). Choi et al (2010) telah melakukan identifikasi terhadap patogen hawar batang berlendir pada tanaman melon di Korea (Isolat Jeonbuk) dengan melaksanakan studi karakter morfologi dan analisis sekuen daerah *internal transcribed spacer* (ITS). Kesamaan dalam identitas sekuen antara daerah ITS rDNA dari isolat Jeonbuk dan *Didymella bryoniae* dari pencarian BLAST dari GenBank adalah 100%. Studi ini mengidentifikasi isolat Jeonbuk adalah *Didymella bryoniae*.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian pada latar belakang di atas maka dapat dirumuskan permasalahan yang akan menjadi acuan adalah:

1. Bagaimana karakteristik morfologi patogen penyebab penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun dari beberapa lokasi di Indonesia.
2. Bagaimana bentuk seksual dan aseksual dari penyebab penyakit.
3. Bagaimana karakteristik molekuler penyebab penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun dengan ITS-PCR.

C. Tujuan Penelitian

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

1. Mengidentifikasi karakteristik morfologi patogen penyebab penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon.
2. Mengetahui bentuk seksual dan aseksual penyebab penyakit.
3. Mengetahui karakteristik molekuler penyebab penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun dengan ITS-PCR.

D. Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah sebagai bahan informasi mengenai karakteristik morfologi dan molekuler patogen penyebab hawar batang berlendir pada tanaman melon dan mentimun dalam rangka pengembangan metode deteksi yang cepat, sensitif, dan akurat, yang sangat diperlukan untuk keperluan Karantina Pertanian, dan dapat digunakan sebagai dasar dalam penentuan rekomendasi pengendalian penyakit yang tepat, serta sebagai dasar pertimbangan penilaian status OPTK.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Penyakit Hawar Batang Berlendir

Hawar batang berlendir (*Gummy stem blight*) adalah penyakit penting pada tanaman Cucurbitaceae. Pada kondisi yang sesuai untuk perkembangan penyakit, petani komersial dapat mengalami kehilangan hasil yang tinggi. Penyakit ini dapat terjadi pada setiap tahap pertumbuhan tanaman, dari pembibitan sampai buah di penyimpanan. Hawar batang berlendir adalah nama yang diberikan pada penyakit ketika infeksi terjadi di daun dan batang. Busuk hitam diberikan untuk penyakit yang sama pada buah (Seebold, 2011). Mentimun, melon, labu, paria, dan anggota famili Cucurbitaceae lainnya sering terinfeksi oleh penyakit hawar batang berlendir ini (Kucharek and Schenck, 1999; Seebold, 2011; Sikora, 2004). Buah melon mempunyai tingkat kerusakan yang terbesar, dan cendawan memproduksi lebih banyak poligalakturonase ketika melon telah terinfeksi pada umur 10 hari daripada pada tahap selanjutnya (Agrios, 2005).

Hawar batang berlendir merupakan penyakit daun yang paling merusak pada tanaman Cucurbitaceae (Choi et al., 2010). Di Amerika Serikat bagian tenggara, hawar batang berlendir adalah penyakit daun yang paling merusak mentimun dan semangka. *Cucurbita* spp. (labu) sangat rentan terhadap busuk hitam, yang secara langsung mengurangi hasil sebelum dan sesudah panen. Resistensi terhadap penyakit daun

lainnya (misalnya, embun tepung dan antraknosa) telah dimasukkan ke dalam mentimun dan Cucurbitaceae lain, namun ketahanannya hilang akibat serangan penyakit hawar batang berlendir (Keinath et al., 1995). Cucurbitaceae dapat terinfeksi pada setiap fase pertumbuhan dari pembibitan sampai tanaman dewasa dan menghasilkan buah. Infeksi dan gejala dapat terjadi pada semua bagian tanaman kecuali akar (Kucharek and Schenck, 1999).

Di Indonesia, keberadaan penyakit ini sudah terdeteksi di beberapa wilayah, sehingga diperlukan suatu penelitian untuk mengidentifikasi penyebab penyakitnya dengan akurat. Menurut Safitri dari PT. East West Seed Indonesia (komunikasi pribadi) penyakit hawar batang berlendir sering dijumpai pada tanaman semangka, melon, mentimun, dan paria. Agrios (2005) menduga bahwa penyebaran penyakit hawar batang berlendir pada Cucurbitaceae mungkin sudah di seluruh dunia. Pada kondisi cuaca yang sesuai patogen menginfeksi semua bagian tanaman kelompok Cucurbitaceae, dan bila terbawa di dalam benih dapat menyebabkan rebah semai dan mematikan bibit.

1. **Gejala dan Tanda Penyakit**

Soedarya (2010) menyebutkan bahwa gejala awal penyakit hawar batang berlendir, adalah pangkal batang tanaman seperti tercelup minyak kemudian keluar lendir berwarna merah kecoklatan, daun tanaman mengering, dan selanjutnya tanaman menjadi layu dan mati. Sedangkan

menurut Agrios (2005), gejala penyakit hawar batang berlendir pada daun, tangkai daun, dan batang, berupa bercak berwarna coklat pucat atau abu-abu.

Gejala bercak pada batang tanaman biasanya mulai pada sendi, lalu memanjang dan retak, serta mengeluarkan cairan lendir berwarna kuning sawo. Bercak pada daun, batang, dan tangkai daun selanjutnya membesar dan menyebabkan daun menguning dan mati. Jika infeksi meluas, tanaman di area lahan yang luas akan mengalami kemerosotan pertumbuhan dan mati. Pada buah, muncul bercak yang kekuningan berbentuk lingkaran tidak beraturan yang kemudian berubah menjadi abu-abu sampai coklat dan dapat meneteskan eksudat berlendir di bagian tengah. Bercak akhirnya berubah menjadi berwarna hitam. Pada beberapa jenis labu, gejala bercaknya dangkal dan tersebar di permukaan buah. Di dalam penyimpanan, cendawan dapat menembus kulit buah dan menyebar ke seluruh labu hingga ke dalam rongga biji. Bercak pada daun, batang, atau buah, menghasilkan piknidia berwarna pucat dan gelap, peritesia globular yang kadang tersusun dalam cincin dan terlihat dengan jelas (Agrios, 2005).

Gejala penyakit hawar batang berlendir bervariasi tergantung pada inangnya (Seebold, 2011). Variasi gejala daun pada Cucurbitaceae membuat diagnosis menjadi sulit (Zitter, 1992). Pada bibit yang terinfeksi, bercak kehitaman tampak pada kotiledon dan batang; selanjutnya berkembang menjadi kering dengan lesi berwarna coklat. Sebelum

jaringannya menguning (klorosis) atau coklat (nekrosis), jaringannya tampak seperti tercelup air panas. Jika terjadi pada batang akan menghasilkan gejala rebah semai dan bibit mengalami kelayuan yang diikuti kematian tanaman (Kucharek and Schenk, 1999; Seebold, 2011).

