

# Prevalensi dan Identifikasi Berdasarkan Sekuen ITS Kapang Patogen Batang Tanaman Apel Var. Anna (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) di Kota Batu

Ilham Rizqy Isnain<sup>1)\*</sup>, Suharjono<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang

Alamat Korespondensi : Ilham Rizqy Isnain [kikv.isnain@gmail.com](mailto:kikv.isnain@gmail.com)

## ABSTRAK

Penurunan jumlah pohon apel produktif mengakibatkan rendahnya daya saing apel di dalam negeri. Berkurangnya jumlah tanaman apel produktif salah satunya disebabkan oleh kapang patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi spesies kapang patogen yang menyerang batang tanaman apel berdasarkan sekuen ITS. Sampel diambil dari perkebunan Gabes, Dusun Junggo, Desa Tulungrejo Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Kapang diisolasi dari lima batang bergejala penyakit dan dimurnikan, diuji patogenisitas terhadap bibit tanaman apel, isolasi DNA, dan identifikasi molekular. Berdasarkan hasil penelitian gejala AN3 banyak ditemui pada perkebunan organik dengan prevalensi 59,6, sedangkan gejala AN5 merupakan gejala penyakit yang paling sedikit dengan prevalensi 1,69. Isolat AN5.2 teridentifikasi sebagai *Neofusicoccum parvum* yang menyebabkan penyakit busuk kering dan berakibat kematian pada batang, sedangkan isolat AN3.2 teridentifikasi sebagai *Aureobasidium pullulans*.

**Kata kunci:** *Aureobasidium pullulans*, identifikasi molekular, kapang patogen, *Malus sylvestris* Mill., *Neofusicoccum parvum*

## ABSTRACT

Decreasing number of productive apple trees lead to the low competitiveness of domestic apples. Number of productive apple crop caused by pathogenic fungal. This research aims to identified species of pathogens with symptoms disease that are found apple plantation base on ITS sequens. Sampels was taken from organic plantation located on Gabes, Junggo, Tulungrejo Village, Bumiaji District, Batu City. Samples taken from stem having symptoms of illness. Pathogenic fungal isolated to patogenicity test against apple plant seed, DNA isolation, then molecular identification. Based on result, AN3 mostly symptoms found of both with the prevalency of 59.6, while AN5 the least symptoms amount found with the prevalency 1.69. AN5.2 identified as *Neofusicoccum parvum* that causes dry rot and lead to death in the trunk, while AN3.2 were identified as *Aureobasidium pullulans*.

**Keyword:** *Aureobasidium pullulans*, *Malus sylvestris* Mill., molecular identification, *Neofusicoccum parvum*, pathogenic fungal

## PENDAHULUAN

Apel merupakan salah satu buah yang mudah terserang oleh hama dan penyakit diantaranya kapang, bakteri, virus, mikoplasma, dan nematoda, serta beberapa disebabkan oleh patogen yang belum diketahui. Kerusakan yang disebabkan oleh patogen menyebabkan penurunan hasil produksi di perkebunan. Kerugian yang disebabkan oleh patogen sangat bervariasi, bergantung pada kemampuan patogen dalam menyerang tanaman. [1]

Usaha budidaya tanaman seringkali mendapat hambatan dari organisme pengganggu tanaman (OPT). Organisme pengganggu tanaman dapat merusak,

mengganggu kehidupan, atau menyebabkan kematian pada tumbuhan. Salah satu organisme pengganggu tanaman adalah kapang. Kapang patogen merupakan masalah utama pada perkebunan yang menyebabkan penurunan produksi dan menyebabkan kerusakan pada jaringan tanaman. Terdapat 70 penyakit tanaman yang disebabkan oleh kapang patogen yang diantaranya menyebabkan busuk akar, bintik daun, hawar daun, hawar kuncup, busuk buah, bintik buah, kanker, dan busuk pascapanen [1].

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui prevalensi kapang patogen penyebab penyakit pada batang tanaman apel di Gabes, Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu dan mengidentifikasi

spesies kapang patogen berdasarkan sekuen ITS.

## METODE PENELITIAN

### Waktu dan Tempat Penelitian.

Penelitian dilakukan pada Bulan Februari – Juni 2014. Sampel tanaman apel diambil dari perkebunan Gabes, Dusun Junggo, Desa Tulungrejo, Kecamatan Bumiaji, Kota Batu. Sampel dianalisis di Laboratorium Mikrobiologi, Uji Patogenisitas dilakukan di *Glass House*, Isolasi dan amplifikasi DNA kapang patogen dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler dan Seluler, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya, Malang. Sekuensing DNA kapang patogen dilakukan di First Base, Malaysia.

