AGROSAINSTEK**Jurnal Ilmu dan Teknologi Pertanian**Website jurnal : <http://agrosainstek.ubb.ac.id>**Review Article****Potensi Pemanfaatan Teknik Molekuler Berbasis DNA dalam Penelitian Penyakit Bulai pada Jagung*****The Potential Use of DNA Based Molecular Techniques in The Study of Maize Downy Mildew*****Septian Hary Kalqutny^{1*}, Syahrir Pakki¹, Amran Muis¹**¹ Balai Penelitian Tanaman Serealia. Jalan Dr. Ratulangi No. 274, Maros, 90514

Diterima: 10 Januari 2020/Disetujui: 11 Maret 2020

ABSTRACT

Downy mildew is one of the major diseases in maize that may decrease maize production in Indonesia. Downy mildew in maize is caused by *Peronosclerospora* spp. that are obligate parasites that cannot be grown in a synthetic growth medium. Efforts to control the disease by using resistant maize varieties and fungicides often did not give the expected results, this might be due to the variations of the pathogen that have diverse nature and responses. Identification and the understanding of the biodiversity of downy mildew are major key aspects in efforts to control the disease. The Identification of species morphologically is often difficult due to the limited distinguishing characteristics and close similarities between them. Molecular biology methods are now starting to be widely used, because they can provide information about the diversity of an organism genetically quickly and accurately. Therefore molecular biology methods can be used to support the morphological observations. The use of molecular markers such as RAPD, RFLP, AFLP and SSR as well as direct sequencing of specific DNA regions (rDNA, ITS region of rDNA and mtDNA) can represent the diversity of downy mildew. In Indonesia, generally there are three main species that cause downy mildew in maize i.e, *P. philippinensis*, *P. maydis* and *P. sorghi*. In the future, the use of new molecular biology techniques may provide more information faster and accurately that may be able to open more possibilities for disease control efforts.

Keywords: DNA microarray; Isothermal amplification; Disease control; Taxonomy.**ABSTRAK**

Penyakit bulai merupakan salah satu penyakit utama yang menyerang tanaman jagung yang dapat menurunkan produksi jagung di Indonesia. Penyakit bulai pada jagung disebabkan oleh *Peronosclerospora* spp. yang bersifat parasit obligat sehingga tidak dapat ditumbuhkan di media kultur sintetik. Upaya pengendalian penyakit dengan penggunaan varietas jagung yang tahan penyakit bulai dan penggunaan fungisida seringkali tidak memberikan hasil yang diharapkan, karena patogen penyebab penyakit bulai yang beragam jenisnya sehingga memberikan respon yang berbeda pula. Identifikasi dan pemahaman tentang biodiversitas patogen penyebab penyakit bulai sangat penting dalam upaya pengendalian penyakit bulai. Identifikasi spesies secara morfologis terkadang sulit dilakukan karena karakter pembeda yang terbatas dan mirip. Metode biologi molekuler saat ini mulai secara luas digunakan, karena dapat memberikan informasi keragaman dari suatu organisme secara genetik secara cepat dan akurat. Oleh karena itu metode biologi molekuler dapat digunakan untuk mendukung hasil pengamatan secara morfologis. Penggunaan marka molekuler seperti RAPD, RFLP, AFLP dan SSR serta sekuensing region DNA tertentu (rDNA, region ITS rDNA dan mtDNA) secara langsung dapat menggambarkan keanekaragaman patogen penyakit bulai. Di Indonesia terdapat tiga spesies utama penyebab bulai yaitu *P. philippinensis*, *P. maydis* dan *P. sorghi*. Kedepan penggunaan teknik-teknik biologi molekuler baru dapat memberikan informasi yang lebih banyak, cepat, dan akurat akan dapat membuka lebih banyak kemungkinan bagi upaya pengendalian penyakit ini.

Kata kunci: DNA microarray; Isothermal amplification; Pengendalian penyakit; Taksonomi.

*Korespondensi Penulis.

E-mail : septianharykalqutny@gmail.com (S.H. Kalqutny)DOI: <https://doi.org/10.33019/agrosainstek.v4i1.107>

1. Pendahuluan

Penyakit bulai adalah salah satu penyakit utama pada tanaman jagung yang dapat produksi jagung dunia termasuk Indonesia. Penyakit bulai pada jagung disebabkan oleh *Peronosclerospora* spp. dan apabila menginfeksi tanaman pada saat awal petumbuhan bisa menyebabkan penurunan hasil hingga 100% (Lukman *et al.* 2013, Surtikanti 2013). Patogen penyebab bulai bersifat parasit obligat yang mengekstrak nutrisi dari sel hidup tanaman inang dengan menggunakan struktur khusus (haustoria) yang terbentuk pada sel tanaman. Haustoria menginvasi membran sel inang dan berkembang tanpa berasosiasi langsung dengan sitoplasma sel yang diserang. Masing-masing haustoria berhubungan dengan jaringan miselia melalui celah sempit di pori dinding sel yang dibuat oleh patogen. Jaringan miselia pada penyakit bulai berkembang secara internal diantara sel tanaman (Lawrence *et al.* 1994).

