

## DETEKSI DAN IDENTIFIKASI *Austropuccinia psidii* PADA MYRTACEAE DI YOGYAKARTA INDONESIA

*Detection and identification of Austropuccinia psidii on Myrtaceae in Yogyakarta Indonesia*

Istiana Prihatini<sup>1</sup>, ILG. Nurtjahjaningsih<sup>1</sup>, Farah Aulya Faradilla<sup>2</sup> dan Suranto<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Kontributor Utama, <sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan

Jl. Palagan Tentara Pelajar KM 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia

email penulis korespondensi : istiana.prihatini@yahoo.co.id

<sup>2</sup>Universitas Sebelas Maret Surakarta

Jl. Ir. Sutami No.36A, Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia

Tanggal diterima: 16 Desember 2020, Tanggal direvisi: 18 Desember 2020, Disetujui terbit: 24 Desember 2020

### ABSTRACT

*Austropuccinia psidii* is a pathogenic fungus that causes rust in the Myrtaceae plant. The extensive plantation of the host of this fungus has increased the attack of fungal pathogen, therefore, it will increase the threat to the presence of Myrtaceae species around the globe including in Indonesia. This present study aimed to detect and identify the presence of this pathogen by morphological and molecular observation. Morphological observation revealed the presence of teliospores on young *Syzygium* leaves and the presence of *A. psidii* urediniospores on salam (*Syzygium polyanthum*) and kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) leaves collected from the arboretum of the Center for Forest Biotechnology and Tree Improvement (CFBTI) in Yogyakarta, Indonesia. PCR amplification using specific primers of *Ppsi1* / *Ppsi6* succeeded in detecting the presence of *A. psidii* fungi. *Melaleuca* and *Syzygium* showed by DNA amplicon length around 500bp. Efforts to obtain ITS DNA sequences to compare the molecular characteristics of fungi from two different hosts have been carried out, however, the sequencing electropherogram was unreadable, so the comparison can not be performed. This study reported that *A. psidii* is currently present in Myrtaceae species in Yogyakarta, therefore precaution efforts should be conducted to avoid economic and ecological impact from this pathogen.

**Keywords:** PCR, molecular markers, species-specific markers, rust fungi

### ABSTRAK

*Austropuccinia psidii* merupakan salah satu jamur patogen penyebab karat pada tanaman famili Myrtaceae. Meningkatnya kegiatan penanaman jenis pohon yang merupakan inang jamur ini telah meningkatkan serangan jamur patogen yang berdampak pada peningkatan ancaman terhadap keberadaan jenis dari famili Myrtaceae di seluruh dunia termasuk di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi keberadaan patogen tersebut melalui pengamatan morfologi dan molekuler. Pengamatan morfologi menunjukkan adanya teliospora pada daun salam yang masih muda dan urediniospora jamur *A. psidii* pada daun salam (*Syzygium polyanthum*) dan daun kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) yang diambil dari arboretum Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) di Yogyakarta, Indonesia. Amplifikasi PCR menggunakan penanda DNA spesifik untuk jenis *A. psidii* yaitu *Ppsi1* / *Ppsi6* telah berhasil mendeteksi keberadaan jamur *A. psidii* pada kedua jenis tanaman tersebut ditandai dengan adanya amplicon DNA berukuran sekitar 500bp. Upaya memperoleh sekuens DNA ITS untuk membandingkan sifat molekuler fungi dari dua inang yang berbeda telah dilakukan, namun elektropherogram sekuens tersebut tidak terbaca sehingga tidak dapat dilakukan perbandingan. Studi ini melaporkan bahwa serangan jamur *A. psidii* saat ini terdapat pada dua jenis dari famili Myrtaceae di Yogyakarta, oleh karena itu upaya pencegahan perlu dilakukan untuk menghindari dampak ekonomis dan ekologis dari keberadaan patogen tersebut.

**Kata kunci:** PCR, penanda molekuler, penanda spesifik jenis, jamur karat

### I. PENDAHULUAN

*Austropuccinia psidii* sebelumnya dikenal sebagai *Puccinia psidii* (Beenken, 2017) adalah jamur patogen yang menyerang tumbuhan dari kelompok Myrtaceae. Jamur karat ini menyerang organ muda tanaman seperti daun, bunga, tunas,

buah (Tommerup et al., 2003) dan mengakibatkan kerusakan pada organ yang terserang (Glen et al., 2007). Gejala pertama pada tanaman yang terinfeksi jamur *A. psidii* adalah munculnya bercak klorotik kuning pada organ yang terinfeksi. Setelah beberapa hari,

pustula yang mengandung uredinia menghasilkan spora kuning yang disebut urediniospora. Penyakit ini dapat menurunkan pertumbuhan tanaman, menyebabkan defoliasi cabang yang parah, deformasi daun dan kematian tanaman (Liberato et al., 2006). Pada tanaman buah famili Myrtaceae seperti jambu biji, *A. psidii* terbukti menurunkan kualitas buah, memicu infeksi sekunder yang menyebabkan pembusukan buah, dan mengundang datangnya serangga oportunistik untuk menyerang buah (Martins et al., 2014).