Pada tanaman yang lebih tua, gejala penyakit berupa bercak berbentuk lingkaran berwarna hijau keabu-abuan di antara vena pada daun. Bercak berubah menjadi coklat gelap sampai hitam (Sikora, 2004). Lesi berwarna coklat yang berkembang melingkar secara cepat, sering dimulai dari tepi daun. Area nekrotik ini bisa berkembang di seluruh permukaan daun, tetapi terutama terjadi sepanjang vena. Lesi pada vena daun dan batang pada awalnya seperti tercelup air panas dan berwarna coklat (Seebold, 2011). Fase bercak daun sulit dibedakan dengan antraknosa; namun, lesi penyakit hawar batang berlendir lebih gelap dengan pola seperti sasaran atau *zonate* dan sedikit deteriorasi jaringan daun (Sikora, 2004).

Sebagai contoh pada daun varietas melon gejala berupa lesi seperti tercelup air pada tepi daun, nekrotik hangus pada intervena, dan lesi berbentuk lingkaran tidak teratur yang tersebar secara acak. Pada kondisi cuaca tertentu seluruh tanaman di lapangan dapat terinfeksi secara alami pada waktu yang bersamaan. Beberapa lesi dikelilingi oleh halo berwarna kuning, dan ketika bercak mengering, kadang terjadi keretakan. Pada labu, terdapat nekrosis pada tepian daun yang mencolok

yang kemudian meluas. Gejala daun pada mentimun jarang terjadi, tetapi biasanya serupa dengan penampilan gejala pada labu (Zitter, 1992).



Gambar 1. Gejala penyakit Hawar Batang Berlendir pada batang tanaman melon (Sumber: In Young Choi, Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan, Korea).

Penyebaran penyakit dimulai di pusat tanaman dan bergerak keluar. Lesi pada awalnya berkembang pada persendian tanaman dan memanjang menjadi garis-garis seperti tercelup air yang menjadi coklat pucat sampai abu-abu (Sikora, 2004; Zitter, 1992). Jaringan batang sering retak, dan terdapat cairan berlendir dipancarkan dari luka (Sikora, 2004). Lesi pada batang utama meluas menghasilkan kanker merah-coklat-hitam yang retak dan mengeluarkan lendir berwarna merah sampai kuning sawo (Kucharek and Schenck, 1999; Seebold, 2011). Pada batang melon dan mentimun tua yang bergejala seringkali ditemukan tubuh buah (piknidia) berwarna hitam (Seebold, 2011; Zitter, 1992). Lesi pada batang sering mengeluarkan lendir coklat kemerahan seperti manik-manik hitam, gejala ini sulit dibedakan dengan Layu Fusarium atau luka yang disebabkan

aktivitas makan serangga (Zitter, 1992). Lesi yang meluas pada batang dapat menghasilkan kelayuan tanaman (Kucharek and Schenck, 1999; Seebold, 2011). Pada kondisi yang sesuai, terjadi kerontokan daun yang parah hingga terjadi kematian tanaman yang mengakibatkan kehilangan hasil yang signifikan (Seebold, 2011). Secara umum, perkembangan penyakit ini dimulai dari tengah batang tanaman sampai ujung titik tumbuh. Karena organisme pengganggu tumbuhan lain juga dapat menyebabkan keluarnya substansi lendir, keberadaan lendir tidak dapat sepenuhnya diandalkan untuk diagnosis penyakit hawar batang berlendir. Antraknosa (penyakit cendawan lain) dan pengapuran yang tidak cukup juga dapat menyebabkan lesi batang yang berlendir (Kucharek and Schenck, 1999).



Gambar 2. Gejala penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon yang mengeluarkan lendir berwarna kuning sawo (Sumber: In Young Choi, Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan, Korea).

Piknidia, tubuh buah aseksual, muncul pada daun terinfeksi sebagai bintik-bintik kecil berwarna hitam, tetapi jika jaringan tanaman cepat mati, sebagaimana pada melon, diagnosis gejala ini tidak akan terjadi pada daun (Zitter, 1992). Tertanam pada jaringan terserang penyakit yang lebih tua, kecil, putih terang (ketika muda) sampai hitam (ketika tua), struktur seperti jerawat (piknidia) ini akan mengembang dan melepaskan sulur-sulur spora berwarna terang sampai putih jika jaringan dibasahi dengan air. Lensa tangan atau stereoskop dapat digunakan untuk mengamati fenomena ini dengan mudah (Kucharek and Schenck, 1999).



Gambar 3. Piknidia, tubuh buah aseksual, muncul pada batang terinfeksi sebagai bintik-bintik kecil berwarna hitam (Sumber: In Young Choi, Jeollabuk-do Agricultural Research and Extension Services, Iksan, Korea).

Gejala dapat berkembang pada buah di lapangan. Lesi pada awalnya kecil, bercak seperti tercelup air panas yang selanjutnya meluas dan dapat memancarkan cairan berlendir. Sebagaimana mereka membesar, bercak menjadi cekung, berubah warna, dan bentuk tidak

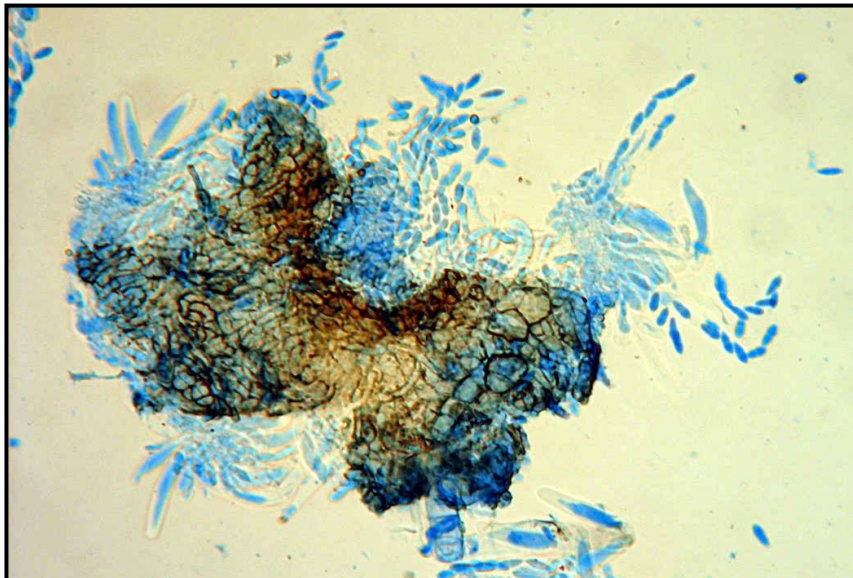
teratur. Tubuh buah hitam (piknidia) banyak muncul, bintik-bintik kecil dalam jaringan terinfeksi (Koike et al., 2007; Seebold, 2011). Lesi pada buah semangka, mentimun, dan melon pada awalnya oval sampai berbentuk lingkaran dan hijau berminyak dalam warna. Selanjutnya lesi akan menjadi coklat gelap-hitam dengan gabungan dari lesi tunggal. Jika disimpan pada kondisi lembab, lesi dapat berkembang miselia berwarna putih. Lesi lebih tua akan menjadi mengeras dalam tekstur dan tampak ditekan pada bagian tengah. Kulit buah akan menjadi coklat gelap sampai hitam dan retak (Koike et al., 2007; Kucharek and Schenck, 1999). Terinfeksi, buah membusuk dapat membuat patogen menjadi tular benih (Koike et al., 2007).