Fase inkubasi dari mulai infiltrasi hingga munculnya gejala awal penyakit bulai berkisar 11 hingga 14 hari. Penyakit bulai terutama menginfeksi inang pada saat awal pertumbuhan hingga umur tanaman 45 hari (Lukman *et al.* 2013, Pakki 2014). Salah satu cara untuk mengendalikan penyakit ini adalah dengan penggunaan varietas jagung yang tahan terhadap penyakit bulai, akan tetapi hal ini sering mengalami hambatan karena perakitan varietas tahan membutuhkan waktu yang lama. Penanaman suatu varietas tahan penyakit bulai secara terus menerus juga tidak dianjurkan karena dapat mendorong berkembangnya ras-ras baru akibat tekanan seleksi sehingga varietas yang awalnya tahan akan menjadi rentan (Pakki 2014). Pakki (2017) melaporkan beberapa varietas jagung seperti Bima-5, HJ 21 Agritan, Bima-14 Batara, dan Bisi-19 sebelumnya memiliki ketahanan yang tinggi terhadap *P. maydis*, namun setelah ditanam selama beberapa waktu mengalami penurunan daya tahan terhadap penyakit bulai.

Upaya lainnya adalah dengan penggunaan fungisida berbahan aktif metalakasil, akan tetapi pada beberapa wilayah tidak memberikan hasil yang diharapkan. Penurunan keefektifan metalakasil dilaporkan terjadi di beberapa daerah di Indonesia, seperti di Jawa Barat (Widiantini *et al.* 2017) dan di Jawa Tengah (Anugrah & Widiantini 2018). Hal ini terjadi akibat munculnya ras-ras baru yang lebih resisten terhadap fungisida. Kemunculan resistensi pada patogen diawali dengan munculnya ras resisten dengan jumlah yang sangat sedikit akibat adanya mutasi, pemberian tekanan terhadap patogen seperti fungisida menyebabkan ras resisten menjadi lebih diuntungkan daripada ras

sensitif. Hal ini mengakibatkan ras resisten dalam suatu populasi patogen menjadi semakin meningkat dan menjadi dominan sehingga fungisida tertentu tidak lagi efektif mengendalikan penyakit (Hobbelen *et al.* 2014).

Perbedaan jenis patogen penyebab penyakit bulai dapat memberikan resistensi dan virulensi yang berbeda. Burhanuddin (2015) dan Pakki & Adriani (2015) melaporkan adanya perbedaan resistensi terhadap fungisida, diketahui bahwa *P. maydis* lebih resisten terhadap fungisida berbahan aktif metalakasil dibandingkan dengan *P. philippinensis*. Beberapa varietas tahan penyakit bulai juga mengalami penurunan ketahanan terhadap *P. maydis* (Pakki & Adriani 2015). Hal ini menunjukkan bahwa strategi pengendalian penyakit bulai harus berdasarkan pada spesies penyebab. Hasil-hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa diperlukan pemahaman tentang keanekaragaman spesies patogen penyebab penyakit bulai, agar strategi yang tepat dapat dilakukan dalam upaya pengendalian penyakit bulai.

Salah satu upaya untuk pengendalian penyakit bulai dapat dilakukan dengan merakit varietas-varietas baru tahan dengan mengintroduksi gen ketahanan kepada galur-galur jagung yang telah memiliki sifat-sifat unggul lain melalui program pemuliaan (Muis 2015). Selama ini perakitan varietas baru banyak dilakukan dengan teknik pemuliaan konvensional yang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk dilakukan jika dibandingkan dengan teknik molekuler (Haque *et al.* 2018). Kegiatan pemuliaan dengan menggunakan teknologi marka molekuler dapat mempercepat proses seleksi sehingga berjalan dengan lebih efisien.

Berdasarkan karakter morfologi konidia penyebab penyakit bulai, terdapat tiga spesies yang teridentifikasi di Indonesia, yaitu : *P. maydis*, *P. sorghii*, dan *P. philippinensis*. (Hikmawati *et al.* 2011; Widiantini *et al.* 2015). Telle *et al.* (2011) menyatakan identifikasi spesies dari penyakit bulai secara morfologi memiliki kelemahan karena hanya sedikit karakter morfologi yang yang dapat dijadikan karakter pembeda. Selain itu karakter seperti dimensi konidia yang selama ini dijadikan salah satu karakter pembeda utama pada *Peronosclerospora* spp. sangat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti kondisi cuaca dan inang. Saat ini metode menggunakan pendekatan secara biologi molekuler mulai secara luas digunakan, karena dapat memberikan informasi mengenai keragaman dari suatu organisme secara genetik dengan cepat dan akurat.

Informasi keragaman genetik patogen penyebab penyakit bulai bisa membantu memecahkan masalah dalam identifikasi spesies *Peronosclerospora* spp. Selain itu juga pendekatan secara biomolekuler dapat memudahkan dalam penemuan varietas tahan terhadap penyakit bulai yang dapat dimanfaatkan untuk upaya pengendaliannya.

Artikel ini menguraikan hasil-hasil penelitian penyakit bulai pada jagung yang memanfaatkan metode biomolekuler berbasis *Deoxyribonucleic acid* (DNA) serta potensi penggunaan teknologi biomolekuler terbaru untuk diaplikasikan pada penelitian penyakit ini. Informasi yang disajikan diharapkan dapat menambah pemahaman mengenai manfaat dan potensi metode biomolekuler berbasis DNA pada pengelolaan penyakit bulai sehingga dapat membantu dalam upaya pengendalian penyakit bulai.

2. Fisiologi dan Taksonomi Penyakit Bulai

Penyakit Bulai (*Downy Mildew*) merupakan patogen yang banyak menyerang kelompok Angiospermae. Hingga saat ini belum ditemukan adanya serangan terhadap kelompok tanaman berpembuluh (Trachaeophyta) lain selain kelompok *angiospermae*, beberapa penyakit bulai biasanya terbatas hanya pada bagian korteks batang dan mesofil daun. Serangan patogen dari famili Peronosporaceae dapat bersifat sistemik, dimana miselium menyebar di seluruh jaringan tanaman inang.

