

PERSYARATAN TAMBAHAN KHUSUS UNTUK KENAIKAN PANGKAT PROFESOR

Nama : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
 NIP : 196510311992032003
 Bidang Ilmu : Biologi
 Unit Kerja : Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung
 No WA/HP : 085228255200
 Email : endang.nurcahyani@fmipa.unila.ac.id

Daftar Hibah Penelitian Kompetitif sebagai ketua (Sumber data: LPPM Universitas Lampung)

<http://repository.lppm.unila.ac.id/id/eprint/48888>

Jumlah Total besar Dana: Rp. 331.000.000, - (Tiga Ratus Tiga Puluh Satu Juta Rupiah)

No	Hibah Penelitian	Judul	Besar Dana (Rp)
1	<p>Ketua Peneliti Hibah DIKTI: Penelitian Fundamental Tahun I Tahun Anggaran 2015; No Kontrak: 158/UN26/8/LPPM/2015. Tanggal 30 Maret 2015</p> <p>Ketua Peneliti Hibah DIKTI: Penelitian Fundamental Tahun II Tahun Anggaran 2016 (Lanjutan) No Kontrak: 77/UN26/8/LPPM/2016. Tanggal 13 April 2016</p>	<p>Analisis Pola DNA dan Profil Protein Anggrek Tanah (<i>Spathoglottis Plicata</i> Bl.) Hasil <i>Induced Resistance</i> Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i></p>	126.000.000, -
2	<p>Ketua Hibah Penelitian Professorship Universitas Lampung Tahun Anggaran 2022. Nomor Kontrak: 478/UN26.21/PN/2022 Tanggal 17 Mei 2022</p>	<p>Perakitan Varietas Unggul Vanili (<i>Vanilla planifolia</i> Andrews) Tahan Penyakit Layu Fusarium Berbasis Teknik Molekular dan <i>Induced Resistance</i> dengan Asam Fusarat</p>	50.000.000, -
3	<p>Ketua Hibah Penelitian Pascasarjana Universitas Lampung Tahun Anggaran 2018. No Kontrak: 1571/UN26.21/PN/2018 Tanggal 9 Juli 2018</p>	<p>Analisis Pola DNA dan Karakterisasi Cassava (<i>Manihot Esculenta</i> Crantz.) Hasil <i>Induced Resistance</i> Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i></p>	40.000.000, -
4	<p>Ketua Hibah Penelitian Pascasarjana Universitas Lampung Tahun Anggaran 2019. No Kontrak: 1921/UN26.21/PN/2019 Tanggal 26 Juni 2019</p>	<p>Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan [<i>Phalaenopsis amabilis</i> (L.) Bl.] Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i> dan Cekaman Kekeringan</p>	40.000.000, -
5	<p>Ketua Hibah Penelitian Pascasarjana Universitas Lampung Tahun Anggaran 2020. No Kontrak: 1510/UN26.21/PN/2020 Tanggal 24 Maret 2020</p>	<p>Analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan Karakter Spesifik Mutan Cassava (<i>Manihot esculenta</i> Crantz.) Resisten <i>Fusarium oxysporum</i></p>	40.000.000, -

6	Ketua Hibah Penelitian Unggulan Universitas Lampung Tahun Anggaran 2017. No Kontrak: 808/UN26.21/PP/2017	Analisis <i>Sequensing</i> ITS r-DNA dan Dampak Terhadap Lingkungan Mutan <i>Vanilla</i> <i>planifolia</i> Andrews Tahan <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vanillae</i>	35.000.000, -
Total			331.000.000, - (Tiga Ratus Tiga Puluh Satu Juta Rupiah)

**LAPORAN TAHUNAN
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**ANALISIS POLA DNA DAN PROFIL PROTEIN ANGGREK
TANAH (*Spathoglottis plicata* Bl.) HASIL *INDUCED
RESISTANCE* TERHADAP *Fusarium oxysporum***

Tahun ke-1 dari rencana 2 tahun

KETUA/ANGGOTA TIM:

**Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (NIDN: 0031106503)/Ketua
Rochmah Agustrina, Ph.D. (NIDN: 0003086102)/Anggota
Dra. Tundjung T.H., M.S. (NIDN: 0024065805)/Anggota**

**Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Fundamental
Nomor kontrak: 158/UN26/8/LPPM/2015. Tanggal 30 Maret 2015**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
NOVEMBER
2015**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ANALISIS POLA DNA DAN PROFIL PROTEIN
ANGGREK TANAH (*Spathoglottis plicata* Bl.) HASIL
INDUCED RESISTANCE TERHADAP *Fusarium*
oxysporum

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. ENDANG NURCAHYANI M.Si.
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung
NIDN : 0031106503
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Biologi
Nomor HP : 085269847344
Alamat surel (e-mail) : endang_nurcahyani@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : Dra. ROCHMAH AGUSTINA Ph.D.
NIDN : 0003086102
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dra. TUNJUNG TRIPENI M.S.
NIDN : 0024065805
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Institusi Mitra (jika ada) : -
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 66.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 150.000.000,00



Mengetahui,
Dekan FMIPA

(Dr. Eng. Sunarso, Ph.D.)
NIP/NIK 196965301995121001

Bandar Lampung, 10 - 11 - 2015
Ketua,

(Dr. ENDANG NURCAHYANI M.Si.)
NIP/NIK 196510311992032003

Menyetujui,
Ketua Lembaga Penelitian

(Dr. Eng. Admi Syarif)
NIP/NIK 196701031992031003

RINGKASAN

Penelitian *Induced Resistance* anggrek tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang tahan. Inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) pada planlet tahan dilakukan secara *in vitro*, dilanjutkan dengan analisis DNA dan profil protein dari *S. plicata* yang tahan terhadap *Fo*, dibandingkan dengan kontrol.

Tujuan jangka panjang dalam penelitian ini adalah memperoleh bibit (varietas) *S. plicata* yang tahan terhadap *Fo*, sedangkan target khusus yang ingin dicapai adalah **1)** Mengetahui kisaran konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* secara *in vitro* dan teori mekanisme ketahanan terimbas *S. plicata* terhadap *Fo* **2)**, Uji ketahanan dan karakterisasi *S. plicata* yang tahan *Fo* secara *in vitro* dan **3)** Analisis Pola DNA dan Profil protein *S. plicata* yang tahan *Fo*. Teori hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi acuan metode ketahanan terimbas pada tanaman anggrek tanah lainnya di Indonesia terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa: **1)** kisaran konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* adalah 10-40 ppm; **2)** secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan AF konsentrasi 40 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 ppm, konsentrasi AF 40 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%; semakin meningkat konsentrasi AF maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase dan ketebalan lignin pada planlet *S. plicata* tahan *Fo*. **3)** Munculnya pita protein spesifik (\pm 19 kD) mengindikasikan terbentuknya PR-protein (peroksidase) pada planlet *S. plicata* yang tahan terhadap *Fo*. Terdapat pita DNA baru (spesifik) pada planlet *S. plicata* yang tahan *Fo* dengan ukuran sekitar 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*.

Kata kunci : *Spathoglottis plicata* Bl.; Profil Protein & DNA; *Induced Resistance*; *Fusarium oxysporum* (*Fo*), *In vitro*.

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan pada Allah S.W.T. atas limpahan Rahmat yang diberikan kepada penyusun, sehingga penyusunan **Laporan Tahunan Penelitian** yang berjudul “**Analisis Pola DNA dan Profil Protein Anggrek Tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum***” dapat diselesaikan.

Penelitian ini dibiayai oleh anggaran Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, sesuai dengan **Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Hibah Fundamental Nomor: 158/UN26/8/LPPM/2015 Tanggal 30 Maret 2015**, untuk itu penyusun mengucapkan terima kasih atas kesempatan tersebut.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Universitas Lampung; Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung; Dekan Fakultas MIPA Universitas Lampung atas bantuan fasilitas yang diberikan, serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan Laporan Akhir ini. Penyusun berharap semoga hasil laporan ini bermanfaat bagi yang memerlukan.

Bandar Lampung, 10 November 2015

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
RINGKASAN	iii
PRAKATA	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN	10
BAB 4. METODE PENELITIAN	11
BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN	16
BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA	30
BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN	36
DAFTAR PUSTAKA	37
LAMPIRAN	41
1. Artikel Ilmiah Seminar Nasional	42
2. Bukti Status <i>Submission</i> Seminar Nasional	50
3. Bukti Sertifikat Seminar Nasional	51
4. Prosiding Seminar Nasional	52
5. <i>Notification of Acceptance</i> Seminar Internasional	59
6. Fullpaper Poster Ilmiah Seminar International	60
7. Poster Seminar Internasional	64
8. <i>Manuscript</i> Jurnal Internasional	65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Primer RAPD	23
2. Persentase jumlah planlet hidup hasil seleksi dengan asam fusarat	28
3. Persentase dan visualisasi planlet <i>S. plicata</i> hasil seleksi dengan berbagai konsentrasi asam fusarat	28
4. Persentase jumlah planlet <i>S. plicata</i> yang hidup pada medium multiplikasi	30
5. Warna, ukuran konidium, dan diameter koloni <i>Fusarium oxysporum</i>	31
6. Persentase daun layu atau kuning pada setiap perlakuan asam fusarat	34
7. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan dan tingkat ketahanan <i>S. plicata</i> pada setiap perlakuan asam fusarat	35
8. Rata-rata ketebalan lignin (μm) planlet <i>S. plicata</i> yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30 dan 40 ppm)	37
9. Hasil pengukuran kemurnian DNA dan konsentrasi DNA 5 sampel daun <i>S. plicata</i> yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30 dan 40 ppm)	42
10. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD pada planlet <i>S. plicata</i> kontrol dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30, dan 40 ppm)	43
11. Pola pita DNA planlet <i>S. plicata</i> kontrol dan diimbas asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_14	45
12. Pola pita DNA planlet <i>S. plicata</i> kontrol dan diimbas asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_20	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bunga <i>Spatoglottis plicata</i> Bl.	16
2. Bagan alir tahapan penelitian	21
3. Hasil propagasi planlet <i>S. plicata</i> secara <i>in vitro</i>	25
4. Planlet <i>S. plicata</i> yang ditanam pada medium VW dengan penambahan AF berbagai konsentrasi umur satu minggu. A= kontrol (0 ppm), B= konsentrasi AF (10 ppm), C= konsentrasi AF (20 ppm), D= konsentrasi AF (30 ppm), dan E= konsentrasi AF (40 ppm)	27
5. Pertumbuhan planlet <i>S. plicata</i> umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi AF. A= 0 ppm (kontrol), B= 10 ppm, C= 20 ppm, D= 30 ppm, dan E= 40 ppm	29
6. Karakter morfologis hasil isolasi <i>Fusarium oxysporum</i> . A= makrokonidium, B= mikrokonidium, ap= sel apikal, ba= sel basal, S ₁ = sel tunggal, S ₂ = sel bersekat	30
7. Hifa <i>Fusarium oxysporum</i> dengan A= kladospora (kl) dan B= konidiofor (ko)	32
8. Koloni isolat <i>F. oxysporum</i> dalam medium PDA, A= koloni berwarna putih kemerahan, B= koloni berwarna putih keunguan	32
9. Hasil isolasi monospora <i>Fusarium oxysporum</i> dalam medium PDA. A= permukaan atas, B= permukaan bawah	33
10. Hasil inokulasi <i>F. oxysporum</i> pada planlet <i>S. plicata</i> umur 28 hari setelah perlakuan. A= planlet kontrol, B= planlet hasil pengimbasan AS 10 ppm, C= planlet hasil pengimbasan AS 20 ppm, D= planlet hasil pengimbasan AS 30 ppm, E= planlet hasil pengimbasan AS 40 ppm	36

11. Irisan melintang batang planlet <i>S. plicata</i> yang mengandung lignin (merah muda pada dinding sel). Tanda panah (→) menunjukkan penebalan lignin yang meningkat pada planlet <i>S. plicata</i> yang diperlakukan AF. A= kontrol; B, C, dan D= planlet <i>S. plicata</i> diimbasi asam fusarasi konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm	37
12. Histogram hubungan antara aktivitas enzim peroksidase planlet anggrek tanah yang tidak diimbasi (kontrol) dan diimbasi asam fusarasi (10, 20, 30, dan 40 ppm)	38
13. Hasil isolasi DNA 5 sampel daun <i>S. plicata</i> yang tidak diimbasi (kontrol_ K₁U₃) dan diimbasi asam fusarasi (10 ppm_ K₂U₁ , 20 ppm_ K₃U₂ , 30 ppm_ K₄U₃ dan 40 ppm_ K₅U₂)	43
17. Pola pita DNA planlet <i>S. plicata</i> dengan primer OPB_14	
18. Pola pita DNA <i>S. plicata</i> dengan primer OPB_20	49
19. Profil protein daun planlet <i>S. plicata</i> hasil pengimbasan asam fusarasi dengan metode SDS-PAGE 1D	
20. Road-Map Riset Multi tahun	53
21. Road-Map Riset Tahun II	56

DAFAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Artikel Ilmiah Seminar Nasional	42
2. Bukti Status <i>Submission</i> Seminar Nasional	50
3. Bukti Sertifikat Seminar Nasional	51
4. Prosiding Seminar Nasional	52
5. <i>Notification of Acceptance</i> Seminar Internasional	59
6. Fullpaper Poster Ilmiah Seminar International	60
7. Poster Seminar Internasional	64
8. <i>Manuscript</i> Jurnal Internasional	65

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Anggrek merupakan tanaman berbunga yang mempunyai nilai ekonomi cukup tinggi dan harganya relatif stabil. Anggrek tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) merupakan salah satu tanaman anggrek yang banyak disukai karena mudah dibudidayakan. Salah satu kendala yang dihadapi dalam budidaya anggrek tanah adalah adanya jamur patogen yang dapat menyerang beberapa bagian tanaman antara lain batang, daun, atau akar (Djatnika, 2012).

Beberapa jamur patogen yang sering menyerang akar anggrek tanah adalah *Rhizoctonia sp.* patogen, *Phytophthora palmivora*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium solanii* dan *Fusarium oxysporum* yang sering disebut juga sebagai patogen tular tanah (Anonymous, 2008). Layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) merupakan penyakit penting dan menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek, termasuk di dalamnya *S. plicata*. Gejala penyakit tersebut muncul sejak tanaman anggrek dipindah dari medium kultur jaringan (Palmer, 2011). Di Amerika Serikat, penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian tanaman dan kehilangan hasil lebih dari 50% dan sulit dikendalikan dengan hanya menggunakan fungisida (Wedge & Elmer, 2008).

Di Indonesia, selama ini para petani anggrek masih menggunakan pestisida sintesis untuk mengendalikan penyakit layu *Fusarium* tersebut. Pestisida kerap menimbulkan polusi terhadap lingkungan padahal tanaman anggrek selalu dekat secara fisik dengan penggemarnya, maka perlu dicari alternatif lain yang efektif dan ramah lingkungan (Djatnika, 2012).

Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang aman, efisien dan efektif dan aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan varietas yang tahan (resisten). Penggunaan varietas unggul yang tahan terhadap *Fo* dengan daya hasil tinggi merupakan salah satu alternatif pengendalian penyakit yang penting dan tidak menimbulkan dampak negatif seperti penggunaan pestisida. Pengembangan kultivar *S. plicata* tahan *Fo* tersebut dapat dilakukan antara lain dengan metode seleksi *in vitro* yaitu mengkulturkan eksplan berupa jaringan atau

organ pada medium yang mengandung asam fusarat konsentrasi selektif (Bouizgarne *et al.*, 2006)

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Asam ini dapat bersifat toksin (konsentrasi lebih dari 10^{-5} M) sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Landa *et al.*, 2002; Bouizgarne *et al.*, 2006), tetapi pada konsentrasi yang non toksik (di bawah 10^{-6} M) justru membantu mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen (Bouizgarne *et al.*, 2006). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Arai dan Takeuchi, 1993). Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), nanas (Borras *et al.*, 2001), dan vanili (Nurchayani, 2013). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Pada tanaman yang diperlakukan dengan AF, akan mengaktifasi gen-gen di antaranya gen peroksidase (Saravanan *et al.*, 2004). Perbandingan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis dapat dilakukan untuk mengidentifikasi produk gen yang dihasilkan selama planlet *S. plicata* diseleksi dengan menggunakan AF. Metode elektroforesis protein satu dimensi dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya

(Maniatis *et al.*, 1982). Selain itu, keragaman genetik pada planlet *S. plicata* akibat perlakuan dengan AF, dapat dideteksi dengan penanda molekular, salah satunya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Metode RAPD adalah penanda berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan 10 basa primer acak (Welsh & Mc Clelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Penggunaan AF dalam konsentrasi yang toleran sejauh ini belum pernah dilaporkan secara pasti dan tepat dalam pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*) planlet *S. plicata* terhadap *Fo*. Oleh karena itu, penelitian tentang peranan AF sebagai pengimbas ketahanan secara *in vitro* perlu dilakukan. Pengendalian penyakit layu *Fusarium* pada *S. plicata* dengan AF sepanjang pengetahuan penulis belum pernah dilakukan dan belum diketahui: (1) Mekanisme ketahanan *S. plicata* terimbas terhadap *F. oxysporum* (2) Profil protein dari *S. plicata* yang tahan terhadap *F. oxysporum*, dan (3) Pola DNA *S. plicata* tahan *F. oxysporum*.

B. Urgensi Penelitian

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam budidaya tanaman anggrek tanah (*S.plicata*) di Indonesia adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *F.oxysporum* (*Fo*) dan bersifat tular medium (Palmer, 2011). Pengendalian penyakit pada anggrek selama ini dilakukan menggunakan pestisida yang sering menimbulkan polusi terhadap lingkungan (Djatnika, 2008). Salah satu cara pengendalian penyakit yang aman terhadap lingkungan, yaitu menggunakan varietas yang tahan (resisten) dengan mekanisme terimbas atau *induced resistance* (Agrios, 2005).

Pengimbasan ketahanan oleh AF pada *S. plicata* diduga akan menyebabkan: (1) terbentuknya lignin (lignifikasi), sehingga tanaman *S. plicata* akan terlindung secara struktural dari penetrasi hifa *F. oxysporum*, (2) Pembentukan protein peroksidase (*Pathogenesis Related-protein/ PR-protein*) yang diduga akan mendegradasi epidermis *Fusarium oxysporum*, (3) terjadinya perubahan pola DNA pada tanaman *S. plicata* yang bersifat tahan sehingga akan dapat diketahui gen ketahanannya. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian lebih

mendalam tentang berbagai hal tersebut sebagai teori baru mekanisme ketahanan *S. plicata* terhadap jamur *F. oxysporum*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat dalam menanggulangi penyakit tersebut sehingga nantinya akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual anggrek *S. plicata* serta pendapatan petani anggrek di Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ketahanan terimbas (*induced resistance*).

Pengendalian penyakit secara hayati dapat melalui interaksi antara populasi patogen dan agens hayati baik secara langsung maupun tidak langsung. Ketahanan terimbas bersifat tidak spesifik terhadap jenis patogen, sehingga dapat lebih efisien dalam pelaksanaannya (Agrios 2005). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Vidhyasekaran, 1999). PR-protein adalah protein yang dikeluarkan oleh tanaman sebagai tanggapan terhadap beberapa senyawa pengimbas (*inducer*). Infeksi tanaman oleh berbagai patogen seperti jamur, bakteri, dan virus dapat menyebabkan terbentuknya PR-protein (Park *et al.*, 2004; Edreva, 2005). Sintesis dan akumulasi PR-protein ini sangat berperan penting dalam pertahanan tanaman terhadap patogen. Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), dan vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurchayani, 2013).

Protein tumbuhan anti jamur (PR-protein) telah diklasifikasi menurut Yun *et al.* (1997) menjadi 4 kelompok, kemudian diperbarui oleh van Loon & van Strien (1999) menjadi 14 kelompok dan ditambahkan oleh Park *et al.* (2004) dan Edreva (2005) menjadi 16 kelompok. Kelompok PR-9 dikenal sebagai **enzim peroksidase**, merupakan isozim dan diketemukan hampir pada semua tumbuhan (van Loon & van Strien, 1999; Edreva, 2005). Enzim proksidase mampu mengkatalisis reaksi senyawa fenolik menjadi senyawa kuinon dengan menghasilkan H₂O₂ yang bersifat toksik bagi patogen (Jang *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2007).

Contoh aplikasi gen peroksidase yang diekspresikan dengan reporter *gus* (β -glucuronidase) pada tomat (*Lycopersicon esculentum*) telah dilaporkan oleh Medina (1999), demikian pula pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) (Jang *et al.*, 2004). Enzim peroksidase yang diinduksi oleh patogen berbagai tumbuhan juga telah dilaporkan, misalnya pada mentimun (*Cucumis sativus*) (Alkahtani *et al.*, 2011), *Eustoma grandiflorum* (Popa *et al.*, 2009), kacang tanah (Ye & Ng, 2002), kacang kapri (Luhova *et al.*, 2003), *Phytolacca dioica* L (Guida *et al.*, 2010), dan Nurcahyani (2013) pada vanili.

Ketahanan yang di induksi oleh *Fusarium oxysporum* diindikasikan oleh meningkatnya PR-protein yang termasuk didalamnya: peroksidase, polifenol oksidase, kitinase dan β -1,3 glukanase (Saravanan, 2004; Mei *et al.*, 2004; Leelasuphakul *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2009; Alkhatani *et al.*, 2011). Selain bersifat toksik bagi patogen, enzim peroksidase juga berperan sebagai katalisator dalam proses pembentukan lignin (Bouizgarne *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007). Lea & Leegood (1999) mengemukakan bahwa pembentukan enzim peroksidase akan mendorong terbentuknya lignifikasi melalui jalur fenilpropanoid dan merupakan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen. Pada tanaman yang tahan terhadap patogen, fase awal infeksi patogen, akan terbentuk lignin yang tebal pada bagian dinding sel tanaman yang berhubungan dengan patogen, dan menghambat perkembangan hifa patogen (Stein *et al.* 1993).

B. Tanaman Anggrek Tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.)

Tanaman anggrek dikenal sebagai salah satu primadona tanaman unggul di dunia. Salah satunya adalah *Spathoglottis plicata* Bl. (anggrek tanah). *Spathoglottis plicata* termasuk ke dalam familia Orchidaceae dan merupakan anggrek yang sangat adaptif, dapat tumbuh baik di dataran rendah maupun tinggi. Disebut *S. plicata* karena memiliki daun yang bergelombang (*plicate leaf*) (Anonymous, 2014).



Gambar 1. Bunga *Spatoglottis plicata* Bl. (Anonymous, 2014)

Anggrek *S. plicata* cocok digunakan sebagai **tanaman model** induksi ketahanan (*induced resistance*) karena memiliki ciri-ciri antara lain: (1) mudah didapat karena dapat tumbuh diberbagai ketinggian tempat, (2) dapat tumbuh dengan cepat, dan (3) mudah dibudidayakan (Anonymous, 2013a). *Spathoglottis plicata* memiliki bunga yang berwarna ungu (Gambar 1) dan tumbuh pada tandan yang terletak di antara daun. Fungsi tanaman ini biasanya untuk penutup tanah dan sebagai *point of interest* jika ditanam secara merumpun (Anonymous, 2013b).

C. Penyakit Layu *Fusarium*

Fusarium oxysporum (*Fo*) patogen pada tanaman anggrek dapat bertahan secara alami di dalam medium tumbuh dan pada akar-akar tanaman sakit. Apabila terdapat tanaman peka, melalui akar yang luka dapat segera menimbulkan infeksi. (Semangun, 2001; Hadisutrisno, 2004). Perakaran menjadi busuk dan dapat meluas ke atas sampai ke pangkal batang. Jika akar rimpang dipotong akan tampak bahwa epidermis dan hipodermis berwarna ungu, sedang *phloem* dan *xylem* berwarna ungu merah jambu muda. Akhirnya seluruh akar rimpang menjadi berwarna ungu (Semangun, 2001)

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu Fusarium**, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati. Selain itu, *F. oxysporum* tidak diskriminatif, mereka dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting. *F. oxysporum* terbukti sangat sulit diberantas karena spora *F. oxysporum* juga dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama, sehingga rotasi tanaman bukan merupakan metode kontrol yang tepat (Djaenuddin, 2003)

D. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002).

Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, dan anyelir. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen.

E. Deteksi mutan dengan PCR dan protein

Seiring dengan semakin berkembangnya teknologi yang berbasis marka DNA, maka saat ini telah ditemukan tiga tipe marka DNA dengan segala kelebihan dan kekurangan masing-masing (Semagn *et al.*, 2006). Ke tiga tipe marka DNA adalah: (1) marka yang berdasarkan pada hibridisasi DNA (RFLP); (2) marka yang berdasarkan pada reaksi rantai polymerase RAPD dan AFLP; dan (3) marka yang berdasarkan pada PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik dalam DNA sasaran. (Azrai, 2005; Semagn *et al.*, 2006).

Marka molekular yang dapat dimanfaatkan dalam mengkaji ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* antara lain: RAPD. Prinsip kerja marka RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok marka dominan (Williams *et al.* 1990; Welsh & McClelland, 1990). Keunggulan dari teknik analisis menggunakan marka RAPD antara lain adalah (1) kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, (2) hemat biaya, (3) mudah dipelajari, dan (4)

primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh (Bardakci, 2001; Semagn *et al.*, 2006).

Perbandingan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis dapat dilakukan untuk mengidentifikasi produk gen yang dihasilkan selama planlet *S. plicata* diseleksi dengan AF. Menurut Maniatis *et al.* (1982), metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya.

BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

A. TUJUAN

Beberapa masalah didalam penanggulangan penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh *F.oxysporum* pada *S. plicata* selama ini belum terpecahkan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan:

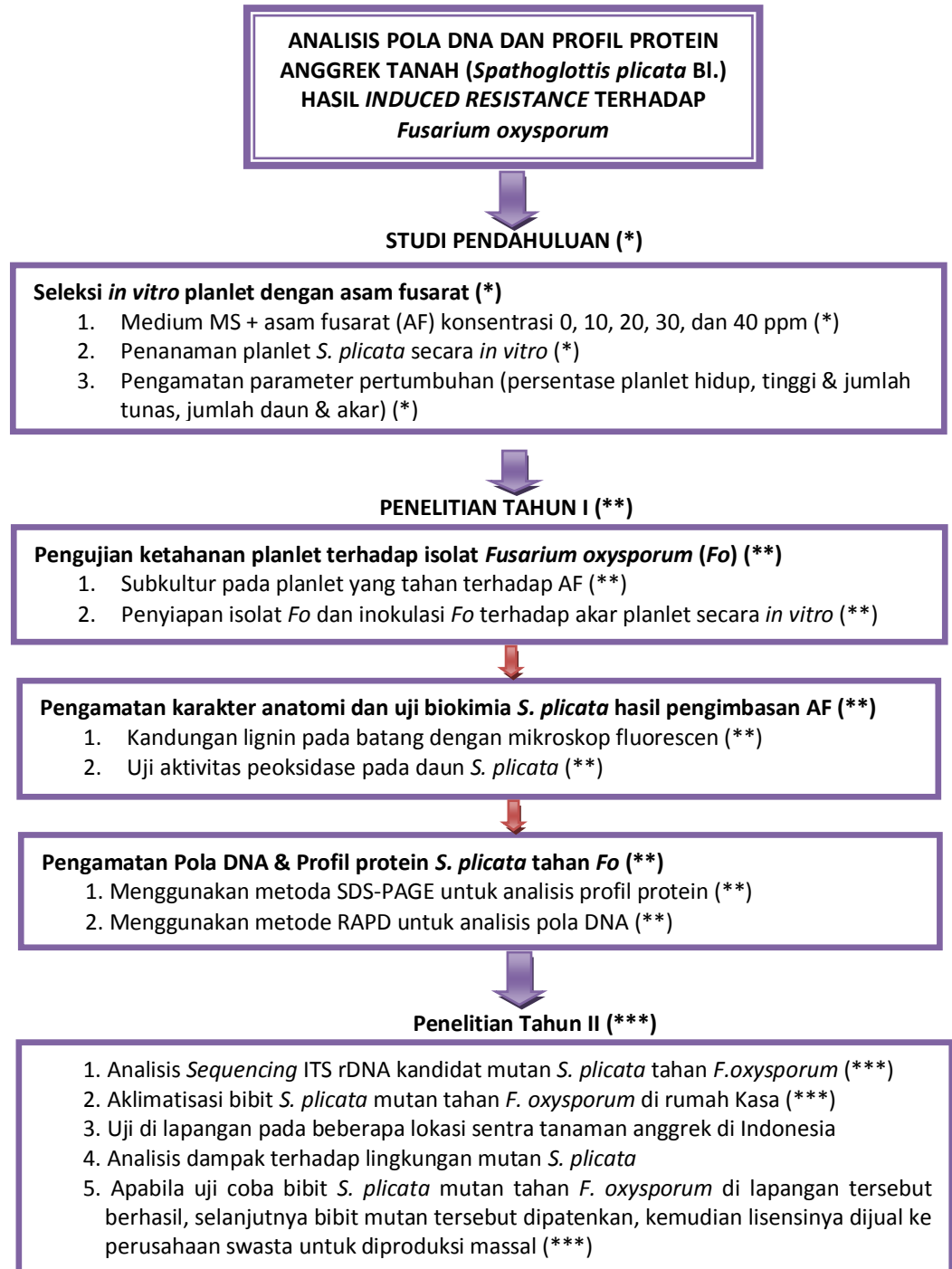
1. Mengetahui kisaran konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* secara *in vitro* dan mendapatkan teori tentang mekanisme ketahanan terimbas (*induced resistance*) *S. plicata* terhadap *F. oxysporum*.
2. Mengkaji ketahanan dan karakterisasi *S. plicata* yang bersifat tahan terhadap *F.oxysporum* secara *in vitro*
3. Mengkaji pola DNA dan Profil protein *S. plicata* yang bersifat tahan terhadap *F. oxysporum*.

B. MANFAAT

Manfaat penelitian yang diperoleh berupa teori tentang mekanisme ketahanan terimbas (*induced resistance*) anggrek tanah *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* menggunakan asam fusarat. Diharapkan dengan diketahuinya pengetahuan dasar tersebut, nantinya masyarakat luas pada umumnya dan bagi petani anggrek tanah di Indonesia pada khususnya dapat mempraktekkan sendiri metode tersebut secara lebih sederhana. Hal ini penting dilakukan, karena sudah saatnya para petani anggrek di Indonesia mengurangi ketergantungannya terhadap penggunaan fungisida dan beralih dengan menggunakan teknik pengendalian secara hayati, diantaranya dengan metode ketahanan terimbas. Secara ilmiah diharapkan dapat memberikan kontribusi bagi pengembangan ilmu pengetahuan terutama di bidang pemuliaan tanaman, analisis molekular, dan ilmu terapan yang terkait.