1. Penyebab dan Perkembangan Penyakit

Didymella bryoniae (Auersw) Rehm (= *Mycosphaerella citrullina* (C.O. Sm) Bruto.), anamorf *Phoma cucurbitacearum* (Fr.:Fr.) Sacc. (= *Ascochyta cucumis* Fautrey & Roum.), merupakan penyebab penyakit hawar batang berlendir (fase daun) dan busuk hitam (fase buah) pada Cucurbitaceae (jenis *Citrullus*, *Cucumis*, *Cucurbita* dan genus yang lain) (Keinath et al., 1995). Patogen ini terdiri dari dua grup berdasarkan morfologi kultur berumur 2 minggu pada media agar dekstrosa kentang (PDA). Satu grup menghasilkan substrat miselium berwarna hijau zaitun sampai hijau gelap atau hitam dan yang lain menghasilkan miselium berwarna putih. Dalam pseudotesia terdapat askus dua lapis (*bitunicate*)

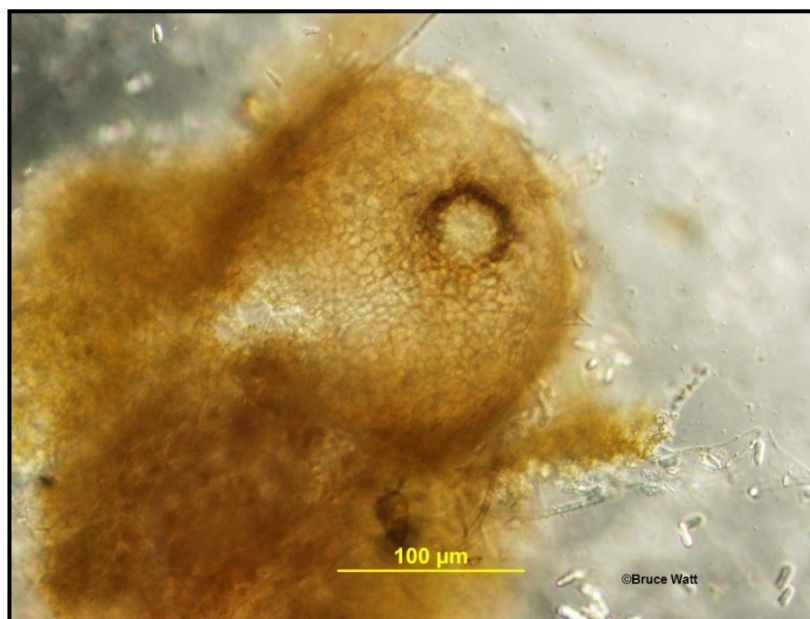
yang mengandung askospora. Rerata ukuran askospora adalah $13,1 (\pm 0,85) \times 5,45 (\pm 0,23) \mu\text{m}$. Rerata panjang dan lebar konidia adalah $8,0 (\pm 0,71) \times 3,3 (\pm 0,36) \mu\text{m}$. Hanlin (1990) menyebutkan ukuran diameter pseudotesia *Didymella bryoniae* $\pm 170 \mu\text{m}$, panjang askus $\pm 65 \mu\text{m}$, dan panjang askospora $\pm 15 \mu\text{m}$.

Didymella bryoniae sebagai bentuk seksual menghasilkan tubuh buah berupa perithesia yang berisi askospora, sedangkan bentuk aseksualnya (*Phoma cucurbitacearum*) menghasilkan piknidia yang berisi konidia. Kedua fase patogen dapat berlangsung pada jaringan terinfeksi selama musim tanam, namun memiliki peran berbeda sebagai sumber inokulum. Penyakit ini telah dilaporkan di New York sejak awal 1900an. Istilah hawar batang berlendir digunakan untuk fase infeksi pada daun dan batang, sedangkan busuk hitam untuk fase busuk buah (Zitter, 1992).



Gambar 4. Peritesia, askus, dan askospora cendawan *Didymella bryoniae* (Sumber: Plant Protection Diagnostic Service).

Didymella bryoniae membentuk ostiol pseudotesia berwarna gelap dengan tipe askus *bitunicate*. Masing-masing askus terdiri dari delapan askospora *hyaline*, oval, memiliki satu septa, dengan ukuran 14-18 x 4-7 μm . Askospora mengalami penyempitan pada septa, sel yang di atas lebih lebar dari sel yang di bawah. Bentuk aseksual, *Phoma cucurbitacearum*, biasanya umum dijumpai pada jaringan yang terinfeksi. Piknidia *P. cucurbitacearum* memproduksi konidia *hyaline*, berbentuk silinder, seringkali dengan satu septa, dan berukuran 6-13 x 2-4 μm . Dilaporkan bahwa beberapa isolat bersifat lebih virulen daripada yang lain, menunjukkan bahwa terdapat keragaman dalam populasi patogen (Koike et al., 2007).



Gambar 5. Piknidia dan konidia *Phoma cucurbitacearum* (sumber: Pest Management Office, University of Maine Cooperative Extension).

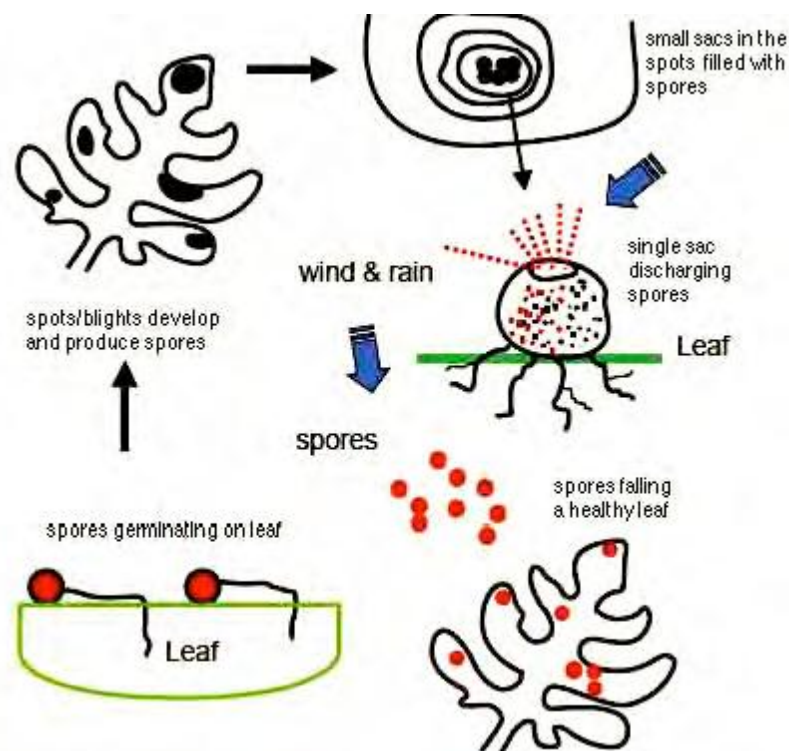
Didymella bryoniae bertahan dari musim ke musim pada sisa-sisa tanaman terinfeksi dan gulma. Patogen ini juga bersifat tular benih dan