Sifat *Peronosclerospora* spp. patogen adalah parasit obligat (membutuhkan keadaan inang dalam kondisi hidup) sehingga patogen penyebab penyakit bulai sangat bergantung pada inangnya. *Peronosclerospora* spp. membutuhkan adanya kelembaban mikro untuk berkecambah dan menginfeksi. Kelembaban yang tinggi atau lebih dari 80% dan temperatur sekitar 25-30°C (Rustiani *et al.* 2015a) serta curah hujan yang rendah umumnya mendukung perkembangan penyakit ini. Penyakit bulai menginfeksi tanaman setelah konidia berkecambah dalam tetesan embun pada pangkal daun tanaman jagung (Pakki & Burhanuddin 2013; Pakki 2014).

Penyakit bulai *Peronosclerospora* spp. merupakan anggota dari golongan Oomycetes (Telle *et al.* 2011) yang merupakan kelompok takson yang umum ditemukan di lingkungan daratan dan perairan baik patogen maupun

organisme saprofit (Judelson 2012). Oomycetes bukan termasuk dalam kingdom fungi walaupun mempunyai kemiripan dengan kapang secara morfologi, fisiologi, dan ekologi, sehingga sering dianggap sebagai anggota dari jamur sejati. Data filogenetik ultrastruktural, biokimia, dan molekuler memastikan bahwa oomycetes tidak berkerabat secara langsung dengan jamur sejati (kingdom fungi), tetapi masuk ke dalam kingdom Chromista (Voglmayr 2008).

Perkembangan teknik-teknik penelitian baru dan semakin bertambahnya karakteristik yang dapat diamati secara lebih objektif, serta dengan adanya analisis filogenetik dengan menggunakan urutan basa DNA, menyebabkan klasifikasi sedikit banyak mengalami beberapa kali perubahan (Voglmayr 2008). Taksonomi patogen penyebab penyakit bulai berdasarkan Kirk (2018) adalah termasuk dalam kingdom Chromista, filum Stramenopiles, kelas Oomycetes, ordo Peronosporales, famili Peronosporaceae, dan genus *Peronosclerospora*.

3. Pemanfaatan Metode Molekuler untuk Penyakit Bulai

Selama ini identifikasi spesies penyebab penyakit bulai di Indonesia umumnya dilakukan berdasarkan hasil pengamatan morfologi secara mikroskopis, hal ini disebabkan karena tidak dapat dibedakan dari gejala yang ditimbulkan pada tanaman (Gambar 1). Gejala penyakit yang disebabkan oleh spesies-spesies *Peronosclerospora* spp. sulit dibedakan satu sama lain.

Pengamatan morfologi dilakukan dengan mengamati bentuk dan ukuran konidia dan konidiofor. Pengamatan morfologi memiliki kelemahan karena terdapat morfologi konidia dan konidiofor yang mempunyai kesamaan/kemiripan diantara spesies penyebab bulai dan hanya ada sedikit karakter pembeda yaitu dari karakter morfologi konidia dan konidiofor (Rustiani *et al.* 2015b). Oleh karena itu metode biologi molekuler dapat membantu untuk mendukung hasil pengamatan secara morfologi.

Pengamatan mikroskopik *Peronosclerospora maydis* menunjukkan bahwa patogen ini memiliki konidia berbentuk oval, *Peronosclerospora philippinensis* dengan bentuk konidia lonjong, serta *Peronosclerospora sorghii* yang memiliki bentuk konidia bulat (Gambar 2) (Rustiani *et al.* 2015b).

Gambar 1. Gejala pada tanaman yang terinfeksi tiga spesies penyebab penyakit bulai, *P. Maydis* (A) *P. Sorghi* (B) dan *P. philippinensis* (C) menunjukkan gejala yang mirip (Muis *et al.* 2016).

Gambar 2. Penampakan morfologi konidia patogen penyebab bulai; *P. sorghi* (A), *P. maydis* (B), *P. philippinensis* (C) (Rustiani *et al.* 2015b).

Penampakan karakter morfologi patogen penyebab penyakit bulai terkadang tidak menunjukkan hubungan dengan materi genetik yang terkandung. Hal ini disebabkan karena ekspresi gen dipengaruhi oleh faktor lingkungan (epigenetik) (Gijzen *et al.* 2014). Identifikasi spesies yang berbasis analisis DNA, didasari dari asumsi bahwa tiap individual dari suatu spesies membawa urutan basa DNA spesifik yang berbeda dengan individu dari spesies yang lain. Molekul DNA memiliki beberapa kelebihan yang menjadikannya sebagai alat yang sangat berguna untuk identifikasi spesies penyebab patogen. Hal ini disebabkan karena DNA merupakan molekul yang stabil dan dapat bertahan lama, DNA dapat ditemukan pada semua sel biologis yang bernukleat atau yang tidak bernukleat tetapi memiliki plastid atau mitokondria. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) dapat memberikan informasi yang lebih banyak

dibanding protein dikarenakan adanya degenerasi kode genetik (urutan basa nukleotida yang berbeda bisa menghasilkan polipeptida yang sama) dan adanya untaian *non coding* (Pereira *et al.* 2008).