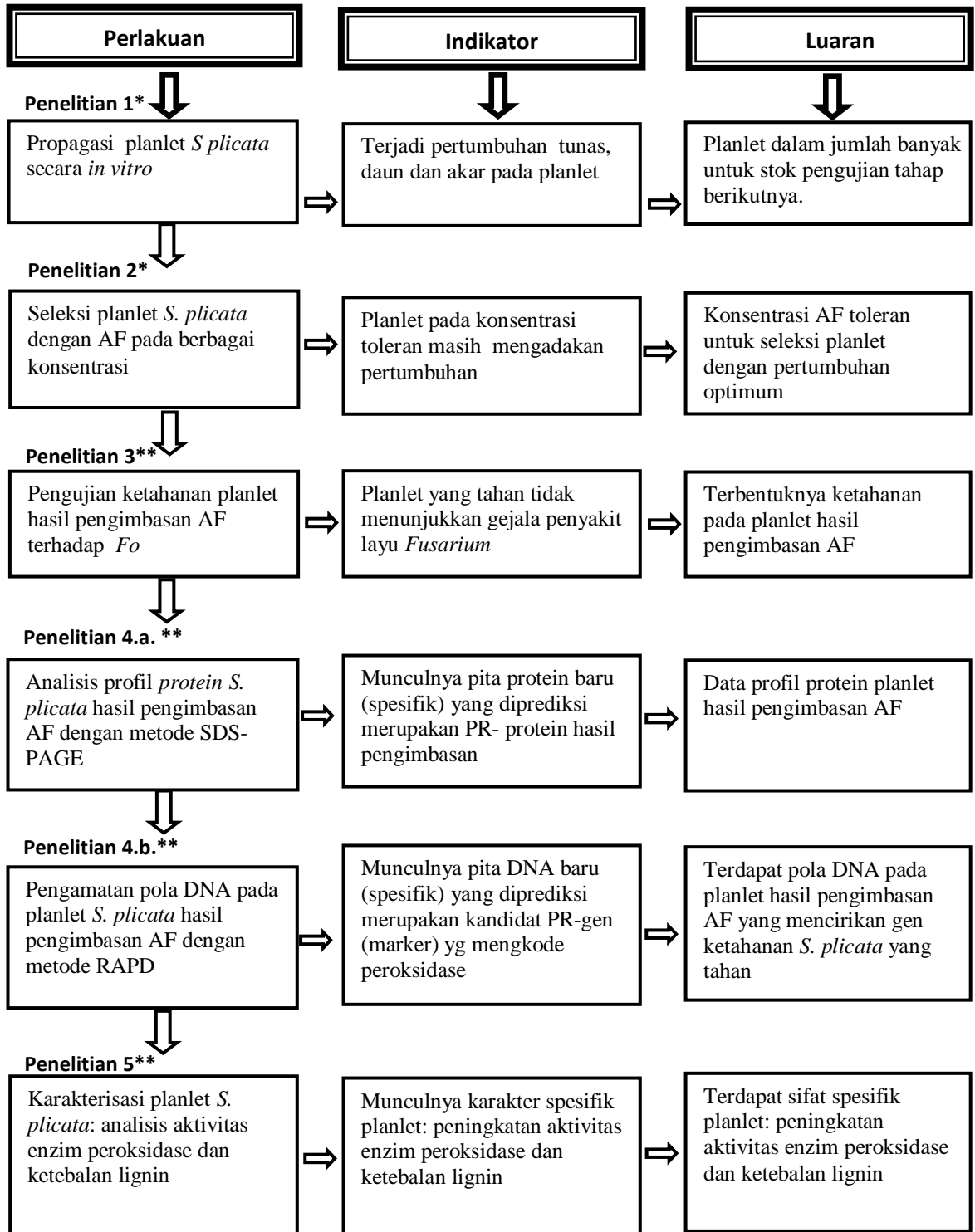
BAB IV. METODE PENELITIAN

A. Roadmap riset



keterangan : (*) Penelitian Pendahuluan yang sudah dilakukan
(**) Penelitian yang dilakukan (Tahun I)
(***) Penelitian yang akan dilakukan setelah kegiatan dalam penelitian Tahap I selesai dan akan diajukan ke proposal Tahun II

Tahapan penelitian pada Tahap I ini disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam Gambar 2.



Gambar 2. Bagan alir tahapan penelitian

- Ket: *) Tahap penelitian 1-2 sudah dilakukan dalam penelitian pendahuluan.
 **) Tahap penelitian 3-5 dikerjakan dalam penelitian Tahap I

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari tahap kegiatan yang diusulkan dalam proposal ini.

1. Pengujian ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *F. oxysporum*

Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fo* dilakukan secara langsung pada planlet dalam botol kultur. Mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan spora $1,8 \times 10^4$ per mL diteteskan pada planlet 1-2 tetes. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

2. Profil protein planlet *S. plicata*

Ekstraksi protein dilakukan menurut Maniatis *et al.* (1982). Setelah *crude protein* diperoleh, kemudian dilakukan pengukuran konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bio-rad (*Bio-rad Assay*). Penentuan konsentrasi protein dibaca dengan spektrofotometer pada panjang gelombang (OD 595 nm). Konsentrasi protein diketahui melalui persamaan fungsi kurva baku standar protein BSA. Penentuan berat molekul (BM) protein dilakukan melalui metode SDS-PAGE menurut Maniatis *et al.* (1982). Elektroforesis pada tegangan 100 volt dilakukan selama 1,5 sampai 2,5 jam (Khunsook *et al.*, 2003). Untuk mendeteksi adanya protein baru (spesifik) dilakukan dengan cara membandingkan profil protein daun planlet *S. plicata* yang tidak diimbasi dengan AF (kontrol) dengan planlet *S. plicata* yang diimbasi AF konsentrasi 10, 20, dan 30 ppm.

3. Pola DNA planlet

Isolasi DNA dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511 (Daryono & Natsuaki, 2002). Untuk analisis PCR, disiapkan DNA *template* yang telah dilarutkan dalam TE, *ice box*, dan primer yang digunakan (Tabel 1). Kemudian dibuat premix PCR dengan komposisi: kit KAPPA2G *Fast ReadyMix* sebanyak 12,5 µL, primer 2,5 µL pada konsentrasi 100 µM, DNA *template* 1,0 µL pada konsentrasi 40 ng/µL, dan dH₂O sebanyak 9,0 µL, sehingga volume totalnya adalah 25,00 µL.

Tabel 1 . Primer RAPD

No	Primer	Urutan Nukleotida (5'—3')	Referensi
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	Minoo <i>et al.</i> , 2008
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	Minoo <i>et al.</i> , 2008

Selanjutnya premix di amplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Kemudian dilakukan elektroforesis. Selanjutnya di *running* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Visualisasi hasil *running* elektroforesis pada gel dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator dan difoto sebagai dokumentasi.

4. Aktivitas enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Dibuat campuran 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 ml ekstrak enzim dari daun planlet *S. plicata*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂. Campuran diendapkan dalam suhu kamar dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer (*Beckman DU-65*) diatur dengan panjang gelombang 420 nm dan dibaca dari nol. Aktivitas enzim dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah aktivitas berubahnya OD 420 nm pada spektrofotometer per menit.

5. Lignifikasi

Pengamatan lignifikasi pada irisan melintang batang planlet *S. plicata* yang telah dilakukan pengimbasan AF dengan cara pengecatan safranin (Ruzin, 1999). Batang yang sudah bersih difiksasi terlebih dahulu dengan cara direndam dalam FAA dan disimpan selama 24 jam. Batang diiris dengan *sliding microtom* secara melintang dengan ketebalan 5-10 µm. Potongan irisan melintang direndam dalam safranin encer (1% w/v) selama 1,5 jam, kemudian dibilas dengan air suling. Jaringan batang yang terlignifikasi akan tampak berwarna merah muda.

Analisis data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *S. plicata* selama seleksi dengan AF berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di dukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan ulangan 30 eksplan per perlakuan.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) atau Anova dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda dari Duncan atau DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf kepercayaan 95% (Gomes & Gomes, 1984).

BAB V. HASIL dan PEMBAHASAN

Hasil penelitian dibagi dalam lima bagian, dimulai dari: 1) propagasi planlet *Spathoglottis plicata* Bl secara *in vitro* (penelitian pendahuluan); 2) hasil seleksi planlet *S. plicata* menggunakan asam fusarat (AF), untuk memperoleh kisaran konsentrasi AF toleran pada planlet *S. plicata* dengan pertumbuhan optimum; 3) hasil uji ketahanan planlet *S.plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* (*Fo*), yang meliputi: (a) hasil isolasi isolat dan monospora *Fo*; (b) hasil inokulasi *Fo* pada planlet *S. plicata*; 4) hasil karakterisasi planlet *S. plicata* akibat pengimbasan AF, meliputi: (a) analisis aktivitas enzim peroksidase; (b) analisis lignin 5) hasil analisis profil protein serta pola DNA dengan metode SDS-PAGE dan RAPD-PCR pada planlet *S. plicata* yang diimbas AF dan kontrol; Hasil penelitian dan pembahasannya berturut-turut disajikan sebagai berikut.

A. Propagasi *Spathoglottis plicata* secara *in vitro*

Hasil propagasi planlet anggrek tanah *Spathoglottis plicata* secara *in vitro* dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh planlet dalam jumlah banyak yang akan digunakan sebagai stok pengujian tahap berikutnya. Hasil propagasi planlet *S. plicata* secara *in vitro* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil propagasi planlet *S. plicata* secara *in vitro*

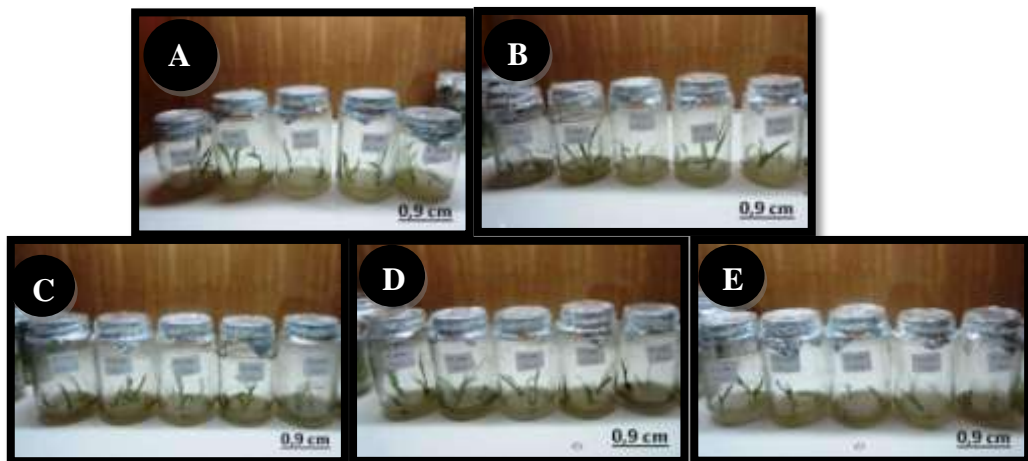
Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah VW padat, dengan penambahan sukrosa 30 g/L, PPM 0,5 mL/L dan perlakuan BAP dengan berbagai konsentrasi sebagai berikut: 0,0 mg/L; 0,5 mg/L; 1,0 mg/L. Penambahan ZPT ke dalam medium pada berbagai jenis maupun konsentrasi sangat mempengaruhi keberhasilan regenerasi tanaman secara *in vitro*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penambahan ZPT BAP 1 mg/L berpengaruh terhadap kemampuan regenerasi tunas yang paling optimum. Multiplikasi tunas dapat dirangsang dengan penambahan ZPT golongan sitokinin seperti *benzyl amino purine* (BAP). Keberadaan sel-sel yang bersifat totipotensi pada daerah nodus batang dapat diaktifkan dengan pemberian ZPT BAP pada konsentrasi yang tepat (Cuenca *et al.*, 2000).

Penelitian menggunakan BAP untuk merangsang pembentukan tunas antara lain pernah dilakukan oleh Kalimuthu *et al.* (2006). Regenerasi dan multiplikasi tunas dari nodus batang vanili dalam basal medium yang mengandung BAP 0,5-3,0 mg/L+10% air kelapa menghasilkan rata-rata 2-4 tunas baru selama 10-12 minggu. Nurcahyani (2013) mengemukakan bahwa dengan menggunakan eksplan nodus batang, inisiasi dan multiplikasi planlet vanili dilakukan dengan cara yang lebih sederhana dan efisien yaitu hanya dengan menggunakan satu macam ZPT (BAP), tanpa harus menggunakan banyak ZPT dan senyawa organik. Hasilnya adalah dari satu eksplan nodus batang dapat dihasilkan 3-6 tunas dalam waktu 12 minggu. Tunas lebih cepat terbentuk setelah eksplan ditanam pada medium MS+BAP 1 mg/L selama 7 hari.

Berdasarkan berbagai penelitian tentang mikropropagasi tanaman seperti yang telah diuraikan dimuka, rata-rata para peneliti menggunakan lebih dari satu macam ZPT dengan beberapa penambahan senyawa organik untuk inisiasi, multiplikasi dan pembentukan akar. Pada penelitian ini, inisiasi dan multiplikasi planlet *S. plicata* dilakukan dengan cara yang lebih sederhana dan efisien yaitu hanya dengan menggunakan satu macam ZPT (BAP), tanpa harus menggunakan banyak ZPT dan senyawa organik. Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan di atas, maka untuk penelitian tahap berikutnya, yaitu seleksi planlet *S. plicata* dengan menggunakan AF, medium yang digunakan adalah MS+BAP 1 mg/L.

B. Seleksi *in vitro* planlet *Spathoglottis plicata* dengan asam fusarat

Seleksi planlet angrek tanah *Spathoglottis plicata* dengan menggunakan asam fusarat (AF) dilakukan dengan menanam planlet pada medium *Vacin & Went* (VW) yang ditambahkan dengan asam fusarat (AF) dengan konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm, serta planlet yang tidak ditambahkan dengan AF (0 ppm) sebagai kontrol. Planlet kemudian diinkubasikan dalam waktu 4 minggu. Planlet *S. plicata* yang ditanam pada medium VW dengan penambahan AF berbagai konsentrasi disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Planlet *S. plicata* yang ditanam pada medium VW dengan penambahan AF berbagai konsentrasi umur satu minggu. A= kontrol (0 ppm), B= konsentrasi AF (10 ppm), C= konsentrasi AF (20 ppm), D= konsentrasi AF (30 ppm), dan E= konsentrasi AF (40 ppm).

Hasil seleksi menunjukkan bahwa planlet masih bisa bertahan hidup sampai pada konsentrasi AF 30 ppm, sedangkan perlakuan AF 40 ppm planlet mampu bertahan hidup hingga 86,70% sampai minggu ke-IV. Hasil seleksi planlet angrek tanah berdasarkan persentase jumlah planlet hidup dengan berbagai konsentrasi AF disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada minggu I, II, dan III pada konsentrasi 10, 20, 30, 40 ppm, dan kontrol persentase jumlah planlet hidup mencapai 100%. Planlet *S. plicata* yang diperlakukan dengan konsentrasi 10, 20, 30 ppm pada

minggu IV tidak mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 40 ppm mengalami kematian 13,3 %.