tular bibit (Kucharek dan Schenck, 1999; Seebold, 2011; Zitter, 1992). Infeksi terjadi ketika askospora terbawa oleh angin atau konidia terbawa percikan air pada jaringan yang rentan selama cuaca lembab (Seebold, 2011). Dalam kondisi demikian, baik spora atau benih terinfeksi dapat bertindak sebagai infeksi primer. Produksi konidia secara besar-besaran selanjutnya mengakibatkan infeksi sekunder (Agrios, 2005).

Jika tanaman inang tidak tersedia, cendawan dapat bertahan selama dua tahun (Koike et al., 2007) di dalam tanah dan pada sisa-sisa tanaman terinfeksi. Cendawan bertahan sebagai miselium dorman atau sebagai klamidospora (Agrios, 2005; Zitter, 1992). Pada musim semi, piknidia yang dihasilkan, menghasilkan konidia, yang berperan sebagai inokulum utama. Pada kondisi laboratorium, konidia muda berwarna coklat terang, sementara piknidia berwarna hitam. Seiring umur, piknidia menjadi hitam. Konidia dilepaskan melalui sebuah pori-pori (ostiole) pada piknidia, dan jika kelembaban tinggi, konidia terpancar sebagai “tanduk spora” yang terdiri dari ribuan konidia. Konidia beragam dalam ukuran, pendek dan berbentuk silinder, biasanya dengan satu septa dekat di tengah, atau unisel. Pada kondisi lembab, mereka cepat tersebar oleh percikan air (Zitter, 1992). Hujan dan angin menghembuskan askospora atau konidia dari sumber inokulum kepada tanaman baru (Koike et al., 2007).

Cendawan hawar batang berlendir memproduksi dua tahap spora, secara seksual menghasilkan spora (askospora) dan secara aseksual menghasilkan spora (piknidiospora). Kedua jenis spora dihasilkan dalam

struktur yang tertutup. Askospora lebih tepat berperan sebagai inokulum utama (primer) karena mereka dapat disebarkan dari lapangan ke lapangan melalui angin. Sedangkan piknidiospora berfungsi dalam penyebaran sekunder. Piknidiospora dilepaskan dalam substansi berlendir yang membuat mereka lebih dapat sesuai untuk penyebaran jarak dekat dengan percikan air. Sering petani mengatakan tentang penyakit ini terjadi “semalam”. Hal itu karena mereka melihat hasil penyebaran sekunder, yang lebih sulit dikendalikan daripada penyebaran primer karena peningkatan jumlah spora oleh peningkatan jaringan terserang penyakit (Kucharek and Schenck, 1999).



Gambar 6. Siklus hidup patogen hawar batang berlendir (sumber: The Ministry of Agriculture & Livestock, Solomon Islands).

Hawar batang berlendir dapat muncul sepanjang waktu selama musim tanam, namun kerusakan terjadi pada akhir musim setelah pembentukan buah (Seebold, 2011). Temperatur dan kelembaban berperan penting terhadap perkecambahan, sporulasi, penetrasi konidia, dan perkembangan gejala selanjutnya, namun kelembaban relatif di atas 85%, hujan dan durasi kebasahan daun dari satu sampai sepuluh jam mempunyai pengaruh terbesar (Zitter, 1992). Suhu ideal untuk perkembangan penyakit adalah antara 16°C sampai 24°C (Kucharek dan Schenck, 1999; Seebold, 2011). Temperatur optimal untuk perkembangan penyakit beragam tergantung pada jenis tanaman Cucurbitaceae; untuk semangka 24°C adalah optimal, untuk mentimun 24-25°C, dan untuk melon 18°C. Temperatur optimal untuk melon dilaporkan lebih rendah karena resistensinya meningkat pada suhu tinggi (Zitter, 1992). Daun yang basah diperlukan untuk perkecambahan spora, infeksi, dan ekspansi lesi. Hujan yang sering mendukung produksi spora dan penyebaran jarak pendek dari spora (Seebold, 2011).

Penetrasi konidia kemungkinan langsung dan tidak perlu melalui stomata atau luka (Zitter, 1992). Setelah spora berkecambah pada inang yang rentan, cendawan menembus jaringan tanaman dan dengan temperatur optimum, gejala dapat muncul dalam 7 sampai 12 hari (Kucharek dan Schenck, 1999). Adanya luka, keberadaan kumbang mentimun bergaris, aktivitas makan aphid, dan infeksi embun tepung, turut mempengaruhi infeksi pada tanaman (Agrios, 2005; Kucharek and

Schenck, 1999; Seebold, 2011; Zitter, 1992). Luka pada buah selama panen akan meningkatkan risiko busuk hitam selama penyimpanan (Seebold, 2011). Kumbang mentimun bergaris, sebagai tambahan, muncul untuk berperan sebagai vektor *D. bryoniae* antara tanaman Cucurbitaceae di lapangan (Agrios, 2005). Gejala infeksi pada buah (busuk hitam) dapat terjadi di lapangan atau berkembang kemudian di penyimpanan (Zitter, 1992).

Cendawan mampu tumbuh pada 4°C sampai 32°C tetapi temperatur di bawah 7°C memperlambat pertumbuhan cendawan. Jadi penyimpanan atau penampungan buah Cucurbitaceae seharusnya menggunakan temperatur sekitar 7°C-10°C. Pencegahan kerusakan karena suhu dingin memerlukan kompromi dalam suhu penyimpanan. Melon dapat disimpan secara aman pada temperatur yang sedikit lebih rendah (Kucharek and Schenck, 1999).