Penggunaan Marka Molekuler

Metode biomolekuler dengan marka molekuler seperti *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dengan enzim restriksi seperti HhaI, EcoRI dan MspI (Mathiyazhagan *et al.* 2008), dan *Simple Sequence Repeats* (SSR) banyak digunakan untuk mempelajari keragaman genetik mikroorganisme. Lukman *et al.* (2013) melakukan analisis keragaman genetik dengan menggunakan dua macam sistem marka molekuler yaitu SSR dan *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ARDRA) terhadap 31 isolat patogen penyebab bulai yang dikoleksi dari berbagai sentra produksi

jagung di Indonesia. Kedua teknik marka molekuler yang dilakukan mengelompokkan isolat-isolat tersebut menjadi tiga kluster dengan kemiripan genetik sebesar 66-98% untuk marka SSR dan 58-100% untuk marka ARDRA (64-98% dikombinasikan). Data tersebut menunjukkan adanya keragaman genetik yang cukup tinggi diantara isolat-isolat patogen penyebab penyakit bulai di Indonesia. Hasil studi yang dilakukan mengelompokkan spesies penyebab penyakit bulai dari beberapa tempat di Indonesia menjadi tiga kluster, dua kluster Jawa dan satu kluster Gorontalo-Lampung (Gambar 3). Marka ARDRA sendiri sudah banyak digunakan untuk mengidentifikasi keragaman mikroorganisme (Yang *et al.* 2008).

Muis *et al.* (2013) melaporkan dari hasil analisis keragaman genetik dengan menggunakan marka molekuler SSR terhadap 61 isolat patogen penyebab penyakit bulai yang didapat dari berbagai wilayah pertanian jagung di Indonesia, terdapat variabilitas genetik yang cukup tinggi (tingkat polimorfisme 0,63) pada *Peronosclerospora* spp (Gambar 4). Hal menunjukkan jumlah spesies *Peronosclerospora* spp. yang terdapat di Indonesia lebih dari satu, dari 67 isolat yang diuji dapat dikelompokkan ke dalam tiga kluster yang berbeda berdasarkan koefisien kemiripan genetik >0,65.

Dari hasil yang didapatkan, pada satu lokasi geografis yang sama bisa terdapat lebih dari satu spesies *Peronosclerospora* spp., diindikasikan dengan pada tiap kluster terdapat isolat-isolat yang

berasal dari wilayah atau region yang berbeda. Hasil tersebut memiliki kesesuaian dengan hasil penelitian lain dimana ditemukan tiga kluster penyakit bulai di Indonesia (Lukman *et al.* 2013).

Gambar 3. Pengelompokan 31 isolat patogen penyebab bulai dari berbagai lokasi di Indonesia berdasarkan marka molekuler SSR dan ARDRA (Lukman *et al.* 2013).

Gambar 4. Pengelompokan 67 isolat patogen penyebab bulai dari tujuh provinsi di Indonesia berdasarkan marka molekuler SSR (Muis *et al.* 2013).

Analisis dengan marka molekuler SSR menunjukkan bahwa spesies *P. philippinensis* hanya ditemukan persebarannya di pulau Sulawesi saja, sementara kedua spesies lain yaitu *P. Maydis* dan *P. Sorghii* ditemukan persebarannya di beberapa pulau di Indonesia (Muis *et al.* 2016). Keragaman genetik pada patogen penyebab penyakit bulai yang ditemukan dari hasil-hasil penelitian diatas dapat menjelaskan terjadinya penurunan ketahanan tanaman tahan penyakit bulai terhadap serangan penyakit bulai.

Analisis keragaman genetik *P. sorghi* dengan menggunakan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) yang dilakukan oleh Perumal *et al.* (2006) menunjukan tingkat polimorfisme AFLP sebesar 25%. Tingkat polimorfisme AFLP yang mirip dengan *Sclerospora graminicola* yang merupakan mikroorganisme heterotalus mengindikasikan bahwa *P. sorghi* juga heterotalus, dimana umumnya organisme dengan reproduksi seksual dicirikan dengan tingkat variasi yang tinggi, sebaliknya reproduksi aseksual akan menghasilkan variasi yang rendah (Perumal *et al.* 2006). Hal ini menunjukkan informasi keragaman genetik yang didapat melalui pemanfaatan metode biomolekuler juga bisa digunakan untuk menjelaskan karakteristik fisiologi dari *Peronosclerospora* spp. dengan membandingkannya dengan organisme lain.

Metode biomolekuler juga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan patogen penyebab penyakit bulai pada bagian tanaman selain daun contohnya pada biji jagung seperti yang dilakukan oleh Lukman *et al.* (2016) dengan menggunakan marka mikrosatelit. Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa dari semua biji yang dikoleksi dari tanaman yang sakit, seluruhnya positif membawa alel patogen penyebab bulai, sementara dari tanaman yang sehat juga beberapa sampel positif membawa alel patogen penyebab bulai. Penelitian lain juga menunjukan bahwa biji juga bisa menjadi sumber inokulum penyakit bulai (Sireesha & Velazhahan 2017)

Identifikasi patogen dengan *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) dilakukan dengan menggunakan primer OPB15 (Ladhalakshmi *et al.* 2009). Penyebab penyakit bulai merupakan parasit obligat yang tidak bisa dibiakkan dalam kultur murni, penggunaan metode RFLP dan RAPD sulit untuk dilakukan karena membutuhkan adanya target gen DNA yang murni untuk menghindari terjadinya ko-amplifikasi dengan mikroba lain (Lukman *et al.* 2013). Marka RAPD akan mengamplifikasi region DNA yang tidak diketahui dengan menggunakan primer yang bersifat *arbitrary* (tidak tentu) sehingga sulit

digunakan untuk menganalisis sample yang tidak murni (Badaya, 2016). RFLP yang menggunakan enzim restriksi juga tidak spesifik sehingga sulit digunakan untuk sampel dengan kemurnian rendah.