Tabel 2. Persentase jumlah planlet hidup hasil seleksi dengan asam fusarat

Konsentrasi Asam fusarat (ppm)	Persentase jumlah planlet hidup pada minggu (%)			
	I	II	III	IV
0	100	100	100	100
10	100	100	100	100
20	100	100	100	100
30	100	100	100	100
40	100	100	100	86,7

Jumlah planlet pada konsentrasi AF 0-40 ppm pada minggu I menunjukkan 100% hidup dan secara visual semuanya hijau. Mulai minggu II planlet yang ditanam pada medium AF 10-40 ppm menunjukkan adanya perubahan secara visual bewarna hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat atau *browning*. Persentase dan visualisasi planlet *S. plicata* hasil seleksi dengan berbagai konsentrasi AF disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase dan visualisasi planlet *S. plicata* hasil seleksi dengan berbagai konsentrasi asam fusarat

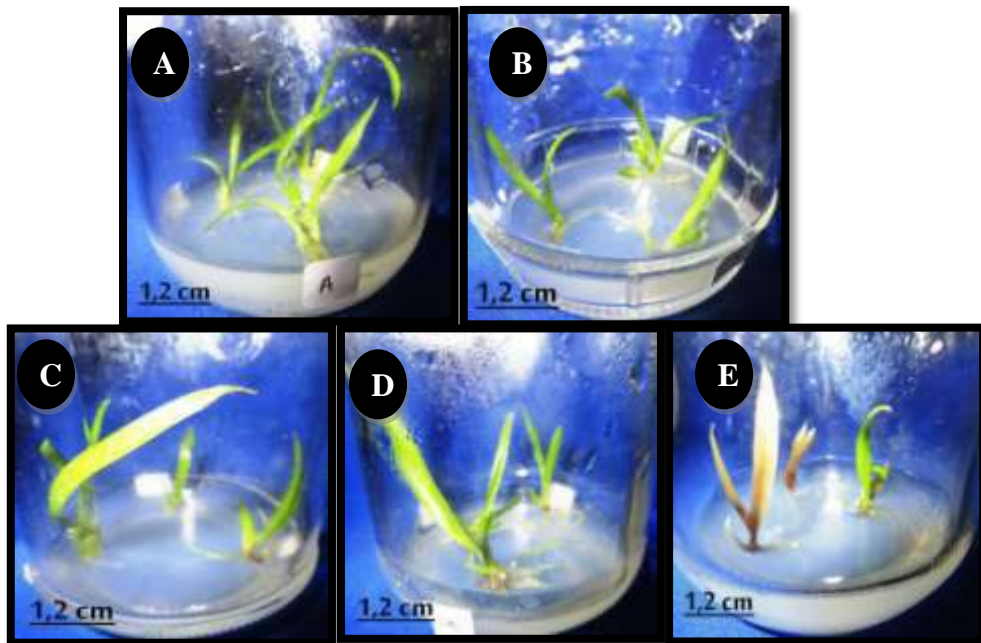
Konsentrasi asam fusarat (ppm)	Persentase dan visualisasi planlet pada minggu (%)			
	I	II	III	IV
0	H : 100	H : 100	H : 100	H : 100
10	H : 100	H : 73,3 HC : 26,7	H : 66,7 HC : 33,3	H : 46,7 HC : 53,3
20	H : 100	H : 66,7 HC : 33,3	H : 66,7 HC : 33,3	H : 46,7 HC : 53,3
30	H : 100	H : 66,7 HC : 33,3	H : 53,3 HC : 46,7	H : 40 HC : 60
40	H : 100	H : 60 HC : 40	H : 46,7 HC : 53,3	H : 46,7 HC : 40 C : 13,3

Keterangan: H : Hijau
 HC : Hijau dengan bagian tertentu berwarna coklat
 C : Cokelat atau *browning*

Planlet pada konsentrasi AF 40 ppm minggu II menunjukkan adanya perubahan secara visual yaitu bewarna hijau dengan bagian tertentu mengalami *browning* dengan persentase paling tinggi sebesar 40%. Planlet yang ditanam

pada konsentrasi AF 40 ppm secara visual menunjukkan *browning* pada minggu IV dan mengalami kematian.

Hasil seleksi kenampakan secara visual planlet yang semula berwarna hijau menjadi hijau cokelat pada bagian tertentu, dan *browning* setelah diberi perlakuan dengan AF disajikan pada Gambar 5. Planlet yang tahan AF, *browning* hanya terjadi pada bagian ujung daun (Gambar 5B, C, D), sedangkan planlet yang tidak tahan AF akan mengalami *browning* yang cepat meluas ke seluruh bagian planlet (Gambar 5E).



Gambar 5. Pertumbuhan planlet *S. plicata* umur 4 minggu pada berbagai konsentrasi AF. A= 0 ppm (kontrol), B= 10 ppm, C= 20 ppm, D= 30 ppm, dan E= 40 ppm

Setelah planlet *S. plicata* diseleksi dengan AF selama 4 minggu, selanjutnya disubkultur ke dalam medium VW + BAP tanpa AF (medium multiplikasi). Pemandahan planlet ke dalam medium multiplikasi bertujuan untuk pemulihan planlet dari tekanan akibat perlakuan AF dan untuk perbanyakkan planlet yang pada seleksi awal tahan. Pada tahap ini, jumlah planlet untuk tiap perlakuan berbeda sesuai dengan jumlah planlet yang diperoleh pada seleksi dengan AF. Hasil pengamatan persentase jumlah planlet hidup pada medium multiplikasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase jumlah planlet *S. plicata* yang hidup pada medium multiplikasi

Konsentrasi AF (ppm)	Persentase jumlah planlet hidup minggu			
	I	II	III	IV
0	100,00	100,00	100,00	100,00
10	30,00	30,00	30,00	26,00
20	10,00	10,00	10,00	10,00
30	20,00	20,94	13,00	13,00
40	33,00	33,00	30,00	30,00

Keterangan: Jumlah awal planlet *S. plicata* pada medium multiplikasi tergantung jumlah planlet yang diperoleh pada seleksi dengan AF masing-masing perlakuan

Pada minggu I, pertumbuhan planlet setelah disubkultur ke dalam medium multiplikasi masih lambat, karena planlet mulai beradaptasi dengan lingkungan yang baru. Pemindahan planlet ke medium tanpa toksin setelah seleksi dalam jangka waktu tertentu mempunyai arti penting terutama untuk pemulihan planlet dari tekanan akibat perlakuan AF yang diberikan dan untuk perbanyak planlet yang pada awal seleksi tahan. Penggunaan medium yang sesuai sangat berperan dalam tahap ini. Pada minggu II sampai IV persentase jumlah planlet hidup menunjukkan kecenderungan stabil. Sampai dengan minggu IV, persentase jumlah planlet hidup paling sedikit diperoleh pada planlet yang diseleksi AF konsentrasi 20 ppm (10,00%), karena planlet yang tahan pada konsentrasi ini paling sedikit. Pada perlakuan AF 10, 30 dan 40 ppm dihasilkan jumlah planlet sebesar 26,00%, 13,00%, dan 30,00% (Tabel 4).

Bedasarkan planlet-planlet vanili yang tahan terhadap AF ini, diharapkan muncul pula planlet *S. plicata* yang juga tahan terhadap *Fo*. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman yang tahan terhadap AF mempunyai ketahanan juga terhadap penyakit layu yang disebabkan oleh *F. oxysporum* (Toyoda *et al.*, 2003).

C. Pengujian ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*

Setelah diperoleh planlet-planlet yang tahan terhadap AF pada seleksi dengan AF, selanjutnya diuji ketahanannya terhadap jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) dengan langkah-langkah sebagai berikut.

1. Isolasi isolat dan monospora *F. oxysporum*

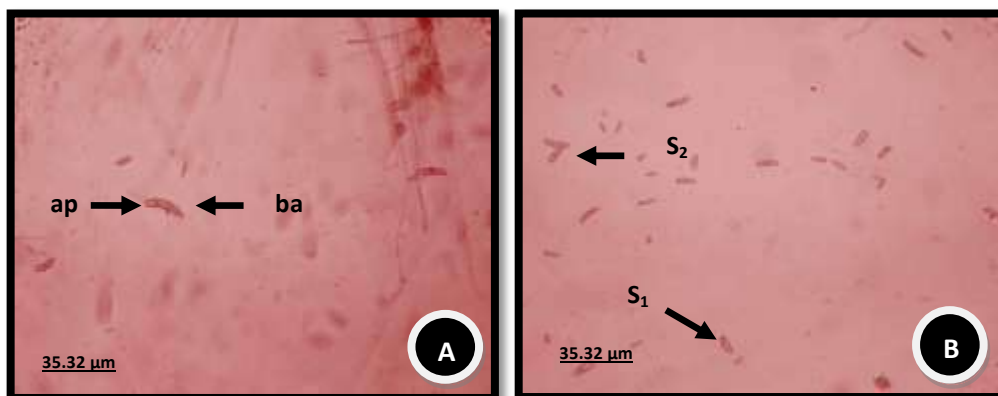
Hasil isolasi *Fo* menunjukkan adanya variasi warna koloni, ukuran konidium dan diameter koloni (Tabel 5).

Tabel 5. Warna, ukuran konidium, dan diameter koloni *Fusarium oxysporum*

Asal isolat	Warna koloni	Ukuran konidium (μm)		Diameter koloni (cm)
		Makro	Mikro	
Cangkriman, Sleman	Putih keunguan	18,79-24,64 x 5,69-6,93 ^a	8,16-11,19 x 4,62-6,41 ^a	4,59-5,40 ^a
	Putih kemerahan	18,60-26,64 x 5,74-6,56 ^a	8,61-14,68 x 4,69-6,87 ^a	5,79-6,00 ^a

Keterangan: ^a: diukur 7 hari setelah inokulasi pada medium PDA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa makrokonidium yang ditemukan mempunyai variasi ukuran antara 18,60-26,64 x 5,69-6,93^a μm , berbentuk agak melengkung, kebanyakan dengan 3 sekat (Tabel 5 dan Gambar 6A).



Gambar 6. Karakter morfologis hasil isolasi *Fusarium oxysporum*. A= makrokonidium, B= mikrokonidium, ap= sel apikal, ba= sel basal, S₁= sel tunggal, S₂= sel bersekat.

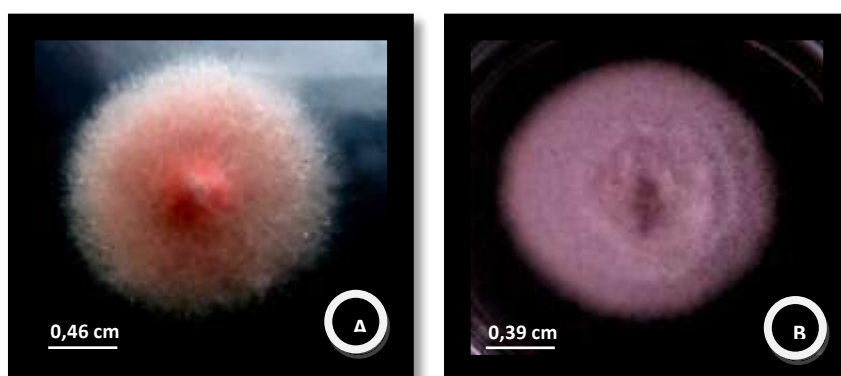
Mikrokonidium yang ditemukan pada penelitian ini ukurannya berkisar antara 8,16-14,68 x 4,62-6,87 μm , berbentuk *oval-elipsoid* bersel tunggal atau bersekat (Tabel 5 dan Gambar 6B). Diameter koloni isolat dari *Fo* pada penelitian ini bervariasi antara 4,59 – 6,00 cm (Tabel 5).



Gambar 7. Hifa *Fusarium oxysporum* dengan A= klamidospora (kl) dan B= konidiofor (ko).

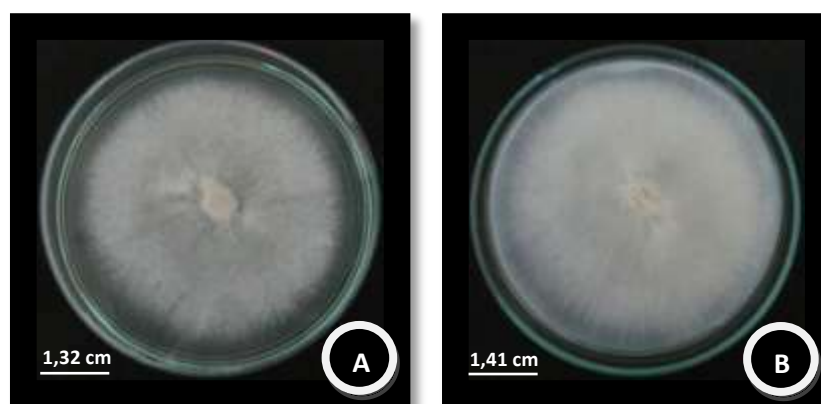
Pada pengamatan, klamidospora tampak tunggal atau berpasangan, berbentuk bulat agak lonjong, berwarna cokelat muda, berdinding tebal (Gambar 7A), terletak di tengah (interkalar) atau ujung hifa (terminal), demikian pula dengan konidiofornya (Gambar 7B).

Koloni isolat *Fo* yang ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) menunjukkan variasi, dari putih kemerahan sampai putih keunguan (Gambar 8).



Gambar 8. Koloni isolat *F. oxysporum* dalam medium PDA, A= koloni berwarna putih kemerahan, B= koloni berwarna putih keunguan.

Fusarium adalah salah satu jamur yang mempunyai variabilitas tinggi karena sifat genetik dan respon fenotipiknya terhadap perubahan lingkungan (Windels, 1993). Oleh karena itu untuk mendapatkan sifat yang seragam dan stabil dari jamur ini, perlu dilakukan isolasi monospora untuk memperoleh varian yang stabil, sehingga apabila digunakan untuk uji-uji selanjutnya diharapkan memberikan hasil yang konsisten. Hasil isolasi monospora *Fo* disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Hasil isolasi monospora *Fusarium oxysporum* dalam medium PDA. A= permukaan atas, B= permukaan bawah.

Berdasarkan Gambar 9 tampak koloni monospora yang dihasilkan berwarna putih baik pada permukaan bawah maupun atas. Pada tahap berikutnya, monospora ini akan digunakan untuk pengujian ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*.

2. Inokulasi *F. oxysporum* pada planlet *S. plicata*

Metode inokulasi yang digunakan dalam uji ketahanan planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF adalah dengan menginokulasikan secara langsung suspensi mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan konidium $1,9 \times 10^4$ per ml pada planlet sebanyak 1-2 tetes di dalam botol kultur secara *in vitro*, dengan ulangan setiap perlakuan sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam (Hadisutrisno, 1995). Berdasarkan pengamatan dengan menghitung jumlah daun planlet yang dilakukan setiap hari selama 4 minggu,

menunjukkan adanya gejala layu pada planlet *S. plicata* di dalam botol kultur. Perlakuan inokulasi ini dilakukan secara *in vitro*, sehingga kondisi lingkungan bisa dijaga.

Berdasar pengamatan terhadap planlet *S. plicata* hasil pengimbasan yang diuji tampak bahwa pada hari ke-4 setelah inokulasi muncul gejala daun layu pada kontrol. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 0, 10, 20 dan 30 ppm. Gejala tersebut merupakan karakteristik layu *Fusarium* (Hadisutrisno, 2004), sehingga dapat dilakukan perhitungan persentase daun layu atau kuning (Tabel 6).

Tabel 6. Persentase daun layu atau kuning pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan	Persentase daun layu atau kuning pada hari pengamatan ke-				
	0	4	12	20	28
Kontrol	0	26,00	46,00	93,00	100,00
10 ppm	0	00,00	06,00	60,00	86,00
20 ppm	0	00,00	00,00	13,00	13,00
30 ppm	0	00,00	00,00	00,00	13,00
40 ppm	0	00,00	00,00	00,00	03,00

Berdasarkan Tabel 6, gejala daun layu atau kuning yang muncul pada hari ke-4 setelah inokulasi menunjukkan bahwa persentase daun layu atau kuning pada kontrol telah mencapai rata-rata 26,00% dan hari ke-12 meningkat menjadi 46%. Pada perlakuan 10 ppm persentase daun layu atau kuning baru muncul pada hari ke-12 mencapai 06,00%, sedangkan perlakuan 20 ppm baru menunjukkan gejala daun layu pada hari ke-20 dengan persentase 13%. Konsentrasi 30 ppm gejala daun kuning baru muncul pada hari ke-28 dengan persentase 13%. Kenaikan persentase daun layu atau kuning pada pengamatan hari ke-20 terjadi pada kontrol, perlakuan 10 ppm dan 20 ppm (93,75%; 60,00%; dan 13,00%). Persentase daun layu atau kuning pada hari ke-28 setelah inokulasi, pada kontrol meningkat menjadi 100% dan pada perlakuan 10 ppm terjadi peningkatan pula menjadi 86,00%, sedangkan pada perlakuan 20 dan 30 ppm tidak mengalami kenaikan persentase tetap 13,00%. Pada konsentrasi 40 ppm hanya 3% planlet

yang menunjukkan gejala kuning atau layu setelah satu bulan diinokulasi dengan *Fusarium*.

Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala daun layu atau kuning yang muncul maka dapat diketahui persentase intensitas penyakit dan kriteria ketahanan dari masing-masing perlakuan (Tabel 7).