*Austropuccinia psidii* merupakan ancaman bagi penanaman jenis dari famili Myrtaceae di banyak negara dan diprediksi dapat menyebabkan kerugian yang signifikan dalam perdagangan kayu beberapa jenis eukaliptus di Australia (Booth et al., 2000), karena dapat menyebabkan gangguan pertumbuhan, malformasi bahkan kematian pada tanaman muda (Coutinho et al., 1998). Jamur patogen ini pertama kali dilaporkan oleh Winter (1984) menyerang *Psidium guajava* di Brasil. Setelah dilaporkan pertama kali, patogen ini kemudian ditemukan pada beberapa jenis tumbuhan Myrtaceae di beberapa negara, yaitu pada *Metrosideros polymorpha* di Hawaii (Uchida et al., 2006), pada *Eucalyptus amplifolia* dan *E. rudis* di Jepang (Kawanishi et al., 2009) dan pada *Myrtus communis* di Afrika (Roux et al., 2013). Ancaman *A. psidii* bagi hutan tanaman Myrtaceae di Australia telah diprediksi pada tahun 2003 (Old et al., 2003), dan menjadi kenyataan dengan ditemukannya patogen ini pada beberapa tanaman misalnya *Agonis flexuosa*, *Callistemon viminalis* dan *Syncarpia glomulifera* di Australia pada bulan April (Carnegie et al., 2010).

Indonesia sebagai negara mega biodiversitas memiliki 30 marga tumbuhan dari famili Myrtaceae (Craven et al., 2003). Ancaman patogen ini di Indonesia dimulai dengan dilaporkannya pertama kali penemuan *A. psidii* di Indonesia pada *Eucalyptus pellita* dan *Melaleuca leucadendra* yang ditanam di Sumatera Selatan dan Sumatera Utara pada bulan

Juli 2015 (McTaggart et al., 2015). Identifikasi morfologi menunjukkan bahwa patogen yang ditemukan pada pohon tersebut mirip dengan *A. psidii* yang terdapat di Australia. Konfirmasi identitas jenis jamur yang dilakukan menggunakan penanda rDNA *Internal Transcribed Spacer* (ITS) mendapatkan bahwa jamur karat yang ditemukan di wilayah Indonesia identik dengan epitype *A. psidii* yang digambarkan oleh Machado et al., pada tahun 2015 (McTaggart et al., 2015). Pada studi karakter molekuler *A. psidii* yang lebih lanjut telah berhasil dikembangkan penanda spesifik untuk deteksi cepat *A. psidii* (Bakkeren & Szabo, 2020; Langrell et al., 2008; Rivera-Orduna et al., 2011).

Gejala penyakit karat *A. psidii* ditemukan pada beberapa pohon yang ditanam di arboretum Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (BBPPBPTH) di Yogyakarta pada bulan Agustus 2018, saat dilakukan kegiatan survei patogen. Oleh karena itu diperlukan pengamatan lebih lanjut terhadap karakter morfologi dan identifikasi patogen ini untuk memastikan keberadaan dan penyebarannya di Pulau Jawa. Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi jamur karat yang terdapat pada pohon salam (*Syzygium polyanthum*) dan kayu putih (*Melaleuca cajuputi*) dengan menggunakan karakter morfologi dan karakter molekuler.

## II. BAHAN DAN METODE

### A. Pengambilan sampel dan pengamatan karakter morfologi spora

Pengambilan sampel materi genetik untuk pengamatan morfologi spora dilakukan pada saat survei penyakit karat di arboretum BBPPBPTH pada bulan Agustus tahun 2018. Sampel berupa organ tanaman seperti daun, ranting, dan ranting pohon salam (*Syzygium polianthum*) dan pohon kayu putih (*Melaleuca cajuputi*), yang menunjukkan gejala terinfeksi *A. psidii* diambil menggunakan gunting dan dimasukkan dalam kantong kertas dan dijaga tetap kering dalam

suhu ruangan hingga dilakukannya pengamatan terhadap karakter morfologi spora. Usapan spora dari satu koloni jamur diambil menggunakan *cotton bud* yang telah disterilkan. Sampel berupa potongan kecil daun yang mengandung satu koloni jamur juga diambil menggunakan gunting. Sampel spora maupun potongan daun disimpan dalam *microtube* steril yang telah diisi larutan Sodium Dedesil Sulfat (SDS), untuk disimpan sebelum pengamatan molekuler dilakukan.

Pengamatan morfologi dilakukan terhadap spora yang diperoleh dari tanaman inang yang berbeda. Satu usapan spora dari organ tanaman yang terserang karat diambil menggunakan *cotton bud* steril kemudian diletakkan pada kaca objek dan spora diwarnai dengan bromo-phenol blue (BPB) dan diamati strukturnya pada beberapa perbesaran mikroskop yang berbeda. Data yang diperoleh dari identifikasi morfologi spora dicatat dan diuji terhadap literatur.

## B. Ekstraksi DNA

Pada bulan Desember 2018 dilakukan pengambilan ulang sampel untuk pengamatan molekuler. Adapun kegiatan analisa DNA dilakukan di laboratorium Genetika Molekuler BBPPBPTH hingga bulan Januari 2018.

Proses ekstraksi DNA dilakukan sesuai dengan prosedur yang digunakan oleh Prihatini (Prihatini et al., 2018). DNA diekstraksi dari spora dan juga dari potongan daun yang mengandung spora *A. psidii* yang telah disimpan di dalam larutan SDS 250 µl di dalam *microtube* 2 mL. Pengukuran kualitas dan kuantitas DNA genomik hasil ekstraksi dilakukan menggunakan spektrofotometer Nanovue Plus (GE Healthcare) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA diencerkan menjadi 5ng sebelum digunakan dalam proses amplifikasi DNA. Pada perlakuan yang lain DNA hasil ekstraksi diencerkan sebanyak 20 kali dan 40 kali menggunakan larutan Tris-EDTA (TE) dan digunakan sebagai ulangan.

