

Deteksi dan Identifikasi Patogen Karat Jingga pada Tanaman Tebu Menggunakan Metode DNA Barcoding

Detection and Identification of Orange Rust Pathogen on Sugarcane Plants Using DNA Barcoding Method

Ahmad Ilham Tanzil^{1*}, Dinda Mala Maulida¹, Intan Ria Neliana², Bambang Sugiharto², Wahyu Indra Duwi Fanata^{1,2}, Ummi Sholikhah¹, Tri Ratnasari¹

¹Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jalan Kalimantan no.37, Kampus Tegalboto, Jember, 68121

²Bioteknologi, Pascasarjana Universitas Jember
Jalan Kalimantan no.37, Kampus Tegalboto, Jember, 68121

(diterima Februari 2025, disetujui Desember 2025)

ABSTRAK

Identifikasi cendawan patogen penyebab karat daun hingga tingkat spesies sering kali tidak akurat jika hanya mengandalkan karakteristik morfologi. Hal ini disebabkan oleh sifat morfologinya yang mudah berubah dan saling tumpang tindih akibat pengaruh lingkungan serta interaksi dengan tanaman inang. Oleh karena itu, diperlukan analisis lanjutan seperti karakterisasi molekuler untuk memastikan identifikasi yang lebih valid. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi cendawan karat daun asal tebu menggunakan metode *DNA barcoding*. Sampel cendawan diperoleh dari lahan perkebunan tebu di Bondowoso dan Blitar, Jawa Timur. Identifikasi morfologi cendawan karat sulit dilakukan dikarenakan saat pengamatan menggunakan mikroskop *scanning electron microscopy* (SEM) sering hanya satu stadium saja yang ditemukan. Identifikasi molekuler dilakukan dengan amplifikasi daerah *internal transcribed spacer* (ITS) dan analisis homologi hasil sekuens pada basis data untuk dapat mengidentifikasi hingga tingkat spesies. Daerah ITS dipilih karena merupakan penanda molekuler yang umum digunakan untuk identifikasi dan analisis filogenetik pada fungi, mengingat tingkat variasinya yang tinggi antarspesies namun relatif konservatif di dalam spesies yang sama. Hasil amplifikasi didapatkan pita DNA berukuran 1350 pb pada kedua lokasi. Hasil sekuensing menunjukkan sampel dari Bondowoso dan Blitar memiliki kekerabatan dekat dengan sekuens *Puccinia kuehnii* dari *National Center for Biotechnology Information*. Hasil pembuatan pohon filogenetik didapatkan bahwa sampel dari kedua lokasi masih satu kelompok dengan sekuens *P. kuehnii* dari negara lain.

Kata kunci: bioinformatika, *internal transcribed spacer*, karat daun, *Puccinia* sp., scanning electron microscope

ABSTRACT

Identifying the pathogenic fungi that cause leaf rust down to the species level is often inaccurate when relying solely on morphological characteristics. This is due to the highly variable and overlapping nature of their morphological traits, which are influenced by environmental factors and interactions with host plants. Therefore, further analysis such as molecular characterization is necessary to ensure a more

*Alamat penulis korespondensi: Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Jalan Kalimantan no.37, Kampus Tegalboto, Jember, Jawa Timur, 68121.
Tel: +62 331 330224, Faks: +62 331 339029. Surel: aitanzil@unej.ac.id

valid identification. This study aims to identify leaf rust fungi from sugarcane using the DNA barcoding method. Fungal samples were collected from sugarcane plantations in Bondowoso and Blitar, East Java. Morphological identification of leaf rust fungi is difficult because, during observation using scanning electron microscopy, often only a single life stage is detected. Molecular identification was performed by amplifying the internal transcribed spacer (ITS) region and analyzing the homology of the resulting sequences against a database to identify the fungi down to the species level. The ITS region was selected because it is a molecular marker commonly used for identification and phylogenetic analysis in fungi, given its high level of variation between species but relative conservation within the same species. The amplification results yielded a 1350 bp DNA band at both sites. Sequencing results showed that samples from Bondowoso and Blitar were closely related to *Puccinia kuehnii* sequences from the National Center for Biotechnology Information. The phylogenetic tree revealed that samples from both locations belonged to the same group as *P. kuehnii* sequences from other countries.