2. Pengendalian penyakit

Pengendalian dari penyakit busuk hitam pada tanaman Cucurbitaceae relatif sulit, namun disarankan untuk penggunaan benih yang bersih atau yang sudah diperlakukan, rotasi tanaman dengan jangka waktu yang lama, serta aplikasi fungisida yang intensif. Pengendalian yang baik terhadap infeksi pada daun dan batang mengurangi infeksi buah baik di lapangan maupun di penyimpanan. Untuk mencegah infeksi di penyimpanan diperlukan perlakuan yang lebih jauh. Luka pada buah

yang disimpan harus dihindari. Perlakuan labu pada suhu 23-29°C selama dua minggu untuk menyembuhkan luka dan penyimpanan selanjutnya pada 10-12°C sangat membantu. Jika inokulum yang ada di lapangan berat, pencelupan buah labu dalam formaldehid atau clorox sebelum penyimpanan juga membantu (Agrios, 2005).

B. Diagnosis Penyakit Hawar Batang Berlendir

Diagnosis penyakit tumbuhan merupakan suatu proses untuk mengidentifikasi penyakit tanaman melalui gejala dan tanda penyakit yang khas, termasuk faktor-faktor lain yang berhubungan dengan proses pembentukan penyakit tersebut (Sinaga, 2009). Hal ini penting sebelum tindakan yang tepat dapat diterapkan untuk eradikasi atau pengendalian yang tepat bagi suatu penyakit (Ebbels, 2003; Sinaga, 2009).

Diagnosis yang didasarkan pada gejala saja tidak memadai atau tidak cukup untuk mengidentifikasi suatu penyakit tertentu karena banyak penyakit memperlihatkan gejala yang sama walaupun penyebab penyakit atau patogennya berbeda (Sinaga, 2006). Gejala (*symptom*) adalah perubahan-perubahan yang ditunjukkan oleh tumbuhan itu sendiri, sebagai akibat dari adanya penyebab penyakit (Semangun, 2006). Adanya tanda penyakit menambah kepastian suatu diagnosis, tetapi perlu juga diperhatikan kemungkinan adanya patogen sekunder atau saprofit yang menyerang pada tingkat lanjut. Seringkali organisme yang diperoleh

dari tumbuhan bergejala penyakit, bukan merupakan patogen primer (Semangun, 2006; Sinaga, 2006). Adapun yang dimaksud dengan tanda (*sign*) adalah semua pengenal dari penyakit selain reaksi tumbuhan inang (selain gejala), misalnya tubuh buah, miselium, warna spora, lendir, dan sebagainya (Semangun, 2006).

Proses diagnosis penyakit tumbuhan melibatkan deteksi dari keberadaan organisme pengganggu tumbuhan dan kemudian identifikasinya; menempatkannya pada takson khusus dalam sistem klasifikasi yang tepat. Secara klasik, proses ini sangat bergantung pada penampilan morfologi (karakteristik fenotip), tetapi pada saat ini telah meningkat kemungkinan untuk menitikberatkan pada hubungan antar genotip sebagaimana ditentukan dengan analisis asam nukleat. Klasifikasi yang baik dan identifikasi yang benar membuka akses untuk mengakumulasi pengetahuan pada spesies atau kelompok taksonomi yang dimiliki organisme pengganggu tumbuhan, karena pengetahuan seperti itu secara normal terekam dalam hubungannya dengan nama dari spesies atau taksa yang lain. Tanpa nama, akses terhadap pengetahuan ini sulit atau tidak mungkin. Klasifikasi yang benar dari organisme, pada permulaan, ketika pertama kali dideskripsikan secara keilmuan, dan kemudian ketika dideteksi sebagai penyebab masalah kesehatan tanaman, karena itu sangat penting (Ebbels, 2003).

Mengingat terdapat laporan tentang keberadaan penyakit hawar batang berlendir, penyakit ini juga masih termasuk ke dalam kategori A1

(belum terdapat di wilayah Negara Republik Indonesia), dan sampai saat ini belum pernah dilakukan identifikasi, maka penelitian ini diarahkan untuk mengkarakterisasi patogen penyebab penyakit secara morfologi dan molekuler.

1. Karakterisasi Morfologi

Karakteristik cendawan yang paling signifikan yang digunakan untuk identifikasi adalah spora dan struktur bantalan spora (sporofor) serta karakteristik tubuh cendawan (miselium). Item ini dikaji di bawah mikroskop binokuler langsung setelah pengambilan dari spesimen. Spesimen seringkali disimpan basah selama beberapa hari untuk mendorong perkembangan spora. Cendawan yang diisolasi dan tumbuh pada media buatan selanjutnya diidentifikasi berdasarkan spora yang dihasilkan pada media. Untuk beberapa spesies cendawan, media dengan nutrisi khusus telah dikembangkan yang memungkinkan pertumbuhan selektif hanya cendawan tertentu. Hal ini memungkinkan identifikasi dapat dilakukan lebih cepat (Agrios, 2005).

Isolat cendawan patogen yang terdapat pada benih dan pada bagian tanaman lainnya dapat langsung diperiksa dengan mikroskop stereo, melalui pengamatan struktur bantalan spora cendawan seperti acervuli, piknidia, atau sklerotia yang diproduksi pada organ tanaman yang terinfeksi dan benih. Dari data tersebut dapat dinilai perkembangan atau persentase dari infeksi benih secara cepat. Struktur cendawan yang

diproduksi di luar jaringan tanaman dapat dipotong dengan pisau bedah atau silet tajam dan diperiksa di bawah mikroskop majemuk (Narayanasamy, 2001).

Bentuk, ukuran, warna, dan susunan spora pada sporofor atau dalam tubuh buah, sebagaimana bentuk dan warna sporofor atau tubuh buah, adalah karakteristik yang cukup memadai untuk menunjukkan, ordo, famili, dan genus cendawan tersebut. Karakteristik ini dapat dimanfaatkan untuk melacak cendawan melalui analisis yang dipublikasikan, kadangkala kunci-kunci dikotomis juga digunakan untuk karakterisasi genus dan, akhirnya, untuk pengelompokan spesies. Setelah genus dari cendawan telah ditentukan, diperlukan deskripsi dari spesies yang dikenal yang ditemukan di monograf genera atau dalam publikasi tertentu dalam jurnal penelitian (Agrios, 2005).

Karena biasanya ada daftar dari patogen yang mempengaruhi tanaman inang tertentu, seseorang dapat menggunakan semacam indeks inang sebagai jalan pintas dengan cepat untuk menemukan nama-nama spesies cendawan yang mungkin berlaku untuk cendawan yang sedang diteliti. Dengan indeks inang, hanya memberikan saran dalam menentukan identitas, yang akhirnya harus ditentukan melalui referensi untuk monograf dan publikasi yang lebih spesifik (Agrios, 2005).