## C. Amplifikasi DNA ITS dengan penanda spesifik jenis *A. psidii* dan penanda umum jamur

Amplifikasi DNA daerah ITS dengan penanda spesifik jenis *A. psidii* dilakukan menggunakan pasangan primer *Ppsi1 / Ppsi6* (Langrell et al., 2008) Reaksi PCR dilakukan pada mesin GeneAmp 9700 PCR (Applied Biosystem). Reaksi PCR terdiri dari 12,5 µL MyTaq Red Mix (Bioline), primer *forward* dan *reverse* konsentrasi 25 µM masing-masing sebanyak 0,625 µL, *template* DNA sebanyak 5 µL dan air steril untuk membuat volume mencapai 25 µL. Kondisi suhu pada proses PCR adalah sebagai berikut: denaturasi awal dengan suhu 94°C selama 3 menit, dilanjutkan dengan 30 siklus PCR yang terdiri dari denaturasi DNA pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57°C selama 1 menit dan *extension* atau pemanjangan DNA pada suhu 72°C selama 1 menit, dan diakhiri dengan proses ekstensi akhir dengan suhu 72°C selama 10 menit (Langrell et al., 2008).

Amplifikasi DNA daerah ITS dilakukan menggunakan pasangan primer umum atau universal untuk jamur yaitu ITS1F / ITS4 (Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990). Kondisi suhu pada proses PCR dengan penanda universal fungsi sedikit berbeda dengan kondisi PCR dengan penanda spesifik *A. psidii*. Suhu yang digunakan adalah sebagai berikut: denaturasi awal DNA pada suhu 94°C selama 5 menit, 30 siklus amplifikasi yang terdiri dari 30 detik pada suhu 94°C, 30 detik pada suhu 55°C, dan 60 detik pada suhu 72°C, diikuti 7 menit untuk proses pemanjangan sekuen DNA pada suhu 72°C.

Amplikon DNA yang dihasilkan dari kedua proses PCR dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agaros 1% dan dijalankan selama ± 1 jam, dengan aliran arus 100 V dan hasilnya divisualisasikan menggunakan mesin dokumentasi gel dan *software* Quantity One Basic (Biorad). Amplikon DNA rITS yang diperoleh dari penggunaan

penanda umum jamur kemudian digunakan untuk sequencing.

#### D. Sequencing ITS DNA and analisis data

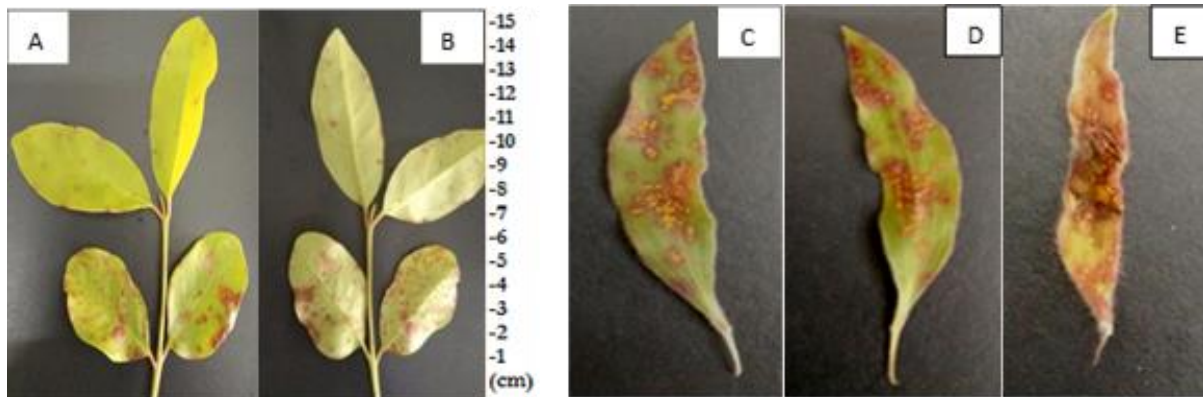
Produk amplifikasi DNA ITS dengan penanda *ITS1F* / *ITS4* dikirim ke Perusahaan sequencing DNA 1st Base untuk proses sequencing DNA. Sebelum dilakukan sequencing, dilakukan pengujian kualitas dan kuantitas DNA menggunakan gel agarose dan amplicon DNA diekstraksi kembali dari gel agarose dan dilakukan pemurnian DNA. Kromatogram sekuen DNA yang diperoleh melalui akses pada website 1st Base diamati dan diedit menggunakan *software* Chromas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas>).

Pengeditan sekuen DNA dilakukan untuk mengambil sekuen DNA hanya pada bagian ITS1, 5.8S dan ITS2. Sekuen DNA sampel yang dihasilkan dari penelitian ini kemudian dipastikan kecocokkannya dengan sekuen DNA jamur *A. psidii* yang tersedia di database *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Sekuen DNA dengan kualitas kromatogram yang baik diselaraskan menggunakan ClustalW

(Thompson et al., 1994) pada *software* Bioedit versi 7.0.5.3 (Hall, 1999).