Key words: bioinformatic, internal transcribed spacer, *Puccinia* spp., scanning electron microscope, sugarcane rust

PENDAHULUAN

Karat daun tebu (*sugarcane rust*) merupakan penyakit yang menginfeksi tanaman tebu tanaman dari famili Poaceae lainnya. Karat daun tebu bahkan menjadi penyakit utama pada budi daya tebu di beberapa negara bagian Amerika Serikat seperti Florida, Louisiana dan Texas (Sanjel *et al.* 2019). Dampak dari infeksi cendawan ini ialah penurunan produktivitas yang tingkat keparahannya bergantung pada varietas dan kondisi lingkungan. Sampai saat ini, telah dilaporkan terdapat tiga spesies cendawan karat tebu yaitu *Puccinia kuehnii* (penyebab penyakit karat jingga—*orange rust*), *Puccinia melanocephala* (penyebab penyakit karat cokelat—*brown rust*), dan *Macruropyxis fulva* (penyebab penyakit karat kuning kecokelatan—*tawny rust*) (Sotomayor *et al.* 1983; Ryan dan Egan 1989; Martin *et al.* 2017).

Pada tahun 1978, temuan pertama infeksi cendawan karat daun tebu pada tanaman tebu hibrida di Republik Dominica dan Australia tidak menunjukkan kerugian yang berarti dan tidak termasuk dalam penyakit utama (Sotomayor *et al.* 1983). Statusnya berubah ketika ada laporan bahwa varietas tebu komersial B 4362—yang masif ditanam di beberapa negara—terinfeksi oleh *P. melanocephala* dan menunjukkan penurunan hasil yang besar sehingga tidak digunakan kembali (Ryan dan Egan 1989). Di Indonesia, dua spesies karat yang telah dilaporkan yaitu

P. melanocephala (brown rust) dan *P. kuehnii* (orange rust) (Achadian *et al.* 2011). Beberapa varietas tebu di Indonesia yang diketahui agak rentan terhadap *P. kuehnii* ialah PS881, PS92-752, dan 6535 (Ismayanti *et al.* 2013).

Metode identifikasi secara morfologi memiliki kekurangan karena stadium uredinia dengan urediniosporenya merupakan stadium yang sering ditemukan dan karakteristik morfologinya sulit dibedakan antarspesies. Selain itu, pertumbuhan cendawan dipengaruhi oleh varietas, iklim, dan kondisi lingkungan regional (Victoria *et al.* 1990; Glynn *et al.* 2010), sehingga ada kemungkinan bahwa spesies cendawan karat daun tebu yang ada bervariasi pada tiap lokasi. Identifikasi cendawan famili Pucciniaceae secara fisik kerap menemui kendala akibat minimnya variasi struktur urediniospora pada fase uredinia. Oleh sebab itu, analisis molekuler menjadi metode yang sangat krusial (Roy *et al.* 1998), sebagaimana ditunjukkan pada kasus *P. kuehnii* yang kerap dikelirukan dengan *P. melanocephala* atau *Macruropyxis fulva* (Martin *et al.* 2015).

Identifikasi karakter molekuler karat daun tebu dapat dilakukan dengan metode DNA *barcoding*. DNA *barcoding* umumnya dimulai dengan pengambilan sampel, isolasi DNA, *polymerase chain reaction* (PCR), sikuensing, dan membandingkan hasil sikuensing dengan database agar diketahui hingga tingkat spesies (Sucher *et al.* 2012). Daerah *internal transcribed spacer* (ITS) merupakan daerah

yang tidak dikode menjadi protein fungsional sehingga memiliki tingkat mutasi dan variasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan daerah yang dikode seperti *small ribosomal subunit* dan *large subunit* (Simon dan Weiß 2008). Oleh sebab itu, ITS memiliki keanekaragaman genetik yang tinggi antar beberapa spesies organisme sehingga sering digunakan dalam analisis filogenetik dan tingkat evolusi eukariot. Penelitian ini bertujuan mendeteksi dan mengidentifikasi cendawan penyebab penyakit karat daun tebu yang diambil dari perkebunan tebu di Bondowoso dan Blitar melalui pengamatan mikroskopis menggunakan SEM dan secara molekuler menggunakan metode DNA barcoding.

BAHAN DAN METODE

Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dilakukan secara purposive sampling di perkebunan tebu Nyioran, Desa Lombok Wetan, Kecamatan Wonosari, Kabupaten Bondowoso (7.944121°, 113.902598°, 247 mdpl) dan Gaprang 2, Desa Gaprang, Kecamatan Kanigoro, Kabupaten Blitar (-8128342°, 112.188224°, 160 mdpl) pada bulan Mei hingga Juni 2024 saat musim kemarau. Daun tebu bergejala karat daun diambil dari daun bagian bawah pada tanaman umur 9 bulan. Sampel diletakkan dalam *cool box* untuk dibawa ke Laboratorium Biologi Molekuler dan Bioteknologi, UPA Pengelolaan Limbah dan Laboratorium Terpadu, Universitas Jember.

Analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Analisis SEM dilakukan menggunakan SEM Thermo Scientific Prisma E. Bagian daun bergejala ditempelkan pada *carbon tape* dan dilekatkan pada sample stage yang terpasang pada holder di dalam chamber. Selanjutnya dilakukan low vacuum pada tekanan 90 pa dan voltase 5 KV. Spotsize diatur pada 2.5 dan kecerahan serta kontras diatur sesuai kebutuhan. Scan sampel dilakukan pada 10 µS (mikrosiemens).

Ekstraksi DNA Cendawan Karat

Ekstraksi DNA cendawan karat menggunakan metode SDS. Sebanyak 0.25 g sampel daun tebu bergejala dicampur dengan nitrogen cair dan dihaluskan menggunakan mortar. Sebanyak 600 µL buffer ekstraksi dan SDS 30% ditambahkan pada sampel, kemudian divortex lalu diinkubasi pada suhu 65 °C selama 10 menit. Selanjutnya sampel ditambahkan 600 µL PCI dan divortex lalu disentrifugasi pada kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang. Supernatan yang diperoleh diambil dan ditambahkan 600 µL isopropanol lalu tabung dibolak-balik hingga homogen. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan supernatan dibuang. Sampel ditambahkan 50 µL buffer TE dan 2 µL RNase lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah inkubasi, 500 µL buffer TE dan 500 µL PCI ditambahkan kembali ke dalam sampel, lalu divortex dan disentrifus selama 10 menit pada kecepatan 12 000 rpm. Sebanyak 500 µL supernatan dipindah ke tube baru dan ditambahkan 400 µL isopropanol dan 100 µL sodium asetat lalu dibolak-balik hingga homogen. Sampel kembali disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit dan diinkubasi pada suhu -20 °C selama 60 menit. Sampel disentrifugasi kembali pada kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu ruang dan supernatan dibuang. Selanjutnya sampel ditambahkan etanol 70% dan disentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C. Langkah terakhir tersebut diulang kembali lalu pellet DNA diinkubasi pada oven 45 °C selama satu jam kemudian ditambahkan buffer TE sebanyak 30 µL.

Amplifikasi PCR pada Daerah ITS

Amplifikasi cendawan patogen dilakukan menggunakan primer spesifik *Puccinia* spp. PM-F (5'-GCGGTATTCCAA AAGGTACACCTG-3') dan PM-R (5'-GACT TTCATTACATGCCCAGG-3') (hasil kontrak) digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS1 dan ITS2 *Puccinia* spp. Reaksi PCR untuk 15 µL total reaksi terdiri atas

7.5 µL Go Taq® Green Master Mix (Promega), 1 µL primer PM-F dan 1 µL PM-R (100 µM), 1 µL templat DNA dan 4.5 µL air bebas nuklease. Mesin PCR yang digunakan ialah Bio-Rad T-100 Thermal Cycler yang terdiri atas 35 siklus dengan kondisi denaturasi awal pada suhu 95 °C selama 5 menit, denaturasi lanjut pada suhu 95 °C selama 30 detik, penempelan primer pada suhu 55 °C selama 30 detik, ekstensi pada 72 °C selama 1 menit, dan ekstensi akhir pada suhu 72 °C selama 7 menit. Produk PCR dielektroforesis dalam gel agarosa 1% dengan bufer TAE dan visualisasi dengan GelDoc (Major Science).

Sikuensing dan Rekonstruksi Pohon Filogenetika

Sikuensing dilakukan di Apical Scientific melalui PT. Genetika Science Indonesia. Hasil sikuensing dianalisis menggunakan perangkat BioEdit dan dibandingkan dengan sikuens yang ada di database GenBank NCBI melalui program *basic local alignment search tool*. Hubungan kekerabatan antarsikuen dan pembuatan

pohon filogenetik menggunakan metode *unweighted pair group method with arithmetic mean* pada perangkat lunak MEGA XI.