Spora cendawan dengan ciri karakteristik mungkin tidak terdapat pada jaringan tanaman yang terinfeksi. Inkubasi jaringan di ruang lembab yang menjaga kelembaban tinggi dapat merangsang produksi spora yang

dapat diperiksa di bawah mikroskop untuk proses identifikasi patogen. Banyak benih yang diinkubasi pada kertas saring lembab dalam atmosfer lembab untuk menginduksi pembentukan struktur yang dapat diidentifikasi atau untuk menghasilkan gejala infeksi. Biasanya biji tanaman subtropis yang diinkubasi pada suhu 14°-20°C, sedangkan benih tanaman tropis diinkubasi pada suhu 28°C. Dalam kultur cendawan patogen tertentu struktur bersporulasi biasanya tidak terbentuk, kecuali mereka mendapatkan perlakuan tertentu. Siklus 12 jam dengan radiasi ultraviolet bergantian dengan 12 jam gelap efektif dalam banyak kasus cendawan. Produksi spora seksual oleh patogen Ascomycotina optimal pada suhu yang sangat rendah. Dengan menyimpan jaringan tanaman terinfeksi embun tepung pada 0°-5° C selama beberapa minggu, dengan cara tersebut pembentukan kleistotesia dapat dirangsang. Ketika benih diinkubasi dalam beberapa lapis kertas saring, mereka biasanya berkecambah dan gejala infeksi mungkin muncul atau meningkat. Dengan menggunakan mikroskop stereo, biji yang terinfeksi tersebut dapat dengan mudah dikenali. Beberapa patogen menghasilkan produk tertentu yang dapat diidentifikasi, ketika diinkubasi di bawah sinar NUV (Narayanasamy, 2001).

Di lapangan, sangat sulit secara visual untuk membedakan piknidia dari *Didymella* dan *Phoma*, yang membuat identifikasi dan diagnosis yang cepat, akurat sulit dilakukan. Meskipun pseudotesia, askus dan askospora *D. bryoniae* dapat digunakan secara positif mengidentifikasi patogen,

struktur ini mungkin tidak ada pada jaringan yang terinfeksi ketika diagnosis diperlukan, akibat pseudothesia berkembang pada jaringan terinfeksi lebih lambat daripada piknidia. Untuk mengkonfirmasi diagnosis sementara, isolat harus diperoleh dalam kultur murni, dan dibandingkan dengan isolat yang telah diketahui atau dengan uji patogenisitas (Keinath et al., 1995). Patogenisitas adalah kapasitas atau kemampuan dari suatu patogen untuk menimbulkan suatu penyakit (Sinaga, 2006).

2. Karakterisasi Molekuler

Perkembangan teknik molekuler yang sedemikian pesat memberikan peluang yang besar bagi dikembangkannya perangkat deteksi yang sensitif dan spesifik dan dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat. Pendekatan molekuler pada berbagai bidang penelitian semakin dipermudah dengan ditemukannya metode ***Polymerase Chain Reaction*** (PCR) untuk mengamplifikasi DNA (***deoxyribonucleic acid***) secara in vitro. Perbedaan profil fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR dapat digunakan sebagai alat untuk membedakan mikroba pada tingkat genus, spesies bahkan genotipe spesifik dari patogen (Edel, 1998).

2.a. Isolasi DNA

Menurut Muladno (2010) isolasi DNA dari organism *eukaryote* biasanya dilakukan melalui proses penghancuran sel (*lysis*), pemusnahan protein dan RNA, dan pemurnian DNA. Secara kimiawi, penghancuran sel

dilakukan dengan memanfaatkan senyawa kimia seperti lisozim (*optional*), EDTA (*etilendiamin tetrasetat*), dan SDS (*sodium dodesil sulfat*). Dalam hal ini, fungsi EDTA adalah sebagai perusak sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion ini berfungsi untuk mempertahankan integritas sel maupun mempertahankan aktivitas enzim nuklease yang merusak asam nukleat. Adapun SDS yang merupakan sejenis deterjen dapat digunakan untuk merusak membrane sel. Ini semua mengakibatkan sel mengalami *lysis*. Kotoran (debris) sel yang ditimbulkan akibat perusakan sel oleh EDTA dan SDS dibersihkan dengan cara sentrifugasi, sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA). Untuk menghilangkan protein dari larutan, digunakan phenol (mengikat protein dan sebagian kecil RNA) dan chloroform (membersihkan protein dan polisakarida dari larutan).

Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase. Agar molekul RNA juga dapat dibersihkan dari larutan, enzim RNase digunakan untuk merusak molekul tersebut. Dengan hilangnya protein dan RNA, maka DNA dapat diisolasi secara utuh. Ini dilakukan dengan cara mencampur larutan DNA dengan ethanol serta NaCl yang berfungsi untuk memekatkan, memisahkan DNA dari larutan dan mengendapkan DNA. Endapan DNA yang tampak seperti tepung berwarna putih tersebut selanjutnya dimurnikan lagi sebelum dilarutkan dengan penambahan air atau larutan TE. DNA yang diperoleh ini kemudian digunakan untuk berbagai analisa molekuler (Muladno, 2010).

2.b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR adalah metode untuk deteksi cendawan yang menarik karena spesifitas dan sensitifitasnya. Sudah terdapat banyak contoh uji berbasis PCR yang dikembangkan untuk mendeteksi cendawan dalam bidang medis maupun penyakit tumbuhan. PCR dapat digunakan untuk mendeteksi kelompok strain, *pathotype*, spesies atau taksa yang lebih tinggi, dengan ketentuan bahwa primer oligonukleotida spesifik untuk taksa ini tersedia. Dengan demikian pengembangan prosedur deteksi berbasis PCR memerlukan pengetahuan tentang sekuen dari bagian daerah DNA target untuk merancang primer spesifik. Prinsip dari metode ini adalah penyelarasan sekuen dari organisme target dan non target dan pemilihan primer dengan ketidaksesuaian dengan organisme non-target tetapi homologi cukup untuk priming efisien dan amplifikasi dari semua organisme sasaran (Edel, 1998).

Menurut Muladno (2010) PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA baru yang berkomplemen dengan molekul DNA target tersebut melalui bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai primer dalam suatu *thermocycler*. Panjang target DNA berkisar antara puluhan sampai ribuan nukleotida yang posisinya diapit sepasang primer. Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* dan primer yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA

baru dikenal sebagai enzim *polymerase*. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenine*), dCTP (*Cytosine*), dGTP (*Guanine*) dan dTTP (*Thymine*).

Keanekaragaman urutan nukleotida DNA dapat dianalisis dengan melakukan amplifikasi terhadap DNA tersebut dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Empat komponen utama pada proses PCR adalah (1) DNA *template* (cetakan), yaitu fragmen DNA yang akan dilipat gandakan, (2) oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuen oligonukleotida pendek (15-25 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA, (3) deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dan (4) enzim DNA polimerase yaitu enzim yang melakukan katalisis reaksi sintesis rantai DNA. Komponen lain yang juga penting adalah senyawa buffer (Muladno, 2010; Yuwono, 2006).