### III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala penyakit karat ditemukan pada pohon salam dan kayu putih yang terdapat pada sisi luar arboretum BBPPBPTH. Pada pengamatan lebih lanjut, spora *A. psidii* banyak ditemukan pada daun muda (Gambar 1) dan jarang ditemukan pada daun tua. Hal ini sesuai dengan ditemukan pada tanaman *Eucalyptus* (Glen et al., 2007; Pérez et al., 2011) yaitu infeksi ditemukan sebagian besar pada jaringan muda yang sedang tumbuh meskipun juga dapat ditemukan pada daun dewasa. Sebuah penelitian yang membandingkan perkecambahan urediniospora pada jaringan muda dan jaringan dewasa daun *Eucalyptus grandis*, menyimpulkan bahwa lapisan kutikula dan lapisan lilin yang lebih tebal berhubungan dengan lebih sedikitnya infeksi *A. psidii* pada daun tua dibandingkan pada daun yang lebih muda (Xavier et al., 2015). Tebalnya lapisan kutikula dan lapisan lilin pada daun yang lebih tua membuat pembentukan apesorium jamur lebih sulit dilakukan. Kegagalan pembentukan apesorium menyebabkan tidak terjadinya penetrasi jamur ke dalam daun (Xavier et al., 2015).



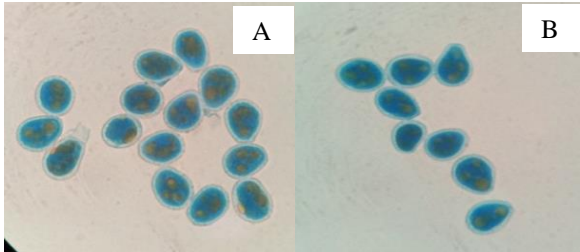
Gambar 1. Gejala yang muncul dari serangan jamur *Austropuccinia psidii* pada daun yang masih muda A. Permukaan atas daun salam, B. Permukaan bawah daun salam C. Permukaan atas daun kayu putih, D. Permukaan bawah daun kayu putih, E. Daun tunas muda kayu putih yang mati.

#### A. Pengamatan karakter morfologi spora

Spora *A. psidii* diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Pada

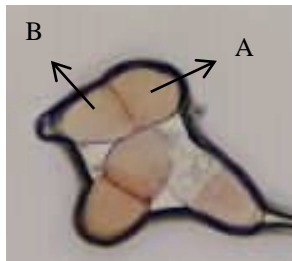
pengamatan urediniospora, digunakan pewarna *Bromophenol blue*. Urediniospora yang teramati pada tanaman salam dan kayu putih berbentuk

bulat telur, uniseluler, dengan dinding spora transparan (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan gambaran yang disampaikan oleh Hernández (Hernandez, 2006). Menurut Perez *et al.* (Pérez *et al.*, 2011), urediniospora *A. psidii* memiliki ukuran 19–26 x 15–22 µm dan memiliki duri yang halus dan seragam pada luar dinding selnya, panjang duri tersebut 1 µm, dan antara satu duri dan lainnya terpisah dengan jarak 0,5-1,5 µm.



Gambar 2. Urediniospora *Austropuccinia psidii* yang ditemukan pada daun salam (A) dan daun kayu putih (B).

Pada penelitian ini, teliospora yang merupakan tahap perkembangan lanjutan dari urediniospora hanya teramati pada daun salam. Pengamatan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x, teramati teliospora berwarna kuning pucat, berbentuk oval, memiliki satu sepat dan mengandung dua sel terpisah dengan sel atas lebih lebar dan lebih pendek dari pada sel bawah (Gambar 3). Gambaran teliospora ini sesuai dengan hasil pengamatan yang dilakukan pada penelitian sebelumnya oleh Walker *et al.* (Walker, 1983).



Gambar 3. Teliospora dari *Austropuccinia psidii* pada daun salam yang terdiri dari sel atas (A) dan sel bawah (B)

### **B. Deteksi menggunakan penanda spesifik untuk jamur *Austropuccinia psidii* (Primer *Ppsi1 / Ppsi6*)**

Proses amplifikasi DNA jamur yang diambil dari daun salam dan kayu putih keduanya