HASIL

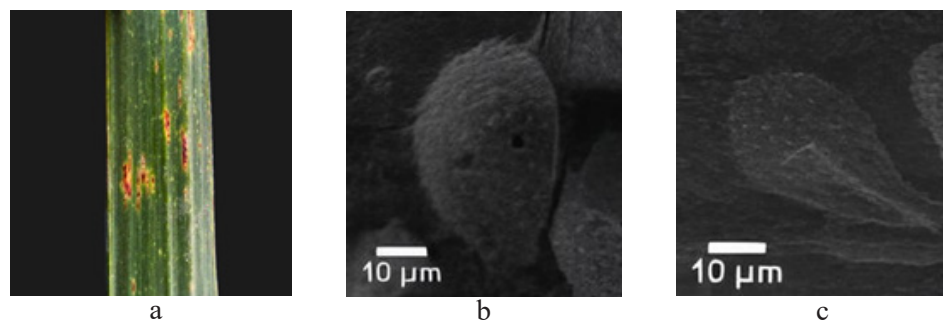
Gejala Penyakit

Penyakit karat daun tebu dapat ditemukan di semua lokasi eksplorasi (Tabel 1). Penyakit karat pada daun tebu memiliki gejala berupa bercak berwarna kuning dan berubah menjadi cokelat kemerahan seiring waktu, dengan stadium uredinium terbentuk pada sisi bawah daun (Gambar 1a). Urediniospora akan muncul melalui jaringan daun yang robek (pustula). Pada serangan yang berat, pustula akan menyebar ke bagian daun yang lain. Pustula yang terbuka akan menunjukkan urediniospora yang memiliki beragam warna, bentuk dan ukuran. Warna pustul menjadi dasar dalam menentukan patogen penyebab karat daun. Warna jingga (*orange*) merupakan gejala khas dari *P. kuehnii* sedangkan warna cokelat merupakan gejala khas dari *P. melanocephala* (Selvakumar dan Vismawathan 2019).

Tabel 1 Sebaran lokasi dan data varietas tebu yang terserang penyakit karat daun tebu

Table 1 Distribution of locations and sugarcane varieties infected by sugarcane leaf rust disease

Lokasi (Location)		Varietas tebu (Sugarcane varieties)		
Daerah (Region)	Longitude (Longitude)	Latitude (Latitude)	Nama lokal (Local name)	Nama ilmiah (Scientific name)
Nyioran, Lombok Wetan, Kec. Wonosari.	113.902598	-7.944121	Bululawang (BL)	<i>Saccharum officinarum</i>
Gaprang 2, Gaprang, Kec. Kanigoro	112.188224	-8.128342	Bululawang (BL)	<i>Saccharum officinarum</i>



Gambar 1 a, Daun tebu yang terinfeksi karat jingga (*orange rust*); b, Urediniospora *Puccinia kuehnii* asal Bondowoso; c, Urediniospora *Puccinia kuehnii* asal Blitar

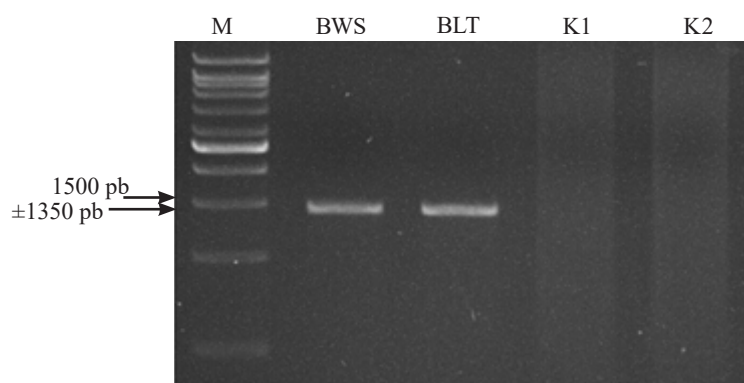
Figure 1 a, Sugarcane leaves infected with orange rust; b, Urediniospora *Puccinia kuehnii* from Bondowoso; c, Urediniospora *Puccinia kuehnii* from Blitar

Pengamatan Morfologi

Berdasarkan pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dan SEM, sampel dari Kabupaten Blitar (BLT) dan Kabupaten Bondowoso (BWS) memiliki uredinisopora *ellipsoid* dan *obovoid* (Gambar 1b dan 1c); berwarna jingga (*oranye*) hingga coklat tua. Pada permukaan uredinisopora ditemukan duri (*spine/echinulation*). *Puccinia* spp. sulit dibedakan hingga tingkat spesies karena memiliki karakter morfologi yang mirip satu dengan yang lainnya.

Identifikasi Molekuler

Hasil amplifikasi menggunakan primer PM-F dan PM-R pada PCR pada sampel BWS dan BLT menunjukkan pita DNA berukuran 1350 pb (Gambar 2) dan teridentifikasi sebagai *Puccinia* spp. Analisis sikuen menunjukkan bahwa keragaman genetika yang cukup rendah. Hal ini ditandai dengan tingginya nilai homologi nukleotida (Tabel 2 dan Tabel 3). Variasi genetika antarspesies *Puccinia* spp. cukup rendah, yaitu bernilai <1 (Tabel 4 dan Tabel 5). Hasil ini didukung dengan adanya



Gambar 2 Amplifikasi DNA pada sampel *Puccinia* spp. asal Bondowoso dan Blitar menggunakan primer PK-F dan PM-R. M, Penanda DNA Ladder 1 kb (Vivantis); BWS, Sampel Kab. Bondowoso; BLT, Sampel Kab. Blitar; K1 dan K2, Kontrol.