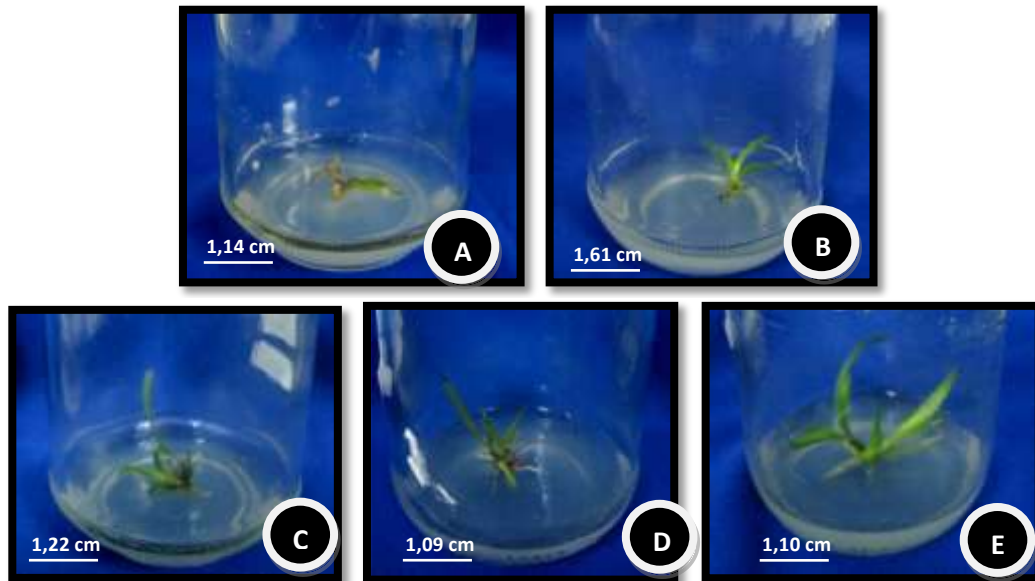
Tabel 7. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan dan tingkat ketahanan planlet *S. plicata* pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan	Hari pengamatan							
	4		12		20		28	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
Kontrol	33,00	Moderat	83,00	Rentan	91,00	Rentan	100,00	Rentan
10 ppm	00,00	Tahan	33,00	Moderat	66,00	Rentan	83,00	Rentan
20 ppm	00,00	Tahan	00,00	Tahan	33,00	Moderat	33,00	Moderat
30 ppm	00,00	Tahan	00,00	Tahan	00,00	Tahan	33,00	Moderat
40 ppm	00,00	Tahan	00,00	Tahan	00,00	Tahan	25,00	Tahan

Keterangan: IP= Intensitas Penyakit

Berdasarkan Tabel 8 diketahui bahwa pada hari ke-28, intensitas penyakit tertinggi ditunjukkan oleh kontrol (100%) disusul konsentrasi 10 ppm (83,00%) sehingga dinyatakan rentan terhadap penyakit layu *Fusarium*, sedangkan perlakuan 20 dan 30 ppm memiliki intensitas penyakit 33,00%, dan kriteria ketahanannya adalah moderat. Pada perlakuan 40 ppm intensitas penyakit sebesar 25% sehingga kriteria ketahanannya adalah tahan. Berdasar hal tersebut dapat diketahui bahwa intensitas penyakit perlakuan AF 40 ppm tidak mengalami perubahan sejak hari ke-4 hingga ke-20.

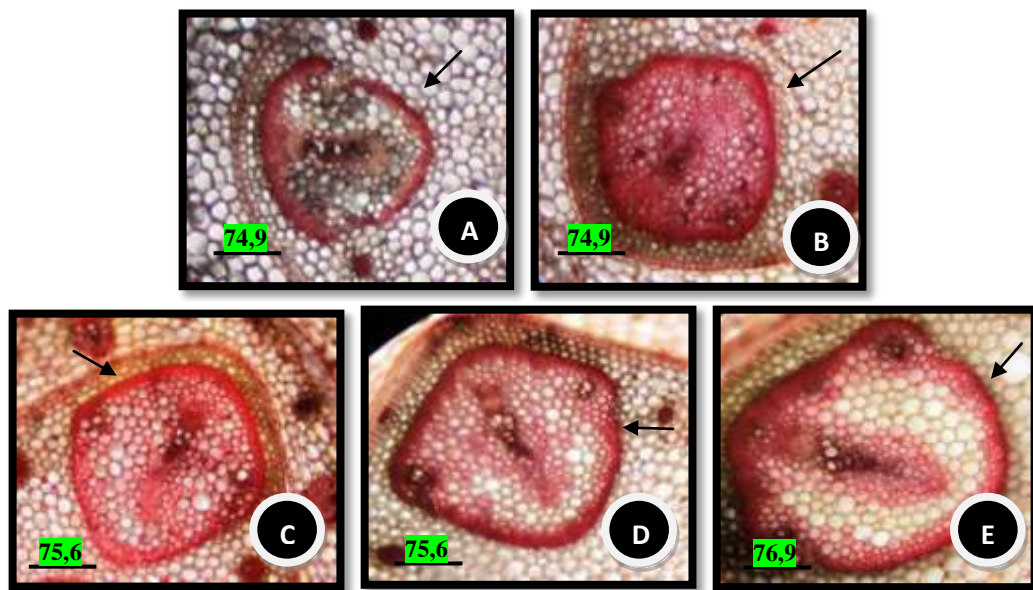
Berdasarkan data intensitas penyakit dan kategori ketahanannya, dapat diketahui pula bahwa perlakuan AF 40 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik, dapat menekan intensitas penyakit hingga 25% dan menaikkan kriteria menjadi tahan. Hal ini menunjukkan bahwa AF mampu mengimbas ketahanan planlet *S. plicata* terhadap penyakit layu *Fusarium*. Planlet *S. plicata* umur 28 hari setelah diinokulasi dengan *Fo* disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Hasil inokulasi *F. oxysporum* pada planlet *S. plicata* umur 28 hari setelah perlakuan. A= planlet kontrol, B= planlet hasil pengimbasan AS 10 ppm, C= planlet hasil pengimbasan AS 20 ppm, D= planlet hasil pengimbasan AS 30 ppm, E= planlet hasil pengimbasan AS 40 ppm

D. Analisis Lignin

Parameter lain yang dapat menunjukkan terjadinya mekanisme ketahanan planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF adalah terjadinya lignifikasi pada jaringan berkas pengangkut planlet. Lignin merupakan polimer fenol yang berantai panjang dan terbentuk di tempat terjadinya infeksi serta sukar terdegradasi oleh mikroorganisme (Goodman *et al.*, 1986). Penambahan tebal lignin pada dinding xilem (berkas pengangkut) sebagai salah satu mekanisme ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*, telah diamati pada batang (bulbus) planlet *S. plicata* yang diimbas AF (konsentrasi 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm dan 40 ppm) dibandingkan dengan kontrol atau tidak diimbas AF (Gambar 11).



Gambar 11. Irisan melintang batang planlet *S. plicata* yang mengandung lignin (merah muda pada dinding sel). Tanda panah (→) menunjukkan penebalan lignin yang meningkat pada planlet *S. plicata* yang diperlakukan AF. A= kontrol; B, C, dan D= planlet *S. plicata* diimbasi asam fusarat konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm.

Untuk mendeteksi terjadinya lignifikasi dilakukan pengamatan irisan melintang batang planlet *S. plicata* dengan menggunakan pereaksi *phloroglucinol*. Gambar 11 menunjukkan bahwa jaringan xilem pada batang yang terimbasi, dindingnya mengalami penebalan yang ditandai dengan lebih tebalnya warna merah muda pada jaringan yang mengandung lignin. Lignin terbentuk hampir pada semua perlakuan dan lebih sering terbentuk pada jaringan xilem.

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa baik pada batang planlet *S. plicata* kontrol maupun yang diimbasi AF mengalami lignifikasi, oleh karena itu, pengaruh perlakuan cekaman AF bisa dideteksi efeknya antara lain melalui pengukuran ketebalan lignin pada dinding berkas pengangkut (Tabel 8).

Tabel 8 menunjukkan adanya peningkatan ketebalan lignin pada dinding sel xilem pada perlakuan 10 ppm =16,26 μm ; 20 ppm =18,49 μm ; 30 ppm =18,49 μm dan 40 ppm 21,29 μm dibandingkan kontrol 12,69 μm . Semakin tinggi konsentrasi AF maka lignin semakin tebal. Hal ini menunjukkan bahwa planlet

S. plicata memberi tanggapan ketahanan melalui penambahan tebal lignin setelah diperlakukan dengan AF.

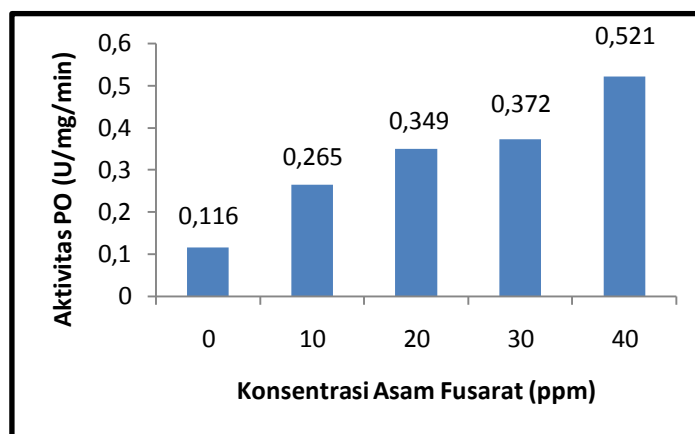
Tabel 8. Rata-rata ketebalan lignin (μm) planlet *S. plicata* yang tidak diimbis (kontrol) dan diimbis asam fusarat (10, 20, 30 dan 40 ppm)

Perlakuan	Rata-rata ketebalan lignin (μm), N: 30
0 ppm	$12,69 \pm 0,03^a$
10 ppm	$16,26 \pm 0,07^b$
20 ppm	$18,49 \pm 0,04^c$
30 ppm	$19,29 \pm 0,05^d$
40 ppm	$21,29 \pm 0,06^d$

Keterangan: Angka yang diikuti huruf yang tidak sama dalam satu kolom berbeda nyata berdasarkan uji Duncan pada derajat kepercayaan 95%, setelah ditransformasikan ke $\sqrt{x+1}$

E. Analisis aktivitas enzim peroksidase

Hasil analisis aktivitas enzim peroksidase planlet *S. plicata* yang di tanam pada medium VW dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan dalam suatu histogram pada Gambar 12.



Gambar 12. Histogram hubungan antara aktivitas enzim peroksidase planlet anggrek tanah yang tidak diimbis (kontrol) dan diimbis asam fusarat (10, 20, 30, dan 40 ppm)

Gambar 12 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang signifikan dari empat konsentrasi AF yang berbeda. Pada

kontrol (0 ppm) menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,116 U/mg/min. Konsentrasi AF 10 ppm mengakibatkan aktivitas enzim peroksidase meningkat sebesar 0,265 U/mg/min, konsentrasi AF 20 ppm menyebabkan aktivitas enzim peroksidase menjadi 0,349 U/mg/min, konsentrasi AF 30 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase 0,372 U/mg/min, dan pada konsentrasi AF 40 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,521 U/mg/min. Peningkatan aktivitas enzim peroksidase sejalan dengan meningkatnya cekaman AF.

F. Analisis DNA planlet *Spathoglottis plicata* dengan metode RAPD-PCR

➤ Isolasi DNA planlet *S. plicata*

Dalam tahap ini telah berhasil diisolasi total genom DNA daun planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF pada konsentrasi 10, 20, 30, 40 ppm dan tidak diimbasi dengan AF (kontrol) untuk sejumlah sampel acak, dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511. Analisis DNA pada planlet *S. plicata* didahului dengan mengukur kualitas dan kuantitas DNA planlet *S. plicata*. Untuk analisis pola DNA, secara acak diambil masing-masing 1 sampel daun *S. plicata* yang rentan (10 ppm), moderat (20 ppm dan 30 ppm) dan tahan (40 ppm), serta kontrol sehingga diperoleh 5 sampel.

a. Kualitas dan kuantitas DNA *S. plicata*

Isolasi total genom DNA daun planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF pada konsentrasi 10, 20, 30, 40 ppm dan tidak diimbasi dengan AF (kontrol) telah dilakukan untuk sejumlah sampel acak, dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511. Hasilnya adalah berupa nilai kemurnian DNA dan konsentrasi DNA (Tabel 9).

Tabel 9. Hasil pengukuran kemurnian DNA dan konsentrasi DNA 5 sampel daun *S. plicata* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30 dan 40 ppm)

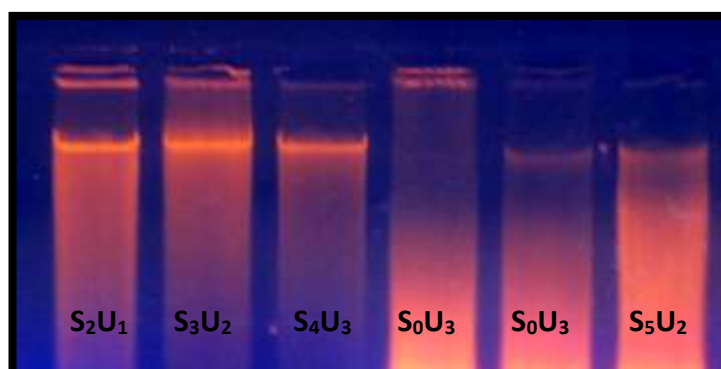
No	Sampel	Kemurnian DNA ($A_{260/280}$)	Konsentrasi DNA (ng/ μ L)
1	S ₀ U ₃	1,864	483,6
2	S ₁ U ₁	1,854	473,6
3	S ₂ U ₂	1,860	484,7
4	S ₃ U ₃	1,870	608,6
5	S ₄ U ₂	1,880	603,1

Keterangan:

- 1 = planlet *S. plicata* kontrol (S₀U₃)
- 2 = planlet *S. plicata* diimbas AF konsentrasi 90 ppm (S₁U₁)
- 3 = planlet *S. plicata* diimbas AF konsentrasi 100 ppm (S₂U₂)
- 4 = planlet *S. plicata* diimbas AF konsentrasi 110 ppm (S₃U₃)
- 5 = planlet *S. plicata* diimbas AF konsentrasi 40 ppm (S₄U₂)

Kualitas dan kuantitas DNA diukur dengan menggunakan spektrofotometer (*Beckman, DU-65*). Tabel 9 menunjukkan bahwa DNA yang diperoleh mempunyai kualitas dan kuantitas yang relatif baik. Kemurnian DNA diperoleh dari perbandingan absorbansi $A_{260/280}$. Nilai ratio kemurnian DNA *S. plicata* hasil isolasi berkisar antara 1,843 – 2,000. Hal ini sesuai dengan pendapat Sambrook *et al.* (1989) yang menyatakan bahwa nilai ratio kemurnian DNA yang baik adalah pada kisaran 1,800 -2,000.

Pada penelitian ini, konsentrasi DNA dari semua sampel daun *S. plicata* untuk *template* dalam reaksi PCR diseragamkan kira-kira sebesar 40 ng/ μ L dengan pengenceran. Hasil isolasi DNA 5 sampel daun *S. plicata* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30 dan 40 ppm) disajikan pada Gambar 16.



Gambar 16. Hasil isolasi DNA 5 sampel daun *S. plicata* control (S₀U₃) dan diimbas asam fusarat (10 ppm_ S₂U₁, 20 ppm_ S₃U₂, 30 ppm_ S₄U₃ dan 40 ppm_ S₅U₂)

b. Analisis pita RAPD

Berdasarkan hasil amplifikasi *sequence* DNA dengan menggunakan 2 primer pada 5 sampel planlet *S. plicata* kontrol dan diimbas AF (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) menghasilkan total 20 pita DNA. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD dari 5 sampel planlet *S. plicata* tersebut disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD pada planlet *S. plicata* kontrol dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30, dan 40 ppm)

No	Primer	Urutan Basa Nukleotida (5'-3')	Jumlah Pita RAPD	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Monomorfik	Ukuran Pita RAPD (bp)
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	05	01	04	150 – 1400
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	07	01	06	100 – 1250
Total			12	02	10	100 – 1400

Keterangan:

bp: *base pair*

Pita= *band= fragmen*

Tabel 10 menunjukkan bahwa secara keseluruhan, amplifikasi 2 primer (OPB_14 dan OPB_20) menghasilkan jumlah pita DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 5 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 100 bp sampai 1400 bp. Pemilihan primer pada analisis RAPD berpengaruh terhadap tingkat polimorfisme pita DNA yang dihasilkan. Hal ini disebabkan setiap primer memiliki situs penempelan tersendiri sehingga pita DNA yang dihasilkan berbeda. Polimorfisme merupakan suatu bentuk variasi genetik yang terjadi dalam rantai DNA. Jumlah pita DNA polimorfik menentukan keragaman suatu populasi karena pita DNA polimorfik menggambarkan keadaan genom tanaman (Hartati *et al.*, 2007).