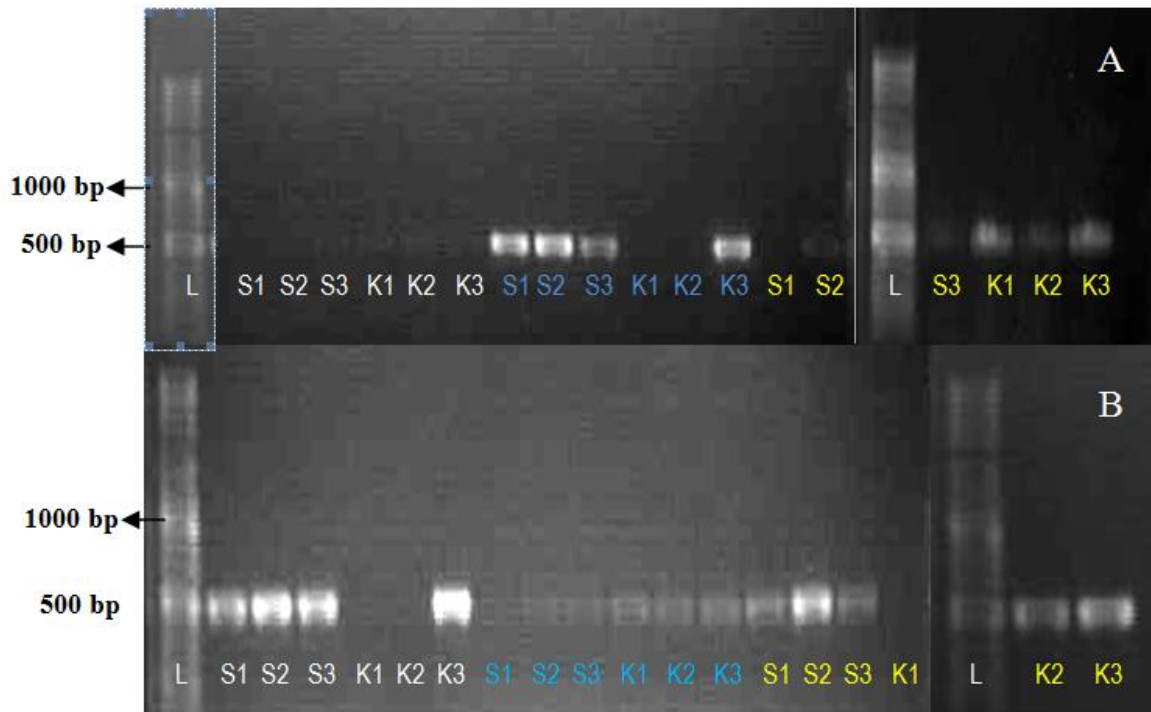
menunjukkan adanya amplicon DNA berukuran sekitar 500 bp (Gambar 4). Pada penelitian lain yang telah dilakukan, amplifikasi menggunakan primer *Ppsi1 / Ppsi6* untuk mendeteksi adanya jamur *A. psidii* pada beberapa jenis dari famili Myrtaceae juga menghasilkan amplicon berukuran sekitar 500 bp (Langrell *et al.*, 2008). Hal ini menunjukkan bahwa spora yang teramati pada penelitian ini adalah spora jamur *A. psidii*.

Deteksi jamur *A. psidii* dapat dilakukan menggunakan sampel berupa spora maupun daun yang mengandung spora (Gambar 4). Namun sampel berupa daun yang mengandung spora memberikan hasil positif deteksi pada kedua jenis tanaman pada hampir semua ulangan daun dan konsentrasi DNA yang berbeda (data pengukuran konsentrasi DNA tidak ditunjukkan). Hanya dua dari tiga ulangan daun kayu putih (K1, K2) pengenceran DNA 20 kali dan satu ulangan daun (K1) pengenceran DNA 40 kali yang tidak menunjukkan adanya amplicon DNA. Penggunaan sampel spora untuk mendeteksi jamur *A. psidii* juga tidak dipengaruhi oleh konsentrasi DNA pada reaksi PCR.

Perbedaan kualitas amplicon DNA jamur *A. psidii* yang dihasilkan oleh penanda spesifik *Ppsi1/Ppsi6* mungkin disebabkan karena kualitas DNA yang tidak terlalu bagus meskipun rasio DNA hasil ekstraksi yang terukur menggunakan spektrofotometer tidak berbeda jauh antar sampel (data pengukuran rasio DNA tidak ditunjukkan). Hal ini juga ditemukan pada penelitian yang dilakukan oleh Langrell *et al.* (Langrell *et al.*, 2008) yang tidak mendapatkan amplicon DNA jamur *A. psidii* dari sampel tunas, pollen, biji dan buah beberapa jenis inang famili Myrtaceae menggunakan penanda *Ppsi1/Ppsi6*. Upaya berikut yang dilakukan adalah penggunaan metode *nested PCR* dengan penanda *Ppsi2/Ppsi4* dan berhasil mendapatkan amplicon dengan ukuran yang lebih kecil yaitu sekitar 380 bp (Langrell *et al.*, 2008). Pendekatan *nested PCR* dilakukan untuk mendapatkan hasil deteksi yang lebih akurat dan spesifik. Proses ini pada dasarnya sama dengan PCR namun *template*

DNA yang digunakan merupakan amplikon dari PCR sebelumnya. Metode *nested* juga dilakukan oleh Baskarathevan *et al.* (Baskarathevan *et al.*, 2016), dimana amplifikasi dengan penanda *Ppsi1/Ppsi6* tidak menghasilkan amplikon *A. psidii* yang diharapkan, namun deteksi lebih lanjut menggunakan metode *nested* PCR dengan penanda *Ppsi2/Ppsi4* menghasilkan amplikon berukuran kurang lebih 380 bp. Namun pada penelitian ini metode *nested* PCR tidak

dilakukan karena penggunaan penanda spesifik *Ppsi1/Ppsi6* sudah mampu mendeteksi adanya jamur *A. psidii* pada dua jenis tanaman yang diamati meskipun tidak selalu muncul pada semua ulangan. Hal ini menunjukkan bahwa *A. psidii* dapat terdeteksi menggunakan penanda spesifik *Ppsi1/Ppsi6* pada sampel berupa spora maupun daun yang mengandung spora, pada daun salam dan kayu putih, pada beberapa konsentrasi DNA yang berbeda.