Figure 2 DNA amplification in *Puccinia* spp. samples from Bondowoso and Blitar using PK-F and PM-R primers. M, Marker DNA Ladder 1 kb (Vivantis); BWS, Bondowoso Regency Sample; BLT, Blitar Regency Sample; K1 and K2, Controls.

Tabel 2 Homologi nukleotida dan asam amino *Puccinia* spp. asal Kab. Bondowoso dibandingkan dengan sikuen lain pada GenBank

Table 2 Nucleotide and amino acid homology levels of *Puccinia* spp. samples from Bondowoso Regency with other sequences in GenBank

Spesies (Species)	Negara (Country)	Nomor aksesori (Accession number)	Homologi (Homology) (%)
<i>Puccinia kuehnii</i>	Indonesia	PQ799503	100.0
<i>P. kuehnii</i>	Amerika Serikat	GQ283005	96.5
<i>P. kuehnii</i>	China	KP201840	96.5
<i>P. kuehnii</i>	El Salvador	GQ283007	96.5
<i>P. kuehnii</i>	Mexico	GU058021	96.5
<i>P. kuehnii</i>	Australia	KU296887	98.8
<i>P. kuehnii</i>	Cote d'Ivoire	HQ666888	98.8
<i>P. kuehnii</i>	Guatemala	EU344904	96.6
<i>P. kuehnii</i>	Ekuador	KF202306	98.6
<i>P. kuehnii</i>	Brazil	MN545866	92.5
<i>Pileolaria brevipes</i>	Amerika Serikat	MG907216	86.7

Tabel 3 Homologi nukleotida dan asam amino *Puccinia* spp. asal Kab. Blitar dibandingkan dengan sikuen lain pada di GenBank

Table 3 Nucleotide and amino acid homology of *Puccinia* spp. from Blitar Regency compared to other sequences in GenBank

Spesies (Species)	Negara (Country)	Nomor akses (Accession number)	Homologi (Homology) (%)
<i>Puccinia kuehnii</i>	Mexico	GQ283004	97.0
<i>P. kuehnii</i>	China	KP201843	97.0
<i>P. kuehnii</i>	China	KP201840	97.0
<i>P. kuehnii</i>	Australia	KU296887	97.0
<i>P. kuehnii</i>	Cote d'Ivoire	HQ666888	97.0
<i>P. kuehnii</i>	Mexico	GU058021	97.0
<i>P. kuehnii</i>	China	KP201841	96.8
<i>P. kuehnii</i>	China	KP201842	96.7
<i>P. kuehnii</i>	Amerika Serikat	EU164549	96.6
<i>P. kuehnii</i>	Guatemala	EU344904	96.5
<i>Uromyces wedeliae</i>	Australia	KX999907	88.2

Tabel 4 Jarak genetik *Puccinia* spp. asal Kabupaten Bondowoso (PM-BWS) dengan sikuen di GenBank

Table 4 Genetic distance between *Puccinia* spp. samples from Bondowoso Regency (PM-BWS) and sequences in GenBank

Nomor akses (Accession number)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 PM_BWS												
2 PQ799503 <i>Puccinia kuehnii</i>	0.00											
3 GQ283005 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02										
4 KP201840 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00									
5 GQ283007 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00								
6 GU058021 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00							
7 KU296887 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00						
8 HQ666888 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
9 EU344904 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
10 KF202306 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
11 MN545866 <i>P. kuehnii</i>	0.05	0.05	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03		
12 MG907216 <i>Pileolaria brevipes</i>	0.16	0.16	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.18