Penggunaan marka *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR) juga bisa digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisis keragaman genetik, SCAR merupakan fragmen DNA genomik yang bisa didesain berdasarkan fragmen hasil RAPD yang berkaitan dengan karakter atau spesies tertentu (Yang *et al.* 2013). Hasil RAPD yang teramplifikasi diklon dan disekuensing, kemudian hasil urutan basa digunakan untuk mendesain primer SCAR. Marka SCAR mampu mendeteksi *P. sorghi* pada jagung secara spesifik dan cepat, dengan batas sensitifitas 5 ng (nanogram) menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) konvensional, dan 32 fg (femtogram) dengan menggunakan *real-time* PCR (Sireesha dan Velazhahan 2017). Marka SCAR yang didesain oleh (Ladhalakshmi *et al.* 2009) juga diketahui memiliki tingkat spesifisitas yang tinggi.

Upaya pengendalian penyakit bulai dapat dilakukan dengan melakukan perakitan varietas-varietas tahan dengan memasukkan gen ketahanan kepada galur-galur jagung yang telah memiliki sifat-sifat unggul lain melalui pemuliaan (Muis 2015). Kegiatan pemuliaan dapat dibantu dengan menggunakan teknologi marka molekuler sehingga proses seleksi dapat berjalan dengan lebih efisien.

Selama ini perakitan varietas baru dengan sifat tertentu yang diinginkan misalnya ketahanan terhadap penyakit, dilakukan dengan teknik pemuliaan secara konvensional yang membutuhkan waktu yang lebih lama untuk dilakukan jika dibandingkan dengan teknik pemuliaan dengan memanfaatkan bantuan teknik biomolekuler (Haque *et al.* 2018).

Muis *et al.* (2015) menggunakan marka molekuler SSR untuk menganalisis homozigositas dan keanekaragaman genetik 30 galur S3 yang tahan terhadap penyakit bulai sebagai informasi untuk mempermudah proses perakitan jagung hibrida. Proses pemuliaan konvensional untuk memastikan tingkat homozigositas lebih dari 80% membutuhkan waktu selama beberapa generasi tanaman, akan tetapi proses tersebut bisa menjadi lebih singkat jika menggunakan bantuan marka molekuler. Pemuliaan dengan menggunakan bantuan marka molekuler dapat meningkatkan kecepatan dan efisiensi proses pemuliaan (Platten *et al.* 2019).

Penggunaan marka molekuler yang memiliki keterpautan dan asosiasi yang kuat dengan gen ketahanan dapat digunakan untuk meningkatkan

efisiensi seleksi dan mempercepat introgesi gen tahan penyakit bulai (Pabendon *et al.* 2007). Penentuan lokus kandidat gen-gen yang berhubungan dengan sifat ketahanan penyakit bulai dikonfirmasi dengan menggunakan marka molekuler yang terpaut dengan gen tersebut, munculnya pita PCR pada tanaman yang diketahui tahan dan sebaliknya tidak munculnya pita PCR pada tanaman yang diketahui rentan (Kim *et al.* 2017).

Metode sekuensing secara langsung

Penelitian yang berbasis sekuensing DNA secara langsung dengan menggunakan primer spesifik juga mulai banyak dilakukan. Gen target akan diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik, dimana gen target akan dapat diisolasi dan disekuensing lebih lanjut, hal ini memungkinkan mikroorganisme yang tidak dapat dikultur untuk dapat dianalisis. Pendekatan ini memungkinkan banyak spesies-spesies baru yang telah teridentifikasi, akan tetapi penggunaannya pada eukariota masih terbatas (O'Brien *et al.* 2005). Identifikasi dan analisis keragaman dilakukan dengan cara membandingkan urutan basa dari suatu region DNA yang ada pada sampel target dengan database yang sudah ada sebelumnya

Penggunaan urutan basa gen *Small Sub Unit ribosomal Ribonucleic Acid* (SSU rRNA) sangat efektif untuk mengidentifikasi prokariota, akan tetapi pada eukariota seperti penyebab penyakit bulai, perubahan yang terjadi pada region gen ini berkembang relatif lambat dibandingkan dengan region *Internal Transcribed Spacer* (ITS) yang berkembang dengan tingkat yang lebih cepat sehingga dapat digunakan untuk identifikasi hingga tingkat spesies (O'Brien *et al.* 2005). Region ITS telah banyak digunakan oleh para ahli mikologi dalam identifikasi kelompok Oomycetes (Schoch *et al.* 2012). Akan tetapi, gen mitokondrial (seperti *cox*) lebih memiliki variasi sehingga lebih spesifik dibandingkan region ITS yang terkadang masih kesulitan membedakan antar spesies yang berkerabat dekat. Gen *cox2* sudah digunakan untuk menganalisis keanekaragaman beberapa Oomycetes termasuk *Peronosclerospora* spp. (Telle *et al.* 2011). Penggunaan gen rDNA, region ITS, dan gen mitokondrial memiliki kelebihan karena sensitifitasnya yang tinggi karena jumlah *copy number* gen yang tinggi dalam satu sel, akan tetapi jika digunakan untuk mengkuantifikasi jumlah mikroba pada suatu sampel, metode ini kurang efektif dikarenakan jumlah *copy number* yang bervariasi antar isolat dalam satu spesies (Crandall *et al.* 2018).

Rustiani *et al.* (2015b) menggunakan primer yang mengamplifikasi gen penyandi *cytochrome oxidase 1*, *cytochrome oxidase 2*, dan region ITS menemukan 3 jenis *Peronosclerospora* yang berhasil diidentifikasi dengan membandingkan urutan basa yang didapat dengan urutan basa pada database yang sudah dideposit sebelumnya. Gorayeb *et al.* (2019) juga berhasil melakukan mendeteksi untuk pertama kalinya penyebab bulai pada tanaman miana (*Plectranthus spp.*) yaitu patogen *Peronospora belbahrii* dengan memanfaatkan region ITS. Keragaman region ITS dari *Peronosclerospora sp* juga dapat dianalisis dengan memanfaatkan metode RFLP pada region ITS yang sudah diamplifikasi dengan menggunakan primer spesifik (Mathiyazhagan *et al.* 2008).