Pada penelitian ini pemilihan primer didasarkan pada penelitian yang dilakukan oleh Minoo *et al.*, (2008) yang meneliti variasi genetik dan hubungan kekerabatan pada spesies *Vanilla planifolia*. Dari 9 primer yang digunakan pada penelitian tersebut, 3 primer menghasilkan pita DNA polimorfik sebesar 100% yaitu primer OPB_14 (6 pita DNA) dan OPB_20 (8 pita DNA), total keseluruhan ada 14 pita DNA. Hasil penelitian pada planlet *S. plicata* kontrol dan yang diimbas AF, dengan menggunakan primer yang sama, menghasilkan jumlah pita

DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 5 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 100 bp sampai 1400 bp.

Elektroforesis hasil amplifikasi PCR-RAPD dengan 2 primer tersebut menghasilkan 4 pola pita DNA. Pola pita DNA planlet *S. plicata* yang tidak diimbas (kontrol) maupun diimbas AF (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) pada masing-masing primer disajikan pada Tabel 11 dan 12.

1. Primer OPB_14

Primer OPB_14 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji pada Tabel 11.

Pada Tabel 11 menunjukkan bahwa pita DNA ukuran 150, 250, 400, dan 750 bp terbentuk pada semua sampel, baik pada planlet *S. plicata* kontrol maupun yang diimbas AF. Pada planlet *S. plicata* yang diimbas AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1400 bp.

Tabel 11. Pola pita DNA planlet *S. plicata* kontrol dan diimbas asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_14

Pola pita DNA-1		Pola pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
S₀U₃	150	S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃, S₄U₂	150
	250		250
	400		400
	750		750
			1400*

Keterangan: Pola pita DNA-1: **S₀U₃** (kontrol) menghasilkan 4 pita yang identik; Pola pita DNA-2: **S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃, S₄U₂** menghasilkan 5 pita yang identik, dan 4 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

2. Primer OPB_20

Primer OPB_20 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji dalam Tabel 12.

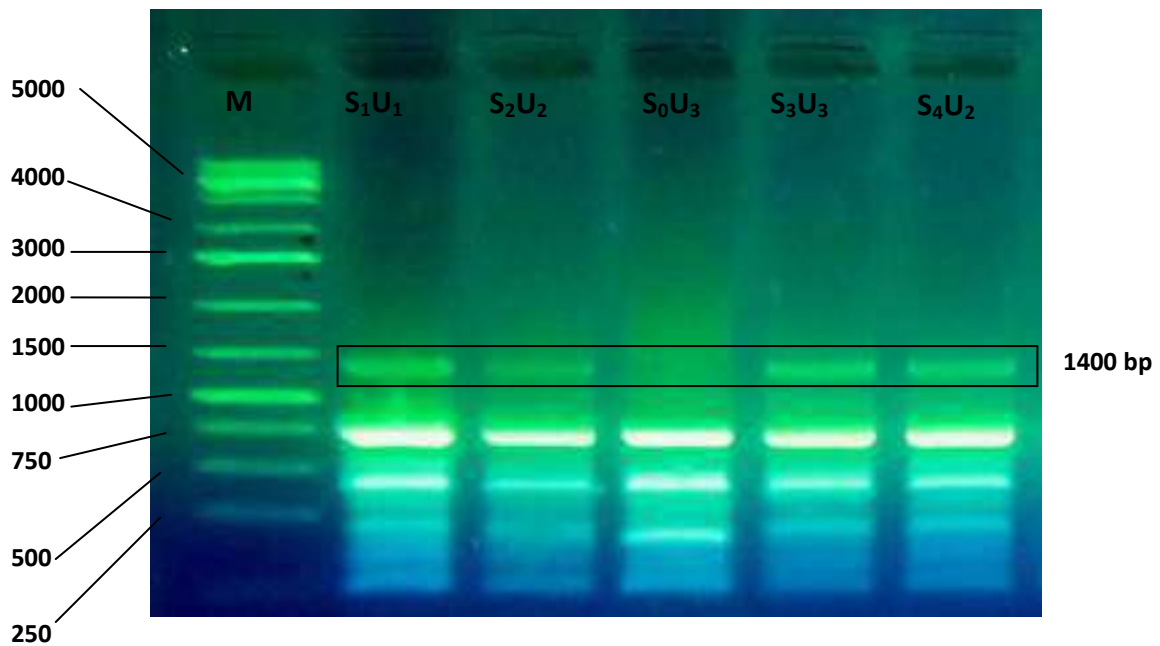
Tabel 12. Pola pita DNA planlet *S. plicata* kontrol dan diimbis asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_20

Pola Pita DNA-1		Pola Pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
	100		100
	150	S₁U₁	150
S₀U₃	250	S₂U₂	250
	300	S₃U₃	300
	500	S₄U₂	500
	800		800
			1250*

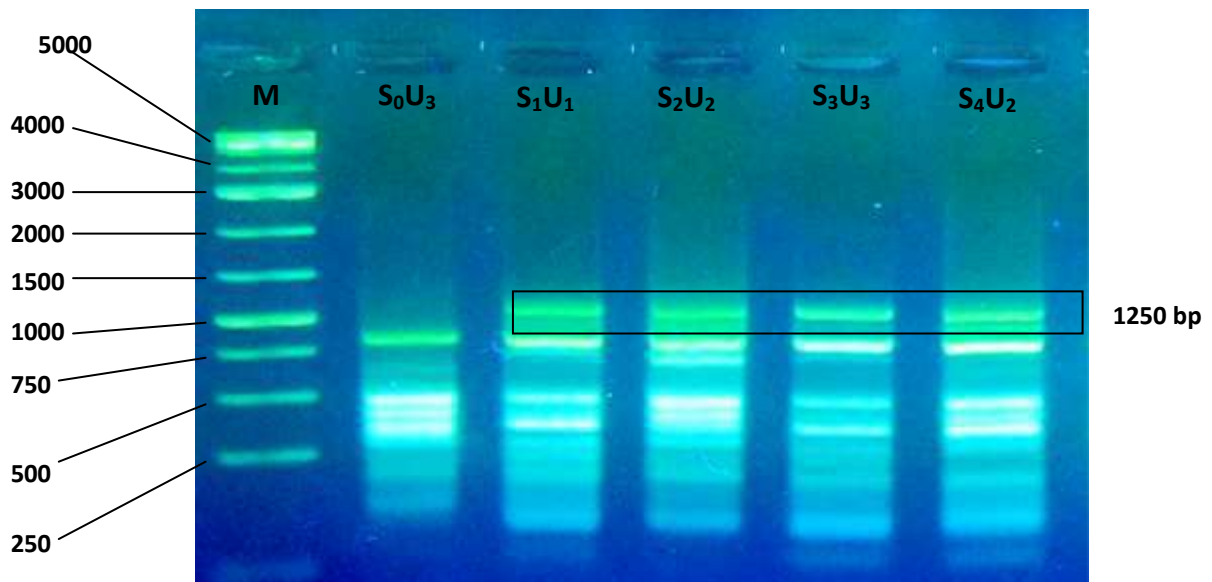
Keterangan: Pola pita DNA-1: **S₀U₃** (kontrol) menghasilkan 6 pita yang identik; Pola pita DNA-2: **S₁U₁**, **S₂U₂**, **S₃U₃**, **S₄U₂** menghasilkan 7 pita yang identik, dan 6 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

Pada Tabel 12 menunjukkan pita DNA ukuran 100, 150, 250, 300, dan 500, dan 800 bp terbentuk pada semua sampel baik pada kontrol maupun yang diimbis AF. Pada planlet *S. plicata* yang diimbis AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1250 bp.

Berdasarkan Tabel 11 dan 12 dapat diketahui bahwa aplikasi 2 primer RAPD yang digunakan menghasilkan 4 pola pita DNA. Menurut Penner (1996) & Yuwono (2010), RAPD pada dasarnya memanfaatkan perbedaan pola amplifikasi PCR yang disebabkan oleh perbedaan posisi menempelnya primer pada genom dari individu yang berbeda. Terjadinya perbedaan pola pita tersebut karena adanya proses amplifikasi untai DNA pada posisi tertentu. Berdasarkan 4 pola pita DNA yang terbentuk, didapatkan 2 pita DNA baru (spesifik) yaitu 1400 bp (primer OPB_14) dan 1250 bp (primer OPB_20). Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *S. plicata* yang tidak diimbis (kontrol) dan diimbis AF (konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm). Tampilan pola pita DNA dan pita baru (spesifik) pada masing-masing primer disajikan pada Gambar 17



Gambar 17. Pola pita DNA planlet *S. plicata* dengan primer OPB_14, menghasilkan pita baru (spesifik) sekitar 1400 bp



Gambar 18. Pola pita DNA *S. plicata* dengan primer OPB_20, menghasilkan pita baru (spesifik) sekitar 1250 bp.

Hasil amplifikasi DNA planlet *S. plicata* dengan menggunakan primer OPB_14 dan OPB_20, menunjukkan bahwa pola pita DNA planlet *S. plicata* yang

kontrol berbeda dengan pola pita DNA planlet *S. plicata* yang diimbasi AF (Gambar 17A dan B). Planlet *S. plicata* yang diimbasi AF baik konsentrasi 10, 20, 30 maupun 40 ppm menghasilkan 1 pita DNA yang berbeda ukurannya dengan planlet *S. plicata* kontrol, yaitu pita DNA berukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), sehingga pita DNA ini dapat dijadikan sebagai pembeda antara planlet *S. plicata* kontrol dan planlet *S. plicata* yang diimbasi AF. Pita DNA ini dinamakan sebagai **penanda RAPD OPB_14₁₄₀₀ dan RAPD OPB_20₁₂₅₀**.

Berdasarkan penanda RAPD yang ditemukan, maka penanda RAPD dapat membedakan planlet *S. plicata* kontrol yang rentan terhadap *Fo* dengan planlet *S. plicata* yang diimbasi AF pada konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm. Planlet *S. plicata* yang diimbasi dengan AF pada konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm, berdasarkan uji ketahanan terhadap *Fo*, merupakan planlet *S. plicata* dengan kriteria moderat dan tahan.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Esmail *et al.* (2012), mengemukakan bahwa penanda RAPD dapat digunakan untuk membedakan planlet Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* dan planlet yang sensitif terhadap jamur tersebut secara *in vitro*. Soliman (2012) dan Parida *et al.* (2010) menggunakan RAPD untuk mengevaluasi kestabilan genetik planlet Apricot (*Prunus armeniaca* L.) dan *Kaempferia galanga*, hasil mikropropagasi secara *in vitro* dibandingkan dengan induknya. Karun *et al.* (2008), telah dapat membedakan planlet pinang (*Areca catechu* L.) yang tahan terhadap penyakit *Yellow Leaf Disease* (YLD) dengan planlet yang sensitif secara *in vitro*.

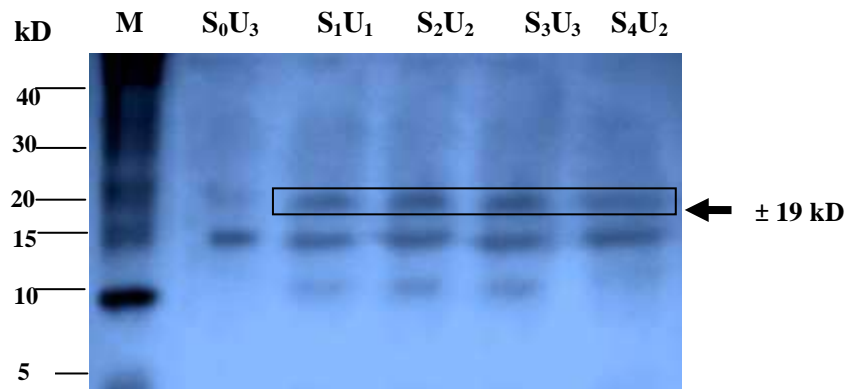
Berdasarkan uraian di atas, dapat dinyatakan bahwa planlet *S. plicata* kontrol (rentan) secara genetik berbeda dengan planlet *S. plicata* yang diimbasi AF pada konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm (moderat dan tahan) terhadap *Fusarium oxysporum*, penyebab penyakit layu fusarium.

Semua *template* DNA *S. plicata* yang diuji, ternyata dapat diamplifikasi dengan primer OPB_14 dan OPB_20. Hasil amplifikasi DNA PCR menunjukkan bahwa planlet *S. plicata* yang moderat dan tahan pada AF 10, 20, 30 dan 40 ppm terbentuk pita DNA baru. Pita-pita spesifik ini sebagai indikasi identifikasi

kultivar baru planlet *S. plicata* tahan *Fo*. Dengan demikian, pita DNA dengan ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*.

G. Analisis profil protein planlet *S. plicata* dengan metode SDS-PAGE

Tanaman yang diperlakukan dengan AF, akan mengaktifasi gen-gen antara lain gen peroksidase, glukonase, dan kitinase (Saravanan *et al.*, 2004). Profil protein didapatkan setelah *crude extract* protein (konsentrasi sekitar 10 µg) di *running* dengan elektroforesis dalam vertikal gel 1D (SDS-PAGE) selama 2 jam, dengan voltase 90 Volt. Pola pita protein yang terbentuk pada kandidat mutan ternyata ada pita atau *band* yang berbeda dibandingkan dengan kontrol. Hal ini terjadi pada semua sampel perlakuan AF konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm (Gambar 13).



Gambar 19. Profil protein daun planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat dengan metode SDS-PAGE 1D. M= Marker. S₀U₃, S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃ S₄U₂= kontrol, planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Tanda panah (←) = pita protein baru yang terbentuk pada planlet *S. plicata* tahan *Fo* (± 19 kD)

Berdasarkan Gambar 12, ditemukan adanya ekspresi pita protein yang berwarna lebih tebal dengan berat molekul (BM) sekitar 19 kD pada planlet *S. plicata* yang tercekaman AF. Berdasarkan analisis profil protein tersebut mengindikasikan bahwa planlet *S. plicata* yang diperlakukan AF konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm memberikan pita berbeda dibanding kontrol. Hal ini menunjukkan

bahwa AF memicu ekspresi gen peroksidase yang ada pada planlet, sehingga aktivitasnya lebih tinggi dan pita protein terpulas lebih jelas.

Berdasarkan hal tersebut, diduga bahwa telah terjadi mutasi pada promoternya sehingga pita dengan BM \pm 19 kD tersebut dapat diindikasikan sebagai marka planlet *S. plicata* tahan *Fo*. Pengimbasan ketahanan planlet *S. plicata* dengan perlakuan AF, salah satu kemungkinan disebabkan oleh aktivasi gen peroksidase yang mengkode enzim peroksidase dan berperan penting dalam ketahanan terhadap *Fo*. Hal ini dapat dikaitkan dengan aktivitas enzim peroksidase yang semakin meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi AF (Gambar 12).

Penelitian yang dilakukan oleh Kumari *et al.*, (2006), pada tanaman sorghum yang diinfeksi dengan *Fusarium moniliforme*, menyebabkan induksi protein ketahanan dengan BM 18 kD dan 30 kD, dan diprediksi sebagai protein peroksidase. Protein dengan BM 18,9 kD juga telah ditemukan oleh Ye & Ng (2009), merupakan protein pengimbas antifungal dari biji takana jepang (*Brassica juncea* var. *integrifolia*). Sementara Ye *et al.* (2011), menemukan protein antifungal dengan BM 30 kD pada tanaman kubis merah (*Brassica oleracea*). Ekspresi enzim peroksidase ini muncul sebagai salah satu mekanisme ketahanan terhadap cekaman AF dan juga merupakan ketahanan terhadap jamur *Fusarium* (Bouizgarne, 2006).