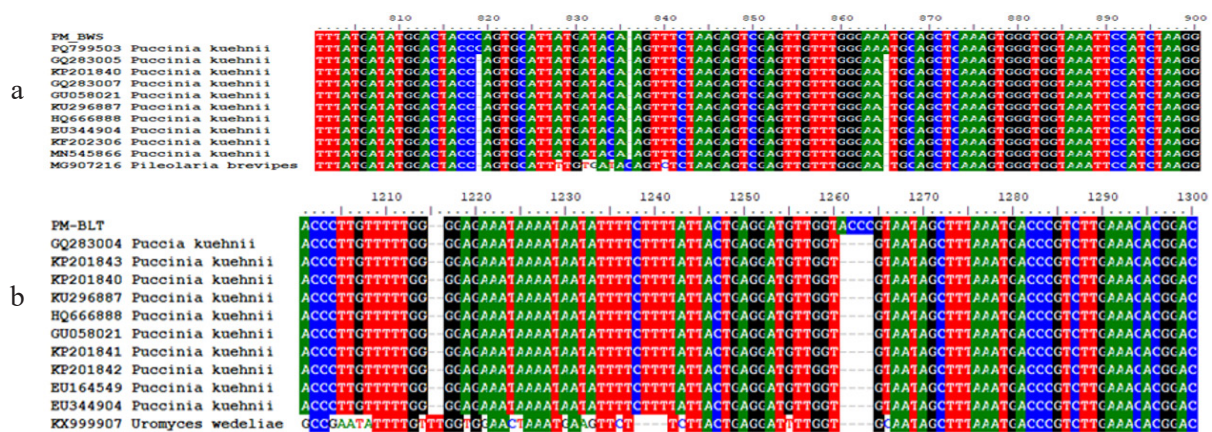
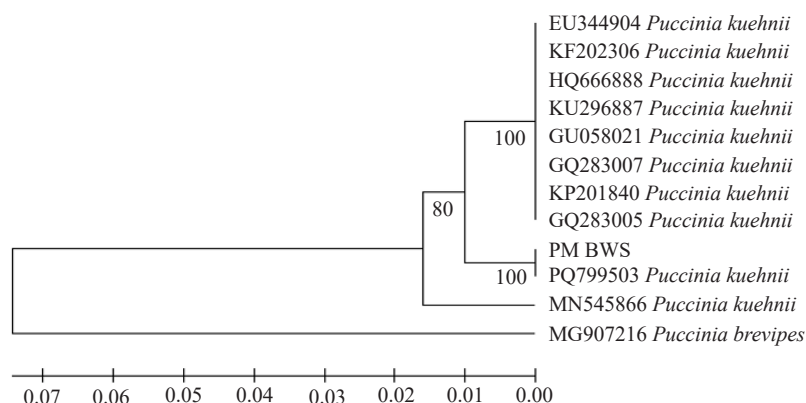
variasi-variasi nukleotida pada *alignment* sampel BWS dan BLT menggunakan perangkat lunak BioEdit (Gambar 3). Analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa sampel *Puccinia* spp. asal Kab. Bondowoso satu kelompok dengan sikuen *Puccinia kuehnii* asal Indonesia dengan *bootstrap value* 100% (Gambar 4), sedangkan *Puccinia* spp. asal Kab. Blitar satu kelompok dengan semua sikuen *Puccinia kuehnii* yang terdapat pada Tabel 2 dengan *bootstrap value* 95% (Gambar 5).

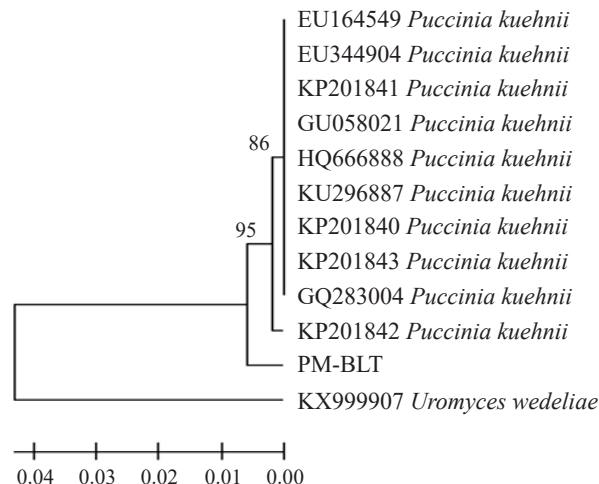
PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil analisis molekuler, cendawan karat yang diamati pada lokasi Bondowoso dan Blitar merupakan *P. kuehnii*, dan memiliki homogenitas tinggi dengan sikuen *P. kuehnii* di NCBI. Oleh karena itu karat daun tebu yang diamati di kedua lokasi tersebut merupakan karat daun jingga (*orange rust*). Dari dua lokasi yang diamati, varietas Bululawang (BL) merupakan varietas

Tabel 5 Jarak genetik *Puccinia* spp. asal Kabupaten Blitar (PM-BLT) dengan sikuen di GenBankTable 5 Genetic distance of *Puccinia* spp. samples from Blitar Regency (PM-BLT) with sequences in GenBank

Nomor aksesori (Accession number)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 PM-BLT												
2 GQ283004 <i>Puccinia kuehnii</i>	0.01											
3 KP201843 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00										
4 KP201840 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00									
5 KU296887 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00								
6 HQ666888 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00							
7 GU058021 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00						
8 KP201841 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00					
9 KP201842 <i>P. kuehnii</i>	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00				
10 EU164549 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
11 EU344904 <i>P. kuehnii</i>	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
12 KX999907 <i>Uromyces wedeliae</i>	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	

Gambar 3 Variasi basa nukleotida sampel *Puccinia* spp. asal a, Bondowoso (PM_BWS), dan b, Blitar (PM-BLT) dibandingkan dengan *Puccinia kuehnii* dari NCBI.Figure 3 Nucleotide base variations in *Puccinia* spp. samples from a, Bondowoso (PM_BWS), and b, Blitar (PM-BLT) compared to *Puccinia kuehnii* from NCBI.Gambar 4 Analisis filogenetika *Puccinia* spp. asal Bondowoso dibandingkan dengan sekuens lain yang tersedia di NCBI.Figure 4 Phylogenetic analysis of *Puccinia* spp from Bondowoso compared to other available sequences on NCBI.