Kekurangan utama dari pendekatan sekuensing DNA secara langsung adalah untuk memberikan cukup informasi sebagai pembeda takson region DNA yang disekuensing harus besar umumnya lebih dari 300 bp (*base pair*). Amplifikasi PCR untuk region DNA sebesar itu umumnya sulit untuk dilakukan untuk sampel dengan kualitas dan kuantitas yang rendah (Pereira *et al.* 2008).

4. Potensi Pengembangan Metode Molekuler pada Penyakit Bulai

Patogen-patogen seperti penyakit bulai yang beberapa memiliki kekerabatan dekat, walaupun memiliki kenampakan fenotip yang unik satu dengan yang lain seringkali perbedaan genetik diantaranya hanya pada beberapa basa nukleotida. Oleh karena itu kedepan, deteksi terhadap adanya *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) tersebut harus dilakukan untuk membedakan patogen-patogen berkerabat dekat tersebut.

Penggunaan metode *multiplex assay* seperti DNA *microarray hybridization* dapat dilakukan untuk menskrining sampel untuk mendeteksi adanya *species-specific* SNP. DNA *microarray* menggunakan detektor oligonukleotida yang merupakan fragmen DNA spesifik yang telah diketahui urutan basanya yang diimobilisasi pada suatu slide atau membran dan disusun secara berpola (Pereira *et al.* 2008). Kemudian probe DNA tersebut akan berinteraksi dengan DNA sampel yang komplementer dan sudah dilabeli (Karakach *et al.* 2010) (Gambar 5). Kemudian adanya hibridisasi akan dideteksi dengan melihat visualisasi pada titik-titik yang menunjukkan hibridisasi positif atau negatif. Selain itu dengan DNA *microarray* dimungkinkan untuk menganalisis ekspresi gen yang dihasilkan pada suatu organisme, dengan mengetahui pola ekspresi gen dari inang dan patogen (Jongman *et al.* 2020) Sehingga dapat membantu dalam memahami

bagaimana respon adaptasi mikroorganisme terhadap inang dan lingkungannya, serta metabolisme dan jalur-jalur biosintesis yang berperan dalam patogenisitas Analisis ekspresi gen

dilakukan dengan menggunakan mRNA yang terlebih dahulu dibuat menjadi cDNA menggunakan enzim *reverse transcriptase*, hal ini untuk mengatasi masalah mRNA yang mudah terdegradasi.

Gambar 5. Ilustrasi metode *microarray* untuk menganalisis ekspresi gen (a) mRNA dari sel target di *reverse transcribed* menjadi cDNA yang kemudian dlabeli dengan dua label berbeda (Cy3 dan Cy5) (b) Visualisasi hasil cDNA *microarray* (Karakach *et al.* 2010).

Perkembangan teknologi membuka banyak peluang untuk pengembangan alat atau kit diagnostik *portable* berbasis analisis DNA untuk identifikasi spesies patogen penyebab penyakit bulai secara cepat di lapangan tanpa harus dilakukan di laboratorium yang terkadang jauh dari lokasi sumber penyakit. Salah satu hal yang dibutuhkan dalam analisis DNA adalah amplifikasi DNA menggunakan PCR yang membutuhkan alat *thermocycler* dimana umumnya hanya tersedia di laboratorium, sehingga identifikasi secara cepat di lapangan tidak bisa dilakukan. Akan tetapi, pengembangan metode *isothermal amplification* yang meniru replikasi DNA yang terjadi secara *in vivo* memungkinkan amplifikasi DNA tanpa perlu alat *thermocycler*. Penemuan protein-protein yang berperan penting dalam membantu enzim DNA polymerase dalam mereplikasi DNA memungkinkan perkembangan teknologi tersebut terjadi (Gill 2008). Akan tetapi, pengembangan dalam hal sensitivitas masih perlu dilakukan agar dapat setara atau melebihi metode PCR konvensional.

Beberapa metode amplifikasi secara isothermal yang ada antara lain *transcription mediated amplification* (TMA)/*nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA), *signal mediated amplification of RNA technology* (SMART), *strand*

displacement amplification (SDA), *rolling circle amplification* (RCA), *loop-mediated isothermal amplification of DNA* (LAMP), *isothermal multiple displacement amplification* (IMDA), *helicase-dependent amplification* (HDA), *single primer isothermal amplification* (SPIA), dan *circular helicase-dependent amplification* (cHDA) (Gill 2008). Selain itu, saat ini teknologi *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat/Cas9* (CRISPR/Cas9) mulai populer digunakan untuk mengintroduksi sifat yang diinginkan pada tanaman. Teknologi CRISPR/Cas9 digunakan untuk meningkatkan kualitas tanaman melalui mekanisme editing gen. Teknologi editing gen dengan memanfaatkan teknik CRISPR/Cas9 dapat digunakan untuk mengembangkan ketahanan terhadap penyakit pada tanaman melalui penambahan gen tahan (R) maupun dengan penghapusan/delesi gen rentan (S) (Haque *et al.* 2018). Selama ini tanaman hasil modifikasi secara transgenik secara konvensional masih diragukan keamanannya, karena berpotensi membawa gen-gen asing yang tidak dikehendaki yang menempel pada lokasi yang acak. Teknologi CRISPR/Cas9 memiliki kelebihan jika dibandingkan dengan metode transgenik konvensional karena hanya memodifikasi gen pada lokasi yang spesifik, sehingga relatif lebih aman (Chen & Gao 2014).