Langkah pertama dari siklus pertama, DNA cetakan dibuat menjadi untai tunggal dengan meningkatkan suhu menjadi sekitar 94°C (langkah denaturasi). Dalam langkah kedua, menurunkan temperatur menjadi sekitar 35°C sampai 65°C (tergantung pada sekuen primer dan metode penelitian) menghasilkan penempelan primer pada target sekuen di DNA cetakan (langkah penempelan) (Weising *et al.*, 2005). Primer akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan pada daerah sekuen yang komplementer dengan sekuen primer. Langkah ketiga (langkah pemanjangan), suhu inkubasi dinaikkan menjadi 65°C sampai 72°C

(Weising et al., 2005; Yuwono, 2006). Pada suhu ini, DNA akan melakukan proses polimerasi rantai DNA yang baru berdasarkan informasi yang ada pada DNA cetakan. Setelah terjadi polimerasi, rantai DNA baru akan membentuk jembatan hidrogen dengan DNA cetakan (Yuwono, 2006). Pada siklus kedua, dua DNA untai ganda yang dihasilkan akan didenaturasi lagi, dan kedua untai asal dan untai produk berperan sebagai cetakan (Weising et al., 2005).

Reaksi-reaksi seperti yang sudah dijelaskan tersebut diulangi lagi sampai 25-30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan didapatkan molekul-molekul DNA rantai ganda baru hasil polimerasi dalam jumlah yang lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplifikasi tergantung pada konsentrasi DNA target di dalam campuran reaksi. Minimal, dibutuhkan 25 siklus untuk melipatgandakan satu kopi sekuen DNA target agar hasilnya dapat dilihat secara langsung, misalnya dalam elektroforesis gel agarose (Sambrook et al., 1989).

Konsep asli teknologi PCR mensyaratkan bahwa bagian tertentu sekuen DNA yang akan dilipatgandakan harus diketahui terlebih dahulu sebelum proses pelipatgandaan tersebut dapat dilakukan. Sekuen yang diketahui tersebut penting untuk menyediakan primer, yaitu sekuen oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA dalam reaksi berantai polimerase (Yuwono, 2006).

2.c. Ribosomal DNA

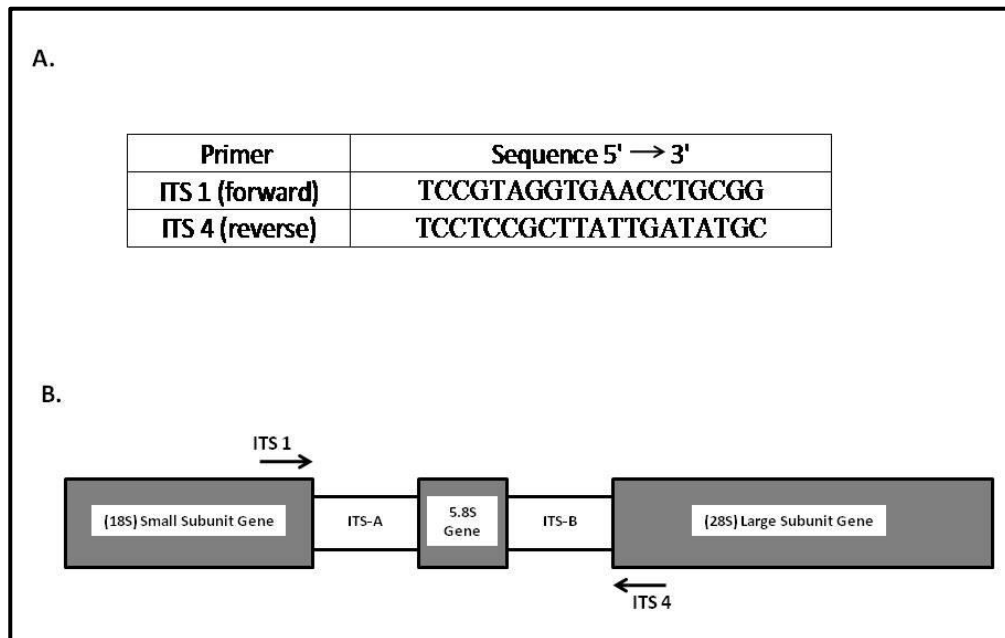
Menurut Yuwono (2005) informasi genetik eukaryot terletak pada kedua untai ganda DNA, artinya masing-masing untai DNA dapat berfungsi sebagai bagian yang mengkode sesuatu (*coding region*) maupun yang tidak membawa informasi genetik (*non coding region*). Gen pada eukaryot dapat dikelompokkan menjadi tiga kelas, yaitu; **Gen Kelas I**, yaitu gen-gen yang mengkode pembentukan rRNA 5,8S, rRNA 18S, dan rRNA 28S, ketiga molekul rRNA tersebut digunakan dalam pembentukan ribosom; **Gen Kelas II**, yaitu gen-gen mengkode sintesis semua molekul protein, gen-gen tersebut terlebih dahulu akan disalin (ditranskripsi) menjadi molekul mRNA, selanjutnya mRNA akan ditranslasi menjadi rangkaian asam amino yang menyusun suatu protein; **Gen Kelas III**, yaitu gen-gen yang mengkode pembentukan molekul tRNA dan rRNA 5S. Molekul tRNA digunakan untuk membawa asam amino yang akan disambungkan menjadi molekul protein dalam proses translasi. Bagian struktural gen pada eukaryot tersusun atas **ekson** (bagian yang mengkode asam-asam amino dan **intron** (bagian yang tidak akan diterjemahkan menjadi urutan asam amino. Selain intron yang terdapat di dalam bagian struktural suatu gen, juga terdapat urutan DNA yang terdapat di antara gen yang satu dengan gen yang lain yaitu yang disebut sebagai **spacer DNA**.

Sekuen DNA yang polimorfik antara spesies cendawan, seperti ***internal transcribed spacer (ITS)***, adalah kandidat yang baik untuk

mendeteksi spesies dengan mengesampingkan semua spesies lain. Misalnya, perbedaan dalam sekuen ITS telah digunakan untuk mengembangkan uji berbasis PCR untuk mendeteksi spesies cendawan patogen tumbuhan pada tanaman inang tanpa isolasi sebelumnya dari cendawan. Sekuen lain dari rDNA telah digunakan untuk merancang primer spesifik, seperti 18S rDNA, 28S rDNA dan mitokondria rDNA. Sekuen rDNA juga telah digunakan untuk mengembangkan uji PCR untuk mendeteksi spesies cendawan dalam sampel klinis. Sebagaimana sekuen rDNA yang ada dalam jumlah salinan tinggi dalam genom cendawan, penggunaannya umumnya meningkatkan sensitivitas uji deteksi. Sekuen unik untuk organisme sasaran dapat ditemukan dengan pendekatan lain. Primer spesifik dapat dirancang dari fragmen genom kloning DNA atau dari amplifikasi PCR fragmen tertentu (Edel, 1998).