Gambar 5 Analisis filogenetika *Puccinia* spp. asal Blitar dibandingkan dengan sekuens lain yang tersedia di NCBI.

Figure 5 Phylogenetic analysis of *Puccinia* spp from Blitar compared to other available sequences on NCBI.

yang sering ditemukan terinfeksi penyakit karat jingga. Dengan demikian, varietas BL cenderung rentan terserang cendawan karat jingga meskipun Ismayanti *et al.* (2013) melaporkan bahwa varietas BL relatif tahan terhadap *P. kuehnii*. Adanya variasi strain dari *P. kuehnii* dan cekaman lingkungan diduga berpengaruh pada tingkat ketahanan varietas tebu Bululawang.

Infeksi karat daun pada tebu mudah untuk dikenali secara makroskopik dengan pustulnya yang khas pada permukaan bahwa daun. Pustula terbentuk sebagai massa spora aseksual (urediniospora) berkecambah di permukaan daun lalu miselium invasif dan haustoriumnya tumbuh di dalam jaringan daun. Gejala awal penyakit karat juga mirip penyakit noda/bercak kuning dan cokelat yang keduanya bukan disebabkan *Puccinia* spp.

Untuk membedakan jenis-jenis karat daun harus diamati pada daun yang terserang pada tingkat lanjut karena gejala awal semua penyakit karat tebu sangat mirip. Warna dan bentuk pustula sering digunakan untuk membedakan jenis-jenis karat daun tebu. Warna jingga merupakan gejala khas dari *P. kuehnii* sedangkan warna cokelat merupakan gejala khas dari *P. melanocephala* (Selvakumar dan Vismawathan 2019). Akibat spora yang terus-menerus diproduksi, jaringan daun akan robek dan melepaskan spora baru,

lalu siklus ini terus terulang kembali (Garnica *et al.* 2014). Adanya pustula menyebabkan penurunan laju fotosintesis (Zhao *et al.* 2011) dan penurunan kadar klorofil seperti yang terjadi pada *P. coronata* pada tanaman oat (Scholes dan Rolfe 1996).

Berdasarkan analisis jarak genetik menggunakan MEGA11, keragaman genetik ITS tidak cukup tinggi karena ITS memiliki cukup banyak daerah konservasi (Ciardo *et al.* 2006; Bradshaw *et al.* 2023). Sebanyak 8 genus cendawan yang diamati memiliki kemiripan basa (homologi) yang sangat tinggi dan beberapa diantaranya hampir mirip, yakni $\geq 97\%$ -100%. Dengan demikian, ITS memiliki daerah konservasi yang cukup tinggi meskipun pada daerah ITS sebenarnya mempunyai variasi tinggi antarspesies akibat sering mengalami perubahan atau mutasi (Mulyatni *et al.* 2011). Meskipun ITS memiliki daerah konservasi yang cukup tinggi, ITS sering digunakan pada penelitian identifikasi cendawan hingga tingkat spesies karena $>70\%$ dari klasifikasi menggunakan ITS cukup akurat pada tingkat genus atau antarspesies (Porter dan Golding 2011).

Penggunaan primer spesifik *Puccinia* spp. yang didesain berdasarkan daerah ITS terbukti dapat mengamplifikasi DNA target meskipun sampel yang diekstraksi bersamaan dengan daun. Aplikasi metode DNA barcoding

berhasil mendeteksi patogen karat daun tebu dari BWS dan BLT sebagai *P. kuehnii* yang merupakan cendawan penyebab penyakit karat jingga.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada LP2M Universitas Jember yg telah memberikan bantuan pendanaan lewat sumber pendanaan hibah internal skema "Penelitian Dosen Pemula" Tahun Anggaran 2024 nomor kontrak 3016/UN25.3.1/LT/2024 dengan judul Skreening, Identifikasi Molekuler dan Karakterisasi Patogen Penyebab Karat Daun pada Tanaman Tebu di Wilayah Tapal Kuda.