Gambar 4. Amplikon DNA yang dihasilkan oleh penanda spesifik (*Ppsi1/Ppsi6*) untuk jenis *Austropuccinia psidii* dari sampel spora (A) dan daun yang mengandung spora (B) pada pohon salam (S) dan pohon kayu putih (K). Deteksi dilakukan pada tiga ulangan sampel (1,2,3), tiga ulangan konsentrasi DNA (pengenceran 20 kali (huruf warna putih), pengenceran 40 kali (huruf warna biru), DNA sebanyak 5 ng/ $\mu$ l (huruf warna kuning). L adalah 100bp DNA ladder

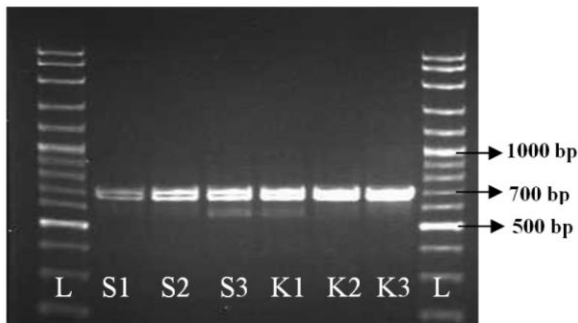
### C. Identifikasi jamur pathogen dengan penanda umum jamur dan analisa sequencing DNA ITS

Amplifikasi DNA ITS jamur *A. psidii* juga dilakukan menggunakan penanda ITS1F/ITS4 untuk dilanjutkan dalam proses sequencing DNA. Tidak semua sampel DNA digunakan dalam tahapan sequencing, namun hanya sampel spora yang berasal dari kedua jenis tanaman saja untuk menghindari kontaminasi jamur lain yang terambil dari sampel daun. Sampel DNA dengan pengenceran sebanyak 20 kali dipilih untuk digunakan pada tahapan ini.

Amplifikasi DNA ITS menggunakan penanda ITS1F/ITS4 dari sampel spora yang ditemukan pada pohon salam dan kayu putih menunjukkan hasil positif dengan terlihatnya pita DNA terang yang berukuran 700 bp (Gambar 5), namun juga teramati adanya pita DNA kedua yang lebih samar dan berukuran 600 bp. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun menggunakan sampel DNA dari spora jamur tertentu namun kontaminasi oleh adanya jamur lain masih dapat terjadi. Untuk mengatasi terjadinya kontaminasi pada proses sequencing DNA, dilakukan pemisahan pita ganda DNA



melakukan proses elektroforosis menggunakan agarose lebih lama. DNA dari pita tunggal yang telah terpisahkan pada agarose diambil dan digunakan dalam proses sequencing DNA untuk mengidentifikasi jenis jamur dan melihat variasi karakter sekuen DNA ITS antara jamur yang ditemukan pada pohon salam dan kayu putih



Gambar 5. Amplicon DNA ITS amplicon *Austropuccinia psidii* dari sampel spora yang terdapat pada pohon salam (S) dan kayu putih (K), dengan tiga kali ulangan (1,2,3). L adalah 100bp DNA ladder

Sekuen DNA ITS banyak digunakan untuk identifikasi jenis jamur yang sulit dibedakan dengan karakter morfologi saja dan telah disepakati sebagai salah satu penanda DNA untuk *barcoding* oleh *Consortium for the Barcode of Life* (Bellemain et al., 2010; Raja et al., 2017). Daerah ITS dipilih karena memiliki variasi yang tinggi pada satu genus (Gomes et al., 2002), namun juga dapat menunjukkan adanya perbedaan di antara banyak jenis jamur karat (Langrell et al., 2008). Dalam penelitian yang dilakukan oleh Schoch et al. (Schoch et al., 2012) yang membandingkan penanda DNA ITS, LSU, SSU, dan RPB1, menemukan bahwa daerah ITS merupakan penanda yang menghasilkan peluang keberhasilan identifikasi jenis jamur tertinggi di antara penanda lainnya karena memiliki *barcoding gap* yang paling jelas, meskipun pada beberapa kelompok tertentu diperlukan penanda tambahan.

Hasil sequencing DNA pada penelitian ini meskipun telah menggunakan pita DNA tunggal sebagai amplicon DNA untuk proses sequencing belum bisa mendapatkan kromatogram yang

jelas (Gambar tidak ditampilkan). Masih terlihat adanya basa nukleotida dari DNA kontaminan yang menumpuk dengan basa nukleotida dari DNA sampel, sehingga urutan DNA tidak bisa dibaca dengan jelas. Namun upaya mencari kemiripan dengan metode BLAST tetap dilakukan. Satu sampel DNA dari spora pada pohon salam ulangan 1 yang memiliki 98% *query cover* menunjukkan adanya kemiripan tertinggi yaitu sebesar 94.27% (625/663) dengan sekuen ITS jamur *A. psidii* (EU348742) yang ditemukan pada *Eucalyptus grandis* dari Uruguay (Pérez et al., 2011). Suatu jenis jamur dapat dipastikan sebagai jamur *A. psidii* jika memiliki kemiripan lebih dari 98% (Rodas et al., 2015), oleh karena itu sampel spora tersebut meskipun teramplifikasi menggunakan penanda DNA ITS1F/ITS4 belum dapat dipastikan jenisnya. Penggunaan primer tersebut memerlukan tahapan lebih lanjut yaitu proses sequencing DNA dan melihat kemiripannya dengan sekuen DNA dari isotype jamur atau isolat lain yang telah ada pada data basa DNA.