**Isolasi Kapang Patogen dan Uji Patogenisitas.** Sampel diambil dari batang tanaman apel yang memiliki gejala penyakit. Batang tanaman apel diiris pada bagian antara permukaan jaringan sehat dan yang terserang penyakit dengan luas permukaan 0,25 cm<sup>2</sup> kemudian disterilisasi permukaan menggunakan etanol 70 % dan dibilas aquades. Sampel ditiriskan dan ditanam pada media PDA kemudian diinkubasi selama ±72 jam.

Kultur biakan kapang patogen yang telah murni diinfeksi pada bagian yang telah disayat kemudian dibalut dengan plastik parafilm. Tanaman kontrol ditumbuhkan tanpa diberi perlakuan kapang patogen. Tanaman diamati dan disiram setiap hari [3]. Gejala penyakit yang muncul dibandingkan dengan gejala penyakit yang telah ditemukan pada perkebunan apel, dan kapang yang tumbuh dibandingkan dengan kultur yang telah diisolasi [4].

**Identifikasi Kapang secara Fenotipik dan Molekular.** Kapang diidentifikasi fenotip dengan cara makroskopis dan mikroskopis. Karakterisasi kapang makroskopis dengan mengamati warna, bentuk, permukaan, dan morfologi koloni. Analisis fenetik (kemiripan karakter antar isolat) dilakukan dengan menggunakan NTSYSpc 2.0 (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems) [5].

Isolasi DNA kapang dilakukan menggunakan metode modifikasi Doyle dan Doyle (1987). Sampel DNA diuji kuantitatif menggunakan spektrofotometri dan uji kualitatif menggunakan teknik elektroforesis.

Sampel DNA digunakan untuk cetakan dalam amplifikasi daerah ITS dengan PCR. Komposisi PCR menggunakan primer ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') dan ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') masing-masing konsentrasi 10 pmol, 1 µL DNA, 2 µL ddH<sub>2</sub>O, 5 µL PCR mix (*i-Taq<sup>TM</sup>*) [6]. Amplifikasi daerah ITS dilakukan menggunakan alat PCR *Thermal cycler* dengan program denaturasi awal selama tiga menit pada suhu 95 °C, denaturasi selama setengah menit pada suhu 94 °C, tahap *annealing* selama 20 detik pada suhu 55 °C, dan tahap ekstensi selama 1 menit pada suhu 71 °C sebanyak 35 siklus, kemudian ditambahkan ekstensi akhir pada suhu 72 °C [7]. Hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel agarosa 1,5 %. Purifikasi dan sekvensing ampikon sekuen ITS kapang patogen dilaksanakan di First Base, Malaysia. Sekuen dianalisis secara *online* pada *Genebank* ([www.ncbi.nlm.nih](http://www.ncbi.nlm.nih)) dan program MEGA 5.1.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Hasil Isolasi dan Uji Patogenisitas Kapang Patogen.** Ditemukan lima tipe gejala penyakit yang berbeda pada batang tanaman apel di perkebunan Gabes. Gejala AN3 paling banyak ditemui dengan prevalensi 59,6 % dari 354 pohon yang terdapat di perkebunan. Hal ini menggambarkan bahwa lebih dari setengah perkebunan organik terjangkit penyakit dengan gejala yang sama. Pada kebun anorganik, gejala AN2 paling banyak ditemui dengan prevalensi 8,72 % dari 436 pohon (Tabel 4).

Diperoleh 15 isolat kapang patogen dari perkebunan apel organik dan anorganik Gabes. Sebanyak 45 bibit tanaman apel yang diinfeksi dengan isolat patogen yang telah ditemukan memperlihatkan respon yang berbeda-beda terhadap patogen tersebut. Sebanyak 21 bibit tanaman selain kontrol tidak menunjukkan gejala penyakit (sehat), 19 bibit tanaman menunjukkan gejala penyakit namun tidak sama dengan gejala penyakit yang telah ditemukan sebelumnya, dan 5 bibit tanaman yang telah diinfeksi dari dua isolat berbeda yakni AN3.2 dan AN5.2 menunjukkan gejala yang sama dengan gejala penyakit sebelumnya yang diperoleh dari perkebunan Gabes. Isolat AN3.2 dan AN5.2 merupakan kapang patogen yang keduanya terdapat pada kebun organik dan anorganik.