DAFTAR PUSTAKA

- Achadian EM, Kristiani A, Magarey RC, Sallam N, Samson P, Goebel FR, Lonie K. 2011. Hama dan Penyakit Tebu. Buku saku. Malang (ID): Kerjasama P3GI dengan BSES Limited. Australia dan ACIAR.
- Bradshaw MJ, Aime MC, Rokas A, Maust A, Moparthi S, Jellings K, Pane AM, Hendricks D, Pandey B, Li Y, Pfister DH. 2023. Extensive intragenomic variation in the internal transcribed spacer region of fungi. *IScience*. 26:1-9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.107317>.
- Ciardo DE, Schär G, Böttger EC, Altwegg M, Bosshard PP. 2006. Internal transcribed spacer sequencing versus biochemical profiling for identification of medically important yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*. 44(1):77-84. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.77-84.2006>.
- Garnica DP, Nemri A, Upadhyaya NM, Rathjen, JP, Dodds, PN. 2014. The ins and outs of rust haustoria. *Plos Pathogens*. 10(9):1-4. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004329>.
- Glynn NC, Dixon LJ, Castlebury LA, Szabo LJ, Comstock JC. 2010. PCR assays for the sugarcane rust pathogens *Puccinia kuehnii* and *P. melanocephala* and detection of a SNP associated with geographical distribution in *P. kuehnii*. *Plant Pathology*. 59(4):703-711. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02299.x>.
- Ismayanti W, Toekidjo, Hadisutrisno B. 2013. Pertumbuhan dan tanggapan terhadap penyakit karat (*Puccinia kuehnii*) sembilan klon tebu (*Saccharum officinarum* L.) yang diinfeksi Jamur Mikoriza Arbuskular. *Vegetalika*. 2(4):75-87.
- Martin LA, Evans DL, Rutherford RS, McFarlane SA. 2015. Tawny rust: an update on the new species of rust infecting sugarcane in Southern Africa. *Proceedings of the South African Sugar Technologists Association* 88: 309-313.
- Martin LA, Rutherford RS, McFarlane SA. 2017. Touchdown PCR assay for the rapid diagnosis of tawny rust caused by *Macruropyxis fulva* on sugarcane. *Australasian Plant Pathology*. 46:103-105. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-016-0464-x>.
- Mulyatni AS, Priyatmojo A, Purwantara A. 2011. Sekuen Internal Transcribed Spacer (ITS) DNA Ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan Jamur Sekerabat Pembanding. *Menara Perkebunan*. 79(1):1-5. DOI: <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v79i1.75>.
- Porter TM, Golding GB. 2011. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons?. *New Phytologist*. 192:775-782. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03838.x>.
- Roy BA, Vogler DR, Bruns TD, Szaro TM. 1998. Cryptic Species in the *Puccinia monoica* Complex. *Mycologia* 90(5):846-853. DOI: <https://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026978>.
- Ryan CC, Egan BT. 1989. Rust. Di dalam: Ricaud C, Egan BT, Gillaspie Jr AG, Hughes C.G, editor. *Diseases of sugarcane, major diseases*. Elsevier. hlm 21-38. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-42797-7.50017-X>.
- Sanjel S, Chaulagain B, Small IM, Comstock JC, Hincapie M, Raid RN, Rott P. 2019.

- Comparison of progress of brown rust and orange rust and conditions conducive for severe epidemic development during the sugarcane crop season in Florida. *Plant Disease*. 103(5):825-831. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0862-RE>.
- Scholes JD, Rolfe SA. 1996. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*. 199:573-582. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00195189>.
- Selvakumar R, Viswanathan R. 2019. Sugarcane rust: changing disease dynamics and its management. *Journal of Sugarcane Research*. 9(2):97-118. DOI: <https://doi.org/10.37580/JSR.2019.2.9.97-118>.
- Simon UK, Weiß M. 2008. Intragenomic variation of fungal ribosomal genes is higher than previously thought. *Molecular Biology and Evolution*. 25(11):2251-2254. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msn188>.
- Sotomayor IA, Purdy LH, Trese AT. 1983. Infection of sugarcane leaves by *Puccinia melanocephala*. *Phytopathology*. 73(5):695-699. DOI: <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-695>.
- Sucher NJ, Hennell JR, Carles MC. 2012. DNA fingerprinting, DNA barcoding, and next generation sequencing technology in plants. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols*. 862:13-22. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-609-8_2.
- Victoria J, Moreno C, Cassalett C. 1990. Genotype environment interaction and its effect on sugarcane rust incidence. *Sugar Cane*. 4:13-17.
- Zhao D, Glynn NC, Glaz B, Comstock JC, Sood S. 2011. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. *Plant Disease*. 95(6):640-647. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-10-0762>.