Selain untuk identifikasi jenis, sekuen DNA juga dapat digunakan untuk melihat adanya variasi antar individu. Perbedaan variasi genetik patogen serta tingkat patogenisitas tiap individu atau isolat perlu dipelajari untuk merencanakan upaya pengendalian penyakit. Adanya perbedaan variasi genetik dan tingkat patogenisitas *A. psidii* teramati di Uruguay meskipun dalam jumlah sampel yang sedikit (Pérez et al., 2011).

Meskipun upaya identifikasi jenis jamur menggunakan penanda ITS universal jamur (ITS1F/ITS4) maupun penanda spesifik belum dapat dilakukan pada penelitian ini, namun keberadaan jamur patogen *A. psidii* telah terdeteksi pada pohon salam dan kayu putih yang ada di Yogyakarta. Penelitian ini merupakan laporan pertama mengenai jamur *A. psidii* di Pulau Jawa, dan penelitian kedua yang melaporkan keberadaan jamur ini di Indonesia. Hingga penelitian ini dilaporkan, belum ditemukan gejala penyakit karat yang disebabkan oleh *A. psidii* pada jenis lain di sekitar Yogyakarta. Sebaran kedua jenis pohon tersebut

sangat luas karena merupakan jenis tanaman yang penting dan banyak ditanam di Indonesia karena memiliki manfaat untuk pengobatan dan juga digunakan sebagai bahan tambahan makanan. Kayu putih saat ini sedang dikembangkan (Sumardi et al., 2018) untuk budidaya bersama dengan kelompok tani diberbagai tempat di Indonesia sebagai sumber bahan baku industri minyak kayu putih di Indonesia (KLHK, 2020). Untuk itu perluantisipasi penyebaran penyakit karat pada beberapa jenis dari famili Myrtaceae khususnya anakan kayu putih yang ditanam di beberapa wilayah di Indonesia perlu dilakukan.

Penelitian lebih lanjut mengenai sebaran *A. psidii* yang ada di wilayah lain di Pulau Jawa dan Pulau lain di Indonesia, variasi genetik antar individu dari berbagai inang dan wilayah yang berbeda serta tingkat serangan (patogenesis) individu perlu dilakukan, sehingga upaya pengendalian dan pencegahan penyebaran penyakit dapat dilakukan secara optimal.

#### IV. KESIMPULAN

Penggunaan penanda spesifik *Ppsi1/Ppsi6* telah mendeteksi adanya jamur pathogen *A. psidii* pada pohon salam dan kayu putih yang ada di arboretum BBPPBPTH Yogyakarta. Adapun identifikasi variasi genetik menggunakan penanda DNA umum jamur ITS1F/ITS4 belum dapat dilakukan karena adanya kontaminasi DNA.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan dengan memanfaatkan anggaran DIPA tahun 2018-2019. Farah Aulya Faradilla adalah mahasiswa tingkat Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Sebelas Maret Surakarta yang melakukan penelitian skripsi pada BBPPBPTH di Yogyakarta. Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dalam kegiatan penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Bakkeren, G., & Szabo, L. J. (2020). Progress on molecular genetics and manipulation of rust fungi. *Phytopathology*, 110(3), 532–543. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0228-IA>
- Baskarathevan, J., Taylor, R. K., Ho, W., McDougal, R. L., Shivas, R. G., & Alexander, B. J. R. (2016). Real-time PCR assays for the detection of *Puccinia psidii*. *Plant Disease*, 100(3), 1–8. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0851-RE>
- Beenken, L. (2017). Austropuccinia: A new genus name for the myrtle rust *Puccinia psidii* placed within the redefined family Sphaerophragmiaceae (Pucciniales). *Phytotaxa*, 297(1), 53–61. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.297.1.5>
- Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10.
- Booth, T. H., Old, K. M., & Jovanovic, T. (2000). A preliminary assessment of high risk areas for *Puccinia psidii* (*Eucalyptus* rust) in the Neotropics and Australia. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 82(1–3), 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(00\)00233-4](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(00)00233-4)
- Carnegie, A. J., Lidbetter, J. R., Walker, J., Horwood, M. A., Tesoriero, L., Glen, M., & Priest, M. J. (2010). *Uredo rangellii*, a taxon in the guava rust complex, newly recorded on Myrtaceae in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 39(5), 463–466. <https://doi.org/10.1071/AP10102>
- Coutinho, T. A., Wingfield, M. J., Alfenas, A. C., & Crous, P. W. (1998). Eucalyptus rust: A disease with the potential for serious international implications. *Plant Disease*, 82(7), 819–825. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.819>
- Craven, L. A., Sunarti, S., Mudiana, D., Yulistyarini, T., & Wardani, M. (2003). Identification key to the indigenous Indonesian genera of Myrtaceae. *Floribunda*, 24, 89–94.
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhiza and rusts. *Molecular Ecology*, 2(May 2016), 113–118. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294x.1993.Tb00005.X>
- Glen, M., Alfenas, A. C., Zauza, E. A. V., Wingfield, M. J., & Mohammed, C. (2007). *Puccinia*