Dengan semakin berkembangnya teknologi penggunaan teknik-teknik biologi molekuler baru dapat memberikan informasi yang lebih banyak, cepat, dan akurat akan dapat membuka lebih banyak kemungkinan bagi upaya pengendalian penyakit ini

5. Kesimpulan

Metode-metode biologi molekuler dapat dimanfaatkan dalam identifikasi dan analisis biodiversitas penyakit bulai, serta dalam perakitan varietas unggul baru yang tahan. Pemanfaatan marka molekuler seperti *Random Amplification of Polymorphic DNA* (RAPD) dengan menggunakan primer OPB15, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) menggunakan region *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dengan enzim restriksi HhaI, EcoRI dan MspI, *Simple Sequence Repeats* (SSR) ataupun sekuensing region DNA secara langsung telah digunakan untuk mengidentifikasi dan menganalisis keragaman genetik dari patogen penyebab penyakit bulai dengan hasil yang lebih cepat dibanding metode konvensional. Di Indonesia secara umum dilaporkan terdapat tiga spesies utama penyebab penyakit bulai yaitu *P. philippinensis*, *P. Maydis* dan *P. Sorghi* yang daerah persebarannya tersebar di beberapa pulau di Indonesia.

Perkembangan teknologi semakin mendorong inovasi-inovasi di bidang biologi molekuler yang potensial untuk diterapkan pada penelitian penyakit bulai kedepan. Teknik-teknik molekuler baru seperti DNA *microarray hybridization*, *isothermal amplification*, dan CRISPR/Cas9 menawarkan banyak keuntungan dan sangat potensial untuk diterapkan dalam upaya pengendalian penyakit bulai.

6. Daftar Pustaka

Anugrah FM, Widiyanti F. 2018. The Effect of Metalaxyl, Fenamidone, and Dimetomorf Fungicide Towards *Conidia peronosclerospora* spp. Isolated from Klaten. *Jurnal Penelitian Saintek* 23(1): 21-31

Badaya VK, Badaya R, Dhoot M, Dhoot R. 2016. Molecular Markers: A Potential Boon for Nutritional Fortification of Plants. *Advances in Life Sciences* 5(22): 10216-10227.

Burhanuddin. 2015. Masalah Penyakit Bulai dan Alternatif Pemecahannya di Kecamatan Pagu Kabupaten Kediri Propinsi Jawa Timur. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia.

Chen K, Gao C. 2014. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep.* 33: 575-583

Crandall SG, Rahman A, Quesada-Ocampo LM, Martin FN, Bilodeau GJ, Miles T D. 2018. Advances in Diagnostics of Downy Mildews: Lessons Learned from Other Oomycetes and Future Challenges. *Plant Disease* 102(2): 265-275.

Gijzen M, Ishmael C, Shrestha SD. 2014. Epigenetic control of effectors in plant pathogens. *Front. Plant Sci.* 5:638. doi: 10.3389/fpls.2014.00638

Gill P, Ghaemi A. 2008. Nucleic Acid Isothermal Amplification Technologies—A Review. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 27:3. 224-243.

Horayeb ES, Pieroni LP, Cruciol GCD, de Pieri C, Dovigo LH, Pavan MA, Kurozawa C, Krause-Sakate R. 2019. First Report of Downy Mildew on *Coleus* (*Plectranthus* spp.) Caused by *Peronospora belbahrii* sensu lato in Brazil Plant Disease 104(1): 294

Haq E, Taniguchi H, Hassan MM, Bhowmik P, Karim MR, Śmiech M, Zhao K, Rahman M, Islam T. 2018. Application of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technology for the Improvement of Crops Cultivated in Tropical Climates: Recent Progress, Prospects, and Challenges. *Front. Plant Sci.* 9:617

Hikmawati, Kuswinanti T, Melina, Pabendon M. 2011. Karakterisasi morfologi *Peronosclerospora* spp., penyebab penyakit bulai pada tanaman jagung dari beberapa daerah di Indonesia. *J. Fitomedika Unhas.* 7(3): 154-161.

Hobbelen PHF, Paveley ND, Van Den Bosch F. 2014. The emergence of resistance to fungicides. *PLoS ONE* 9(3) e91910.

Jongman M, Carmichael PC, Bill M. 2020. Technological Advances in Phytopathogen Detection and Metagenome Profiling Techniques. *Curr Microbiol.* doi:10.1007/s00284-020-01881-z

Judelson HS. 2012. Dynamics and innovations within oomycete genomes: insights into biology, pathology, and evolution. *Eukaryot Cell.* 11(11):1304-1312. doi:10.1128/EC.00155-12

Karakach TK, Flight RM, Douglas SE, Wentzell PD. 2010. An Introduction to DNA Microarrays for Gene Expression Analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 104: 28-52.

Kim JY, Moon C J, Kim HC, Shin S, Song K, Kim KH, Lee B. M. 2017. Identification of downy mildew resistance gene candidates by positional cloning in maize (*Zea mays* subsp. *mays*;