**Tabel 1.** Prevalensi gejala penyakit batang tanaman apel pada kebun organik dan anorganik

Lokasi Kebun	Jumlah Pohon	Gejala	Jumlah Pohon dengan Gejala Penyakit	Persentase Gejala Penyakit (%)
Organik	354	AN1	9	2,54
		AN3	211	59,60
		AN5	6	1,69
Anorganik	436	AN1	15	3,44
		AN2	38	8,72
		AN3	27	6,19
		AN4	36	8,26
		AN5	11	2,52

**Spesies Kapang Patogen Penyebab Penyakit pada Tanaman Apel.** Hasil analisis sekuen ITS menunjukkan bahwa isolat AN3.2 merupakan *Aureobasidium pullulans* sedangkan isolat AN5.2 merupakan *Neofusicoccum parvum* dengan masing-masing similaritas 100 %. Isolat AN5.2 secara molekular teridentifikasi sebagai *Neofusicoccum parvum* yang juga telah diketahui sebagai patogen yang seringkali menyerang batang tanaman.

*Neofusicoccum parvum* diketahui merupakan patogen pada batang dan dapat menyebabkan kerusakan serius terhadap tanaman [8] [9]. *Aureobasidium pullulans* merupakan kapang patogen pada tanaman apel yang menyebabkan russet (kering kecokelatan) pada buah di beberapa perkebunan New York. *Aureobasidium pullulans* menyebabkan kerusakan pada jaringan buah yakni permukaan buah terlihat melepuh, berkerak, dan pada beberapa bagian buah mengalami keretakan [10].

#### KESIMPULAN

Gejala AN3 banyak ditemui pada perkebunan organik dan anorganik dengan prevalensi 59,6 dan 6,19 % sedangkan gejala AN5 paling sedikit dengan prevalensi 1,69 dan 2,52 %. Isolat AN3.2 dan AN5.2 merupakan kapang patogen yang keduanya terdapat pada kebun organik dan anorganik. Isolat AN3.2 merupakan *Aureobasidium pullulans* sedangkan isolat AN5.2 teridentifikasi *Neofusicoccum parvum*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dosen pembimbing dan penguji atas bimbingan dan saran-saran yang telah diberikan, serta Bapak Arif Budiono selaku pemilik perkebunan apel.

#### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Jonsson , A.H. 2007. **Organic apple production in Sweden: Cultivation and cultivars.** Swedish University of Agricultural Sciences, Balsgard. Thesis.
- [2] Sandskar, B. 2003. **Apple scab (*Venturia inaequalis*) and pests in organic orchards.** Diss. (Samanfatning/summary) Alnarp: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Agria, 1401-6249: 378.
- [3] Agrios, G.N. 2005. **Plant Pathology-Fifth Edition.** Departemen of Plant Pathology. University of Florida. United States of America.
- [4] Burgess L.W., Knight T.E., Tesoriero L. & Phan H.T. 2008. **Diagnostic manual for plant diseases in Vietnam.** ACIAR Monograph No. 129, 210 pp. ACIAR: Canberra.
- [5] Rohlf, F.J. 1998. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide.** Applied Biostatistics Inc.
- [6] White, T. J., T. Bruns., S. Lee., & J.Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. dalam **PCR protocols: a guide to methods and applications.** (Ed). Innis , M. A., D. H. Gelfand., J. J. Sninsky., & T. J. White, Academic Press. San Diego.
- [7] Lestari, F.W. 2012. **Identifikasi filogenetik kapang patogen dari tanaman apel di Kota Batu.** Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Brawijaya: Malang. Skripsi.
- [8] Úrbez-Torres J.R. 2006. **Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine**

- cankers in California.** *Plant Disease* 90: 1503–1490.
- [9] Úrbez-Torres J.R. 2011. **The status of *Botryosphaeriaceae* species infecting grapevines.** *Phytopathologia Mediterranea* 50: S5–S45.
- [10] Goffinet M.C., Burr T.J., & Heidenreich M.C. 2002. **Anatomy of apple russet caused by the fungus *Aurobasidium pullulans*.** Department of Horticultural Sciences and Department of Plant Pathology. Agricultural Experiment Station, Cornell University, Geneva, New York.