- psidii*: a threat to the Australian environment and economy – a review. *Australasian Plant Pathology*, 36(1), 1–16. <https://doi.org/10.1071/AP06088>
- Gomes, E. A., Kasuya, M. C. M., de Barros, E. G., Borges, A. C., & Fernandes de Araújo, E. (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4), 477–483. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000400018>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hernandez, J. R. (2006). *Invasive fungi fact sheets. Puccinia psidii*. Systemic Mycology and Microbiology Laboratory ARS USDA.
- Kawanishi, T., Uematsu, S., Kakishima, M., Kagiwada, S., Hamamoto, H., Horie, H., & Namba, S. (2009). First report of rust disease on ohia and the causal fungus, *Puccinia psidii*, in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 75(6), 428–431. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0202-0>
- KLHK. (2020). *Hilirisasi Benih Unggul Kayuputih Berbasis Kelompok Tani*.
- Langrell, S. R. H., Glen, M., & Alfnas, A. C. (2008). Molecular diagnosis of *Puccinia psidii* (guava rust) - A quarantine threat to Australian eucalypt and Myrtaceae biodiversity. *Plant Pathology*, 57(4), 687–701. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01844.x>
- Liberato, J. R., Silveira, S. F., Junghans, D. T., Rocabado, J. A., Aperecido, C., & Shivas, R. G. (2006). *Eucalyptus rust*. PaDIL.
- Martins, M. V., da Silveira, S. F., & Maffia, L. A. (2014). Guava fruit loss caused by rust. *Summa Phytopathologica*, 40(2), 107–113. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1904>
- McTaggart, A. R., Doungsa-Ard, C., Geering, A. D. W., Aime, M. C., & Shivas, R. G. (2015). A co-evolutionary relationship exists between *Endoraecium* (Pucciniales) and its *Acacia* hosts in Australia. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35(1), 50–62. <https://doi.org/10.3767/003158515X687588>
- Old, K. M., Wingfield, M. J., & Yuan, Z. Q. (2003). A manual of diseases of eucalypts in South-East Asia. In *Center for International Forestry Research*.
- Pérez, C. A., Wingfield, M. J., Altier, N. A., Simeto, S., & Blanchette, R. A. (2011). *Puccinia psidii* infecting cultivated *Eucalyptus* and native Myrtaceae in Uruguay. *Mycological Progress*, 10(3), 273–282. <https://doi.org/10.1007/s11557-010-0698-x>
- Prihatini, I., Rimbawanto, A., Puspitasari, D., & Fauzi, D. (2018). Pengujian penanda jenis spesifik pada jamur yang berpotensi sebagai agens pengendali hayati penyakit busuk akar pada akasia. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan; Vol 12, No 1 (2018): Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*. <https://doi.org/10.20886/jpth.2018.12.1.1-12>
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rivera-Orduna, F. N., Suarez-Sanchez, R. A., Flores-Bustamante, Z. R., Gracida-Rodriguez, J. N., & Flores-Cotera, L. B. (2011). Diversity of endophytic fungi of *Taxus globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*, 47(1), 65–74.
- Rodas, C. A., Roux, J., Maier, W., Granados, G. M., Bolaños, M. D., McTaggart, A. R., & Wingfield, M. J. (2015). First report of *Puccinia psidii* on *Corymbia citriodora* and *Eucalyptus* in Colombia. *Forest Pathology*, 45(6), 534–536. <https://doi.org/10.1111/efp.12223>
- Roux, J., Greyling, I., Coutinho, T. A., Verleur, M., & Wingfield, M. J. (2013). The Myrtle rust pathogen, *Puccinia psidii*, discovered in Africa. *IMA Fungus*, 4(1), 155–159. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.14>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P. W., Miller, A. N., Wingfield, M. J., Aime, M. C., An, K. D., Bai, F. Y., Barreto, R. W., Begerow, D., Bergeron, M. J., Blackwell, M., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241–6246.
- Sumardi, S., Kartikawati, N. K., Prastyono, P., & Rimbawanto, A. (2018). Seleksi dan perolehan genetik pada uji keturunan generasi kedua kayuputih (*Melaleuca cajuputi* subsp. *cajuputi*) di Gunung Kidul. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*, 12(1), 65–73. <https://doi.org/10.20886/jpth.2018.12.1.65-73>

- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nuc. Acid. Res.*, 22, 4673-4680.
- Tommerup, I. C., Alfenas, A. C., & Old, K. M. (2003). Guava rust in Brazil - A threat to *Eucalyptus* and other myrtaceae. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 33(3), 420-428.
- Uchida, J., Zhong, S., & Killgore, E. (2006). First report of a rust disease on ohia caused by *Puccinia psidii* in Hawaii. *Plant Disease*, 90(4), 524-524. <https://doi.org/10.1094/pd-90-0524c>
- Walker, J. (1983). Pacific mycogeography: deficiencies and irregularities in the distribution of plant parasitic fungi. *Australian Journal of Botany, Supplementary Series*, 10(10), 89-136.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.
- Winter, G. (1984). *Rabenhorstii* fungi europaei et extraeuropaei exsiccati cura Dr. G. Winter. Centuria XXXV et XXXVI. *Hedwigia*, 23, 164-165.
- Xavier, A. A., da Silva, A. C., da Silva-Guimarães, L. M., Matsuoka, K., Hodges, C. S., & Alfenas, A. C. (2015). Infection process of *Puccinia psidii* in *Eucalyptus grandis* leaves of different ages. *Tropical Plant Pathology*, 40(5), 318-325. <https://doi.org/10.1007/s40858-015-0043-7>