- Poaceae). *Applications in plant sciences* 5(2) : 1600132.
- Kirk PM. 2018. Species Fungorum (version Oct 2017). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2018). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 28th March 2018. Digital resource at www.catalogueoflife.org/col. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.
- Ladhalakshmi D, Vijayasamundeeswari A, Paranidharan V, Samiyappan R, dan Velazhahan R. 2009. "Molecular Identification of Isolates of *Peronosclerospora* Sorghi from Maize Using PCR-Based SCAR Marker." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25 (12): 2129-35.
- Lawrence GJ, Shepherd KW, Mayo GM, Islam MR. 1994. Plant resistance to rusts and mildews: genetic control and possible mechanisms. *Trends in Microbiology*, 2(8):263-270.
- Lukman R, Afifuddin A, Lubberstedt T. 2013. Unraveling the Genetic Diversity of Maize Downy Mildew in Indonesia. *J Plant Pathol Microb* 4:162.
- Lukman R, Afifuddin A, Lübberstedt T 2016. Tracing the signature of *Peronosclerospora maydis* in maize seeds. *Australasian Plant Pathol.* 45: 73.
- Mathiyazhagan S, Karthikeyan M, Sandoskumar R, Velazhahan R. 2008. Analysis of variability among the isolates of *Peronosclerospora sorghi* from sorghum and corn based on restriction fragment length polymorphism of ITS region of ribosomal DNA, *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 41:1, 31-37.
- Muis A, Pabendon MB, Nonci N, Waskito WP. 2013. Keragaman Genetik *Peronosclerospora maydis* Penyebab Bulai pada Jagung Berdasarkan Analisis Marka SSR. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 32(3): 139-147.
- Muis A, Nonci N, Pabendon MB. 2015. Genetic Diversity of S3 Maize Genotypes Resistant to Downy Mildew Based on SSR Markers. *Indonesian Journal of Agricultural Science* 16(2): 79-86
- Muis A, Nonci N, Pabendon MB. 2016. Geographical distribution of *Peronosclerospora* spp. the causal organism of maize downy mildew, in Indonesia. *AAB Bioflux* 8(3):143-155.
- O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. 2005. Fungal communities' analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Environ. Microbiol* 71, 5544-5550.
- Pabendon MB, Azrai M, Kasim M, Wijaya MJ. 2007. Prospek penggunaan markah molekuler dalam program pemuliaan jagung. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia.
- Pakki S, Burhanuddin. 2013. Peranan varietas dan fungisida dalam dinamika penularan patogen obligat parasite dan saprofit pada tanaman jagung. *Prosiding Seminar Nasional Serealia Meningkatkan Peran Penelitian Serealia Menuju Pertanian Bioindustri*. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia.
- Pakki S. 2014. Epidemiology and Strategy for Controlling Downy Mildew Disease Caused by *Peronosclerospora* sp. On Maize. *Indonesian Agricultural Research and Developmental Journal*. 33(2): 47-52.
- Pakki S, Adriani. 2015. Preferensi Ketahanan dan Dinamika Infeksi Penyakit Bulai pada Aksesori Plasma Nutfah Jagung dalam Tiga Musim Tanam. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. Maros: Balai Penelitian Tanaman Serealia.
- Pakki S. 2017. Kelestarian Ketahanan Varietas Unggul Jagung terhadap Penyakit Bulai *Peronosclerospora maydis*. *Jurnal Penelitian Pertanian Tanaman Pangan*. 1(1): 37-44.
- Pereira F, Carneiro J, Amorim A. 2008. Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* 2: 187-199
- Perumal R, Isakeit T, Menz M, No S, Katile EG, Magill CW. 2006. Characterization and genetic distance analysis of isolates of *Peronosclerospora sorghi* using AFLP fingerprinting. *Mycological Research*, 110(4): 471-478
- Platten JD, Cobb JN, Zantua RE. 2019. Criteria for evaluating molecular markers: Comprehensive quality metrics to improve marker-assisted selection. *PLoS ONE* 14(1)
- Rustiani US, Sinaga MS, Hidayat SH, Wiyono S. 2015a. Ecological characteristic of *Peronosclerospora maydis* in Java, Indonesia. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 19, 159-67.
- Rustiani US, Sinaga MS, Hidayat SH, Wiyono S. 2015b. Tiga Spesies *Peronosclerospora* Penyebab Penyakit Bulai Jagung di Indonesia. *Jurnal Berita Biologi*. 14(1): 29-37.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci*. 109(16): 6241
- Sireesha Y, Velazhahan R. 2017. Rapid and specific detection of *Peronosclerospora sorghi* in maize

- seeds by conventional and real-time PCR. *Eur J Plant Pathol.* 150(2): 521-526.
- Surtikanti. 2013. Cendawan *Peronosclerospora* sp. Penyebab Penyakit Bulai di Jawa Timur. PROSIDING Seminar Nasional "Peranan dan Aplikasi Teknologi Pertanian Mendukung Ketahanan Pangan Nasional", Banjarbaru 26 - 27 Maret 2013. Hlm 57-67
- Telle S, Shivas RG, Ryley MJ, Thines M. 2011. Molecular phylogenetic analysis of *Peronosclerospora* (Oomycetes) reveals cryptic species and genetically distinct species parasitic to maize. *Eur J Plant Pathol* 130:521–528.
- Voglmayr H. 2008. Progress and challenges in systematics of downy mildews and white blister rusts: new insights from genes and morphology. *Eur J Plant Pathol* 122:3–18.
- Widiantini F, Yuliana E, Purnama T. 2015. Morfological variation of *Perenosclerospora maydis* the causal agent of maize Downy mildew from different location in Jawa Indonesia . *Jurnal of Agricultural Engineering and Biotechnology.* 3(2)23-27.
- Widiantini F, Pitaloka DJ, Nasahi C, Yulia E. 2017. Perkecambahan *Peronosclerospora* spp. Asal Beberapa Daerah di Jawa Barat pada Fungisida Berbahan Aktif Metalaksil, Dimetomorf dan Fenamidon. *Jurnal Agrikultura* 28(2): 95-102
- Yang L, Fu S, Khan MA, Zeng W, Fu J. 2013. Molecular cloning and development of RAPD-SCAR markers for *Dimocarpus longan* variety authentication. *Springerplus* 2:501.
- Yang JH, Liu HX, Zhu GM, Pan YL, Xu LD, Guo JH. 2008. Diversity analysis of antagonists from riceassociated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 104 (1), 91–104.