DNA ribosomal (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom. Pada eukariot deret rDNA terletak pada nukleus/inti dan mitokondria. Daerah rDNA dipisahkan antara satu dengan yang lainnya oleh suatu pembatas yang disebut *spacer*. Subunit rDNA baik yang besar maupun yang kecil dipisahkan oleh ETS (*external transcribed spacer*) dan IGS (*intergenic spacer*). Kedua pembatas tersebut kadang-kadang disebut NTS (*nontranscribed spacer*). Cendawan termasuk organisme eukariotik, pada rDNA cendawan terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S dan 28S yang di

antaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005).



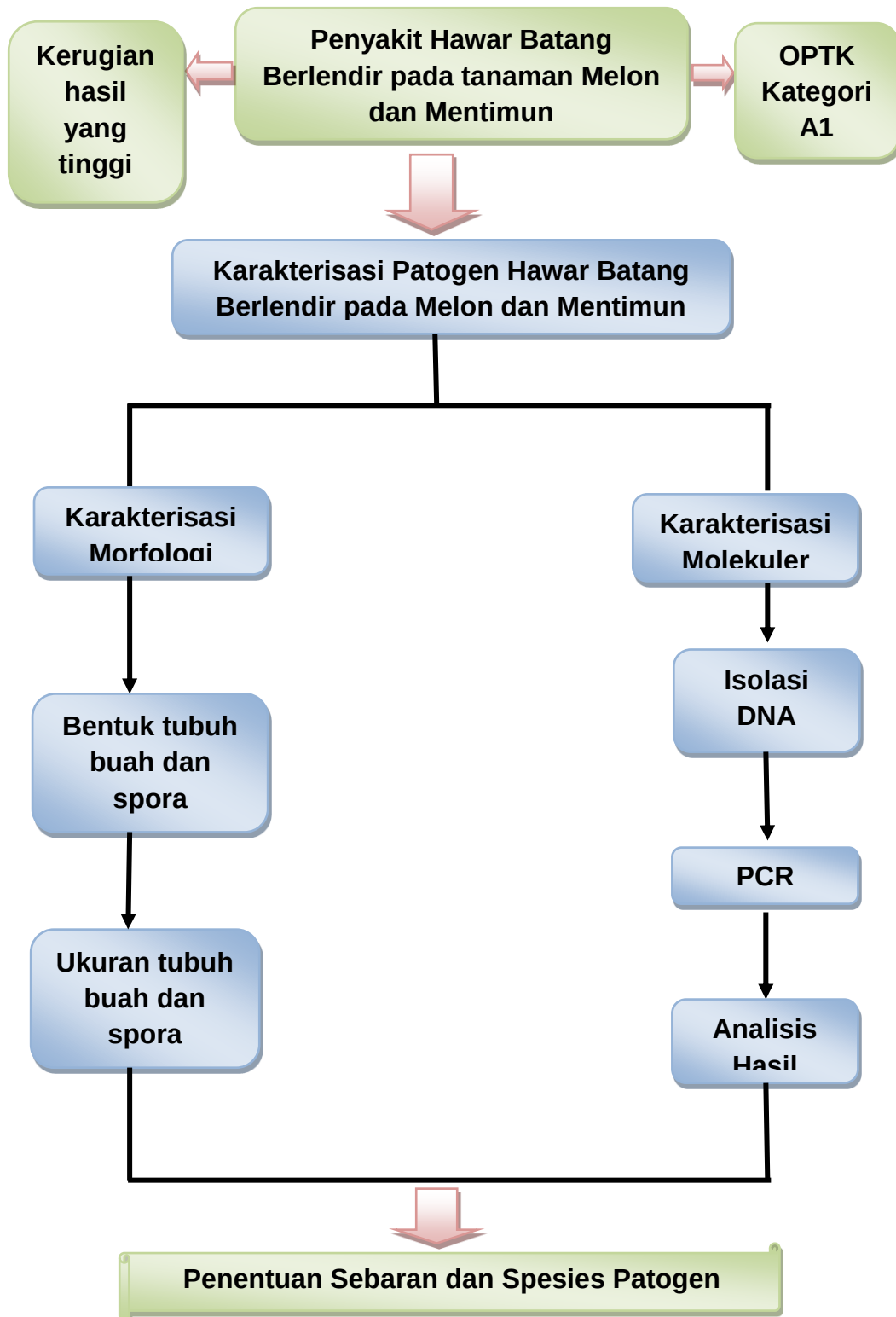
Gambar 7. . A. Pasangan primer yang digunakan dalam penelitian; B. Daerah Ribosomal DNA dan lokasi primer. (Sumber: Timothy Tarbell, Fordham University, Department of Biological Sciences).

Karakterisasi molekuler dengan menggunakan ITS-PCR telah digunakan terhadap beberapa spesies cendawan, seperti *Oncobasidium theobromae* (Mulyatni dkk., 2011), *Phytophthora* spp. (Umayah dan Purwantara, 2006), *Phytophthora palmivora* (Darmono dkk., 2006), *Ganoderma* spp. (Suryanto dkk., 2005), dan *Didymella bryoniae* (Choi *et al.*, 2010; Somai *et al.*, 2002). Choi *et al.* (2010) telah melakukan identifikasi terhadap patogen penyebab penyakit hawar batang berlendir pada tanaman melon di Korea (isolat Jeonbuk) dengan melaksanakan studi karakter morfologi dan analisis sekuen daerah *internal transcribe spacer* (ITS). Kesamaan dalam identitas sekuens antara daerah ITS

rDNA dari isolat Jeonbuk dan *Didymella bryoniae* dari pencarian BLAST dari GenBank adalah 100% dan 95,0% di dalam grup. Studi ini mengidentifikasi isolat Jeonbuk adalah *Didymella bryoniae*.

Penggabungan metode PCR dan perancangan primer untuk mengamplifikasi berbagai daerah yang terdapat pada DNA ribosom (rDNA) sangat mendukung upaya pengembangan perangkat deteksi cendawan patogen tanaman. Perkembangan bioinformatika sebagai ilmu baru telah memberikan kemudahan dalam menganalisis berbagai data hasil penelitian di bidang biologi molekuler. Program serta data-data yang berhubungan dengan biologi molekuler dengan mudah dapat diakses dari internet, antara lain untuk mendapatkan sekuen nukleotida yang tersimpan dalam GenBank, menganalisis tingkat similaritas dengan *multiple Sequence alignment* menggunakan ClustalW, membandingkan suatu sekuen dengan sekuen yang tersimpan dalam Genbank menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), untuk mendesain primer, dan mengetahui situs enzim restriksi dalam utas DNA (Darmono dkk., 2006).

C. Kerangka Pikir



Gambar 8. Kerangka pikir penelitian.