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Pelaksanaan kegiatan Penelitian Tahun I dimulai bulan Maret 2015 dan telah berakhir pada bulan November 2015 dengan capaian 100% (seratus persen). Hasil yang telah dicapai dalam Tahap I dapat diuraikan secara singkat sebagai berikut.

HASIL PENELITIAN

Kisaran konsentrasi Asam Fusarat toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* adalah 10-40 ppm. Secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 40 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 ppm. Konsentrasi AF 40 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ke tahan. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase dan ketebalan lignin pada planlet *S. plicata* tahan *Fo*.

Pita DNA baru (spesifik) mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *S. plicata* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF. Pita protein (berat molekul \pm 19 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Protein dengan berat molekul sekitar 19 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum*.



**SURAT PENUGASAN
PENELITIAN HIBAH FUNDAMENTAL BARU
TAHUN ANGGARAN 2015**

Nomor : 158 /UN26/8/LPPM/2015

Pada hari ini **Senin** tanggal **Tiga Puluh** bulan **Maret** tahun **Dua Ribu Lima Belas**, saya yang bertandatangan dibawah ini

Nama : Dr. Eng. Admi Syarif
NIP : 196701031992031003
Jabatan : Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM)
Universitas Lampung
Alamat : Jln. Prof. Soemanteri Brojonegoro No. 1 Gedung Meneng Bandar Lampung

Dengan ini menugaskan kepada peneliti :

Nama : Dr. Endang Nurcahyani
NIP : 196510311992032003
Jabatan : Ketua Peneliti
Fakultas : MIPA

Untuk melakukan tugas Penelitian HIBAH FUNDAMENTAL BARU yang didanai oleh Dana APBN Universitas Lampung Tahun Anggaran 2015, dengan judul ***Analisis Pola DNA Dan Profil Protein Anggrek Tanah (Spathoglottis plicata Bl) Hasil Induced Resistance Terhadap Fusarium Oxysporum***

Surat Penugasan Penelitian ini didasari oleh :

1. Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No. 19 Tahun 2005 tentang Standar Nasional Pendidikan, Peraturan Pemerintah Nomor 23 Tahun 2005, Tentang Pengelolaan Keuangan badan Layanan Umum,
2. Keputusan Presiden Nomor 73 tahun 1966 tentang perdinan Unila,
3. Keputusan Presiden Nomor 256/MPN.A4/KP/2011 tentang Pengangkatan Rektor Unila,
4. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 129/KMK.05/2009 Tentang Penetapan Unila Pada Departemen Pendidikan Nasional sebagai Instansi Pemerintah yang Menerapkan Pengelolaan Keuangan Badan Layanan Umum,
5. Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor 6 Tahun 2015 tentang Statuta Universitas Lampung,
6. Keputusan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI Nomor 72 Tahun 2014 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Lampung,
7. Keputusan Rektor Universitas Lampung Nomor 18/UN26/OT/2015 tentang berdirinya LPPM Unila,
8. Keputusan Rektor Universitas Lampung Nomor 25/UN26/KP/2015 tentang Pengangkatan Ketua dan Sekretaris Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung,

KEWAJIBAN – KEWAJIBAN YANG HARUS DIPENUHI

PASAL 1

Pelaksanaan penugasan penelitian sebagaimana dimaksud, nilai penugasan penelitiannya adalah sebesar Rp 66000000,- (**Enam puluh enam juta rupiah**) yang dananya bersumber dari dana APBN Universitas Lampung Tahun Anggaran 2015.

PASAL 2

Pembayaran penugasan penelitian ini dilaksanakan dalam 2 (dua) Termin yaitu :

- (1) Pembayaran Termin Pertama, sebesar 70% dan nilai pekerjaan = **Rp. 46200000,- (Empat Puluh Enam Juta Dua Ratus Ribu Rupiah)** dibayarkan setelah surat perjanjian ini ditanda tangani oleh kedua belah pihak.
- (2) Pembayaran Termin Kedua, sebesar 30% dan nilai pekerjaan = **Rp. 19800000,- (Sembilan Belas Juta Delapan Ratus Ribu Rupiah)** dibayarkan setelah Peneliti menyerahkan laporan Akhir dan laporan keuangan Hasil Pelaksanaan Penelitian yang telah dilaksanakan kepada Lembaga Penelitian Universitas Lampung, disertai dengan Berita Acara Serah Terima Laporan Akhir dan Surat Pertanggung Jawaban Mutlak.

PASAL 3

Hal-hal dan segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggung jawab PIHAK KEDUA dan harus dibayarkan ke Kas Negara sesuai dengan ketentuan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

PASAL 4

- (1) Peneliti melaksanakan penelitian sesuai dengan proposal yang telah disetujui oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung Tahun 2015.
- (2) Peneliti berkewajiban untuk mengupayakan hasil penelitiannya untuk dapat dipublikasikan baik dalam jurnal ilmiah di lingkungan Universitas Lampung maupun diluar Universitas Lampung.

PASAL 5

- (1) Dana penelitian yang diperoleh oleh peneliti dimanfaatkan sebenar-benarnya untuk pembiayaan penelitian yang dilaporkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung.
- (2) Perubahan-Perubahan dalam pelaksanaan penelitian dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan lebih dahulu dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung.

PASAL 6

- (1) Peneliti harus menyelesaikan Penelitian yang dimaksud dan menyerahkan : Laporan kemajuan dan Laporan penggunaan anggaran 70% yang telah diverifikasi oleh Tim Monev Internal LPPM selambat-lambatnya tanggal 09 Juli 2015
- (2) Peneliti harus menyelesaikan Penelitian yang dimaksud dan menyerahkan : Laporan Akhir dan Laporan Keuangan yang telah diverifikasi oleh Tim Monev Internal LPPM, selambat-lambatnya tanggal 27 November 2015
- (3) Laporan sebagaimana dimaksud dalam pasal 6 ayat (1) disampaikan dalam bentuk hard copy (sebanyak 2 eksemplar) dan softcopy (sebanyak 2 keping CD).
- (4) Bentuk/ukuran, format penulisan dan warna cover Sesuai dengan panduan yang telah ditetapkan

PASAL 7

- (1) Apabila Peneliti (ketua) sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 tidak dapat menyelesaikan penelitian ini, maka peneliti wajib menunjuk pengganti ketua pelaksana sesuai dengan bidang ilmu yang diteliti dan merupakan salah satu anggota tim yang diketahui oleh Dekan Fakultas dan disetujui oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unila.
- (2) Apabila batas waktu penelitian habis peneliti belum menyerahkan hasil pekerjaan seluruhnya maka peneliti akan dikenakan denda sebesar 1 o/oo (satu permil) setiap hari keterlambatan sampai dengan setinggi-tingginya 5% (lima persen) dari nilai surat Penugasan Pelaksanaan Penelitian, terhitung dari tanggal jatuh tempo yang telah ditetapkan sampai dengan berakhirnya pembayaran dana Penelitian oleh PUMK Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung. Peneliti tetap harus menyelesaikan pekerjaan dengan menyerahkan laporan penelitian sesuai dengan ketentuan pasal 6
- (3) Bagi peneliti yang tidak menyerahkan laporan hasil penelitian dalam akhir tahun anggaran yang sedang berjalan dan waktu proses pencairan biayanya telah berakhir maka sisa biaya atau dana penelitian yang bersangkutan, yang belum sempat dicairkan dinyatakan hangus dan peneliti wajib mengembalikan dana penelitian yang sudah dicairkan untuk dikembalikan ke Kas Negara.
- (4) Apabila Peneliti tidak dapat memenuhi pasal-pasal sebagaimana diatur dalam Perjanjian Penugasan Penelitian ini, maka Peneliti wajib mengembalikan seluruh dana penelitian yang telah diterimanya kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung untuk selanjutnya disetorkan ke Kas Negara.
- (5) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul-judul penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 dijumpai adanya indikasi duplikasi dengan penelitian lain dan/atau diperoleh indikasi ketidak jujuran dan iktikad kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka penelitian tersebut dinyatakan batal dan Peneliti wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterimanya kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung untuk selanjutnya disetor ke Kas Negara

PASAL 8

Surat Penugasan Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua), dan masing-masing bermeterai sesuai dengan ketentuan yang berlaku, dan biaya meterainya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.

PASAL 9

1. Jika terjadi perselisihan antara kedua belah pihak, pada dasarnya akan diselesaikan secara musyawarah
2. Jika perselisihan itu tidak dapat diselesaikan secara musyawarah, maka akan diselesaikan oleh "Panitia Pendamai" yang berfungsi sebagai juri/wasit, yang dibentuk dan diangkat oleh kedua belah pihak yang terdini
 - Seorang wakil dari PIHAK PERTAMA sebagai anggota,
 - Seorang wakil dari PIHAK KEDUA sebagai anggota,
 - Seorang PIHAK KETIGA yang ahli sebagai Ketua, yang telah disetujui oleh PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA
3. Keputusan Panitia Pendamai ini mengikat kedua belah pihak, dan biaya penyelesaian perselisihan yang dikeluarkan akan ditanggung secara bersama
4. Jika Keputusan ini sebagai mana dimaksud ayat 3 pasal ini tidak dapat diterima oleh salah satu pihak, maka penyelesaian perselisihan akan diteruskan melalui Pengadilan Negeri
5. Segala akibat yang terjadi dari pelaksanaan perjanjian ini, kedua belah pihak memilih kedudukan (domisili) yang tetap dan sah di Kantor Pengadilan Negeri Bandar Lampung

PASAL 10

Segala sesuatu yang belum diatur dalam surat perjanjian ini, atau perubahan-perubahan yang dipandang perlu oleh kedua belah pihak, akan diatur lebih lanjut dalam Surat Perjanjian Tambahan (Adendum) dan merupakan perjanjian yang tidak terpisahkan dari perjanjian ini

PIHAK PERTAMA,

Ketua LPPM
Universitas Lampung



Dr. Eng. Admi Syarif
NIP 196701031992031003

PIHAK KEDUA,

Ketua /Selaku
Penanggung Jawab Penelitian



Dr. Endang Nurcahyani
NIP 196510311992032003

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 113/Biologi (Bioteknologi)

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN FUNDAMENTAL**



**ANALISIS POLA DNA DAN PROFIL PROTEIN ANGGREK
TANAH (*Spathoglottis plicata* Bl.) HASIL *INDUCED*
RESISTANCE TERHADAP *Fusarium oxysporum***

Tahun ke-2 dari rencana 2 tahun

KETUA/ANGGOTA TIM:

**Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (NIDN: 0031106503)
Rochmah Agustrina, Ph.D. (NIDN: 0003086102)
Dr. Erdi Suroso, S.T.P., M.T.A. (NIDN: 0006107202)**

**Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Fundamental
Nomor kontrak: 77/UN26/8/LPPM/2016. Tanggal 13 April 2016**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
NOVEMBER
2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : ANALISIS POLA DNA DAN PROFIL PROTEIN
ANGGREK TANAH (*Spathoglottis plicata* Bl.) HASIL
INDUCED RESISTANCE TERHADAP *Fusarium*
oxysporum

Peneliti/Pelaksana
Nama Lengkap : Dr. ENDANG NURCAHYANI M.Si.
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung
NIDN : 0031106503
Jabatan Fungsional : Lektor
Program Studi : Biologi
Nomor HP : 085269847344
Alamat surel (e-mail) : endang_nurcahyani@yahoo.com

Anggota (1)
Nama Lengkap : ROCHMAH AGUSTINA M.Si, Ph.D
NIDN : 0003086102
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Anggota (2)
Nama Lengkap : Dr. ERDI SUROSO S.T.P., M.T.A
NIDN : 0006107202
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung
Institusi Mitra (jika ada) :
Nama Institusi Mitra : -
Alamat : -
Penanggung Jawab : -
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 2 tahun
Biaya Tahun Berjalan : Rp 60.000.000,00
Biaya Keseluruhan : Rp 126.000.000,00

Mengetahui,
Ketua LPPM Unila

Prof. Wastono, S.Si., D.E.A., Ph.D.)
NIP/NIK 197102121995121001

Bandar Lampung, 2 - 11 - 2016
Ketua,


(Dr. ENDANG NURCAHYANI M.Si.)
NIP/NIK 196510311992032003

Menyetujui,
Ketua LPPM Unila

(Wastono, Ph.D.)
NIP/NIK 196302161987031003

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan pada Allah S.W.T. atas limpahan Rahmat yang diberikan kepada penyusun, sehingga penyusunan **Laporan Akhir Penelitian Tahun II** yang berjudul “**Analisis Pola DNA dan Profil Protein Anggrek Tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum***” dapat diselesaikan.

Penelitian ini dibiayai oleh anggaran Direktorat Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi, sesuai dengan **Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Fundamental Nomor kontrak: 77/UN26/8/LPPM/2016. Tanggal 13 April 2016**, untuk itu penyusun mengucapkan terima kasih atas kesempatan tersebut.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Universitas Lampung; Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung; Dekan Fakultas MIPA Universitas Lampung atas bantuan fasilitas yang diberikan, serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan Laporan Akhir ini. Penyusun berharap semoga hasil laporan ini bermanfaat bagi yang memerlukan.

Bandar Lampung, 29 November 2016

Penyusun

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMBUT

HALAMAN PENGESAHAN

RINGKASAN

PRAKATA

DAFTAR ISI

DAFTAR TABEL

DAFTAR GAMBAR

DAFTAR LAMPIRAN

BAB 1. PENDAHULUAN

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

BAB 4. METODE PENELITIAN

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB 6. KESIMPULAN DAN SARAN

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

- 1. POSTER: INTERNATIONAL WILDLIFE SYMPOSIUM
(IWS 2016)**
- 2. SERTIFIKAT IWS 2016**
- 3. ARTIKEL: INTERNATIONAL JOURNAL OF APPLIED
AGRICULTURAL SCIENCES**
- 4. ARTIKEL SEMIRATA 2016**
- 5. SERTIFIKAT SEMIRATA 2016**

RINGKASAN

Penelitian Tahun I tentang *Induced Resistance* anggrek tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang tahan. Inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) pada planlet tahan dilakukan secara *in vitro*, dilanjutkan dengan analisis DNA dan profil protein dari *S. plicata* yang tahan terhadap *Fo*, dibandingkan dengan kontrol.

Hasil dari penelitian Tahun I berupa Pita DNA baru (spesifik) yang mempunyai ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20) dan diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*; Pita protein baru (berat molekul \pm 19 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*. Protein tersebut diprediksi sebagai protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fo*. Berdasarkan hasil penelitian tahap I, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru (spesifik) tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet mutan *S. plicata* tahan terhadap penyakit layu *Fusarium*, yaitu dengan analisis *sequencing*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa Kriteria ketahanan planlet *S. plicata* pada hari ke-28 (0 ppm) kontrol dan 10 ppm adalah rentan. Pada 20 ppm dan 30 ppm moderat. Pada konsentrasi 40 ppm adalah tahan dengan intensitas penyakit hingga 0%. Planlet *S. plicata* yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* memiliki karakter ekspresi yang berbeda dengan planlet yang tidak tahan terhadap *Fusarium oxysporum*. Terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase, kandungan fenol, kandungan klorofil a, b, dan total indeks stomata dengan semakin tinggi konsentrasi asam fusarat yang diberikan.

Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 700-800 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada *S. plicata* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm

Kata kunci : Mutan *Spathoglottis plicata* Bl.; ITS rDNA; *Sequencing*; *Fusarium oxysporum*; *in vivo*

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Anggrek merupakan tanaman berbunga yang mempunyai nilai ekonomi cukup tinggi dan harganya relatif stabil. Anggrek tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.) merupakan salah satu tanaman anggrek yang banyak disukai karena mudah dibudidayakan. Salah satu kendala yang dihadapi dalam budidaya anggrek tanah adalah adanya jamur patogen yang dapat menyerang beberapa bagian tanaman antara lain batang, daun, atau akar (Djatnika, 2012).

Layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) merupakan penyakit penting dan menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek, termasuk di dalamnya *S. plicata* (Palmer, 2011). Di Amerika Serikat, penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian tanaman dan kehilangan hasil lebih dari 50% dan sulit dikendalikan dengan hanya menggunakan fungisida (Wedge & Elmer, 2008).

Di Indonesia, selama ini para petani anggrek masih menggunakan pestisida sintetis untuk mengendalikan penyakit layu *Fusarium* tersebut. Pestisida kerap menimbulkan polusi terhadap lingkungan padahal tanaman anggrek selalu dekat secara fisik dengan penggemarnya, maka perlu dicari alternatif lain yang efektif dan ramah lingkungan (Djatnika, 2012).

Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang aman, efisien dan efektif serta aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan varietas yang tahan (resisten). Pengembangan kultivar *S. plicata* tahan *Fo* tersebut dapat dilakukan antara lain dengan metode seleksi *in vitro* yaitu mengkulturkan eksplan berupa jaringan atau organ pada medium yang mengandung asam fusarat konsentrasi selektif (Bouizgarne *et al.*, 2006)

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Asam ini dapat bersifat toksin (konsentrasi lebih dari 10^{-5} M) sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Landa *et al.*, 2002; Bouizgarne *et al.*, 2006), tetapi pada konsentrasi yang non toksik (di bawah 10^{-6} M) justru

membantu mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen (Bouizgarne *et al.*, 2006).

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Arai dan Takeuchi, 1993). Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), nanas (Borras *et al.*, 2001), dan vanili (Nurchayani *et al.*, 2012; Nurchayani, 2013; Nurchayani *et al.*, 2014). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Berdasarkan penelitian tahap I diperoleh luaran berupa **kandidat mutan** *S. plicata* tahan *Fo*. Kandidat mutan *S. plicata* tahan *Fo* yang tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru (spesifik) tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet *S. plicata* tahan penyakit layu fusarium, yaitu dengan analisis *sequencing*. Dengan demikian kajian **Penelitian Tahun II** adalah menganalisis sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA mutan *S. plicata* tahan *Fo*.

Hasil penelitian Tahun I berupa Pita DNA baru (spesifik) yang mempunyai ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20) dan diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *S. plicata* yang rentan dan tahan *Fo*, diperoleh pula pita protein (berat molekul \pm 19 kD) pada SDS-PAGE 1D yang mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo*. Protein dengan berat molekul sekitar 19 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fo*.

Perspektif untuk memastikan pita protein \pm 19 kD adalah protein peroksidase, perlu dilakukan isolasi proteinnya, analisis basa asam aminonya

dengan *alignment* terhadap *sequence* protein peroksidase spesies lain, analisis ekspresi gen transien dan atau analisis *Western blot*. Pada tingkat DNA dapat pula dilakukan isolasi pita DNA baru (spesifik) tersebut dengan *sequencing*, dan *alignment* dengan *sequence* gen peroksidase pada organisme atau spesies lain. Apabila diperlukan pita baru tersebut dapat dianalisis dengan menggunakan *probe* dalam *Southern blot*.

B. Tujuan Khusus

Tujuan khusus yang dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui urutan basa nukleotida gen mutan *S. plicata* tahan *Fo* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dengan analisis *sequencing*.
2. Mengetahui karakter dan uji ketahanan mutan *S. plicata* yang tahan *Fo* secara *in vivo* sehingga diperoleh kriteria ketahanan dan karakter spesifik mutan *S. plicata* tahan *Fo*.

C. Urgensi Penelitian

Rencana penelitian ini merupakan lanjutan dari penelitian tahun I (2015) Hibah Penelitian Fundamental. Penelitian tahun II ini sangat penting untuk dilanjutkan dalam rangka mengetahui dan mengkaji lebih mendalam mutan *S. plicata* tahan *Fo* yang dihasilkan pada penelitian Tahun I dan dampaknya secara langsung terhadap lingkungan. Data awal dalam analisis dampak mutan *S. plicata* terhadap lingkungan penting dilakukan karena data ini diperlukan dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru (mutan *S. plicata* tahan penyakit layu *Fusarium*).

Hasil analisis molekular yang telah dicapai dalam penelitian Tahun I adalah ditemukannya Pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20). Pita baru tersebut dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita protein baru (berat molekul \pm 19 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Protein dengan berat molekul sekitar 19 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum*.

Kandidat mutan *S. plicata* tahan *Fo* yang diperoleh pada penelitian Tahun I, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru (spesifik) tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet *S. plicata* tahan *Fo* yaitu dengan analisis *sequencing*.

Mutan *S. plicata* selanjutnya di aklimatisasi baik di rumah kaca maupun di lapangan, dan dilanjutkan dengan analisis ketahanan dan makropropagasi.

Karakterisasi mutan berupa kerapatan stomata, kadar klorofil dan fenol total dilakukan untuk memperoleh karakter spesifik mutan tahan *Fo*. Analisis dampak terhadap lingkungan mutan *S. plicata* dilakukan pula untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Apabila uji coba bibit *S. plicata* mutan tahan *F. oxysporum* di lapangan tersebut berhasil, selanjutnya bibit mutan diusulkan untuk dipatenkan, kemudian lisensinya ditawarkan ke perusahaan swasta untuk diproduksi massal.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat petani anggrek pada khususnya dalam memperoleh bibit anggrek *S. plicata* yang tahan penyakit layu *Fusarium*, sehingga nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual anggrek *S. plicata* serta pendapatan petani anggrek di Indonesia.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ketahanan terimbas (*induced resistance*).

Pengendalian penyakit secara hayati dapat melalui interaksi antara populasi patogen dan agens hayati baik secara langsung maupun tidak langsung. Ketahanan terimbas bersifat tidak spesifik terhadap jenis patogen, sehingga dapat lebih efisien dalam pelaksanaannya (Agrios 2005). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Vidhyasekaran, 1999). Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), dan vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani, 2013).

Contoh aplikasi gen peroksidase yang diekspresikan dengan reporter *gus* (β -glucuronidase) pada tomat (*Lycopersicon esculentum*) telah dilaporkan oleh Medina (1999), demikian pula pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) (Jang *et al.*, 2004). Enzim peroksidase yang diinduksi oleh patogen berbagai tumbuhan juga telah dilaporkan, misalnya pada mentimun (*Cucumis sativus*) (Alkahtani *et al.*, 2011), *Eustoma grandiflorum* (Popa *et al.*, 2009), kacang tanah (Ye & Ng, 2002), kacang kapri (Luhova *et al.*, 2003), *Phytolacca dioica* L (Guida *et al.*, 2010), dan Nurcahyani (2013) pada vanili.

B. Tanaman Anggrek Tanah (*Spathoglottis plicata* Bl.)

Tanaman anggrek dikenal sebagai salah satu primadona tanaman unggul di dunia. Salah satunya adalah *Spathoglottis plicata* Bl. (anggrek tanah). *S. plicata* termasuk ke dalam familia Orchidaceae dan merupakan anggrek yang sangat

adaptif, dapat tumbuh baik di dataran rendah maupun tinggi. Disebut *S. plicata* karena memiliki daun yang bergelombang (*plicate leaf*) (Anonymous, 2014).



Gambar 1. Bunga *Spatoglottis plicata* Bl. (Anonymous, 2014)

Anggrek *S. plicata* cocok digunakan sebagai tanaman model induksi ketahanan (*induced resistance*) karena memiliki ciri-ciri antara lain: (1) mudah didapat karena dapat tumbuh diberbagai ketinggian tempat, (2) dapat tumbuh dengan cepat, dan (3) mudah dibudidayakan (Anonymous, 2013a). *Spathoglottis plicata* memiliki bunga yang berwarna ungu (Gambar 1) dan tumbuh pada tandan yang terletak di antara daun. Fungsi tanaman ini biasanya untuk penutup tanah dan sebagai *point of interest* jika ditanam secara merumpun (Anonymous, 2013b).

C. Penyakit Layu *Fusarium*

Fusarium oxysporum (*Fo*) patogen pada tanaman anggrek dapat bertahan secara alami di dalam medium tumbuh dan pada akar-akar tanaman sakit. Apabila terdapat tanaman peka, melalui akar yang luka dapat segera menimbulkan infeksi. (Semangun, 2001; Hadisutrisno, 2004). Perakaran menjadi busuk dan dapat meluas ke atas sampai ke pangkal batang. Jika akar rimpang dipotong akan tampak bahwa epidermis dan hipodermis berwarna ungu, sedang *phloem* dan *xylem* berwarna ungu merah jambu muda. Akhirnya seluruh akar rimpang menjadi berwarna ungu (Semangun, 2001)

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu *Fusarium***, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati (Djaenuddin, 2003)

D. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002).

Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, dan anyelir. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen.

E. Analisis Sequensing daerah ITS rDNA

Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) nuklear ribosomal DNA (rDNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S r DNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga. (Brinegar, 2009).

Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R) (Baldwin *et al.*, 1995; Baldwin & Markos, 1998). Penelitian tentang identifikasi strain tanaman alga *Porphyra haitanensis* Chang et Sheng (Bangiales, Rhodophyta) melalui penanda molekular ITS-5,8S rDNA telah dilakukan. Penanda ITS rDNA dapat mengidentifikasi 10 strain dari *species* alga tersebut (Chen *et al.*, 2010). Penelitian tentang divergensi jamur *Waitea circinata* var. *circinata* pada wilayah distribusi geografi di Amerika pada *annual bluegrass*, dengan penanda sekuen daerah ITS rDNA telah dilakukan. Dari penelitian ini diketahui bahwa *W. Circinata* var. *circinata*

memiliki divergensi patogen yang tinggi berkaitan dengan adaptasinya terhadap *annual bluegrass* di berbagai habitat di Amerika Serikat (Chen *et al.*, 2009).

F. Uji Adaptasi Dan Uji Observasi Untuk Calon Varietas Unggul

Analisis dampak terhadap lingkungan mutan *S. plicata* dilakukan untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Tata kerja diatur dalam Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 61/Permentan/Ot.140/10/2011 Tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas (Anonymous, 2010).

Bibit unggul bermutu memiliki peranan yang utama dalam proses budidaya dan dituntut memiliki mutu fisiologis, mutu fisik dan genetis yang sesuai standar agar hasil produksi dari tanaman sesuai dengan yang diharapkan. Varietas unggul adalah varietas yang telah dilepas oleh pemerintah yang mempunyai kelebihan dalam potensi hasil dan/atau sifat-sifat lainnya. Suatu jenis tanaman memiliki potensi genetik yang disebut plasma nutfah, yang dapat dimanfaatkan untuk pengembangan/menciptakan jenis unggul atau varietas baru. Untuk menghasilkan bibit dengan varietas unggul, perlu diselenggarakan kegiatan eksplorasi dan inventarisasi plasma nutfah dan pemuliaan tanaman maupun kegiatan lain yang berkaitan dengan upaya untuk menemukan jenis baru serta varietas unggul. **Calon varietas unggul** dapat berasal dari varietas baru berupa galur, hibrida, **mutan**, transgenik ataupun varietas lokal yang mempunyai potensi hasil tinggi (Marzuki, 2014).

Seleksi dan uji observasi adalah dasar pembentukan varietas pada tanaman perkebunan (Marzuki, 2014). Sebelum bibit bisa disebarluaskan atau menjadi produk komersial dilakukan berbagai pengujian seperti uji adaptasi atau uji observasi. Hal ini diatur melalui UU No. 12 tahun 1992, PP No.44 tahun 1995 dan Peraturan Menteri Pertanian No. 61/Permentan/OT.140/8/2011.

Uji Adaptasi adalah kegiatan uji lapang di beberapa agroekologi bagi tanaman semusim, untuk mengetahui keunggulan dan interaksi varietas terhadap lingkungan. Uji adaptasi ini merupakan salah satu cara untuk menilai kelayakan suatu varietas untuk dapat dilepas secara resmi kepada masyarakat pengguna.

G. Hasil penelitian Tahun I

Hasil penelitian yang sudah dicapai pada tahun I adalah diperolehnya mutan *S. plicata* tahan penyakit layu fusarium, dengan kesimpulan sebagai berikut.

1. Kisaran konsentrasi Asam Fusarat toleran untuk seleksi planlet *S. plicata* adalah 10-40 ppm
2. Secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 40 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 10, 20 dan 30 ppm, konsentrasi AF 40 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ke tahan
3. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase dan ketebalan lignin pada planlet *S. plicata* tahan *Fo*.
4. Pita DNA baru (spesifik) mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *S. plicata* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF. Pita protein (berat molekul ± 19 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum*. Protein dengan berat molekul sekitar 19 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum*.

BAB III. METODE PENELITIAN

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari tahap kegiatan penelitian Tahun II.

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR)* daerah ITS rDNA mutan *S. plicata* tahan *Fo*

DNA yang digunakan dalam penelitian ini, adalah hasil dari isolasi DNA *S. plicata* pada Tahun I dengan analisis RAPD.

- a. Dibuat campuran PCR dengan total 25 µl di dalam tabung 200 µl dengan komposisi seperti Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Premix PCR untuk daerah ITS rDNA

Senyawa	Total 25 µl (µl)	Keterangan
KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>	22,0	Prosedur KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>
Primer forward	1,00	Konsentrasi 100 µM
Primer reverse	1,00	Konsentrasi 100 µM
DNA	1,00	Konsentrasi 10 ng
Jumlah	25,00	

- b. Primer ITS DNA yang digunakan yaitu *primer forward* dengan susunan nukleotida 5-GATCGCGGCGGCGACTTGGGCGGTTC-3 (F1), dan *primer reverse* dengan susunan nukleotida 5-GGTAGTCCCGCCTGACCTGGG-3 (R1) (Ming Li *et al.*, 2011).
- c. Selanjutnya premix di amplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Kemudian dilakukan elektroforesis. Selanjutnya di *running* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Visualisasi band ITS rDNA target dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator dan band yang muncul difoto dibandingkan dengan DNA *Ladder*.
- d. Dikirimkan produk PCR yang memiliki band ITS rDNA target antara 700-800 bp positif, ke 1st based Singapura sebanyak 55 µl untuk dilakukan *sequencing* daerah 18 S ITS-1; 5,8S ITS-2 dan 28S rDNA.
- e. Dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan basa nukleotida gen 18 S ITS-1; 5,8S ITS-2 dan 28S rDNA. *Sequencing* DNA menghasilkan 2 sequence. Analisis menggunakan program *Sequence Scanner version 1.0*.

Gabungan kedua *sequence* menggunakan *editSeq* dan *SeqMan* dalam *Software Suite for Sequence Analysis DNASTAR Lasergene DM version 3.0.25*. Pembandingan untuk penanda ITS rDNA adalah *S. plicata* dari GenBank.

2. Aklimatisasi mutan *S. plicata* tahan *Fo* dan analisis ketahanan mutan *S. plicata* tahan *Fo* secara *in vivo*.

Aklimatisasi dilakukan dengan memindahkan planlet ke dalam *polybag* dan di aklimatisasikan selama 2 minggu di *greenhouse*. Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fo* dilakukan secara langsung pada *S. plicata*. Mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL diteteskan pada daun 1-2 tetes. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

3. Analisis Klorofil, Fenol total dan Kerapatan Stomata

Analisis klorofil dengan menggunakan metode Harbourn (1987) dengan spektrofotometer. Kadar klorofil dihitung dengan menggunakan rumus: Klorofil total = $17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663}$ mg/L; Klorofil a = $12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646}$ mg/L; Klorofil b = $20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663}$ mg/L. **Analisis senyawa fenol total** menggunakan metode Singleton & Rossi (Aberouman & Deokule, 2008). Bahan untuk analisis senyawa fenol menggunakan daun mutan *S. plicata*. Asam galat digunakan sebagai larutan standar. Ekstrak planlet disiapkan menurut metode Ozygi *et al.* (2007). Pengukuran fenol total menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm. Kadar senyawa fenol total berdasarkan persamaan regresi asam galat yaitu hubungan antara nilai serapan ekstrak daun *S. plicata* dan seri kepekatan asam galat. **Kerapatan Stomata** menggunakan metode dari Ruzin (1999). Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun mutan *S. plicata* dengan sisi ± 5 mm dan dimasukkan ke

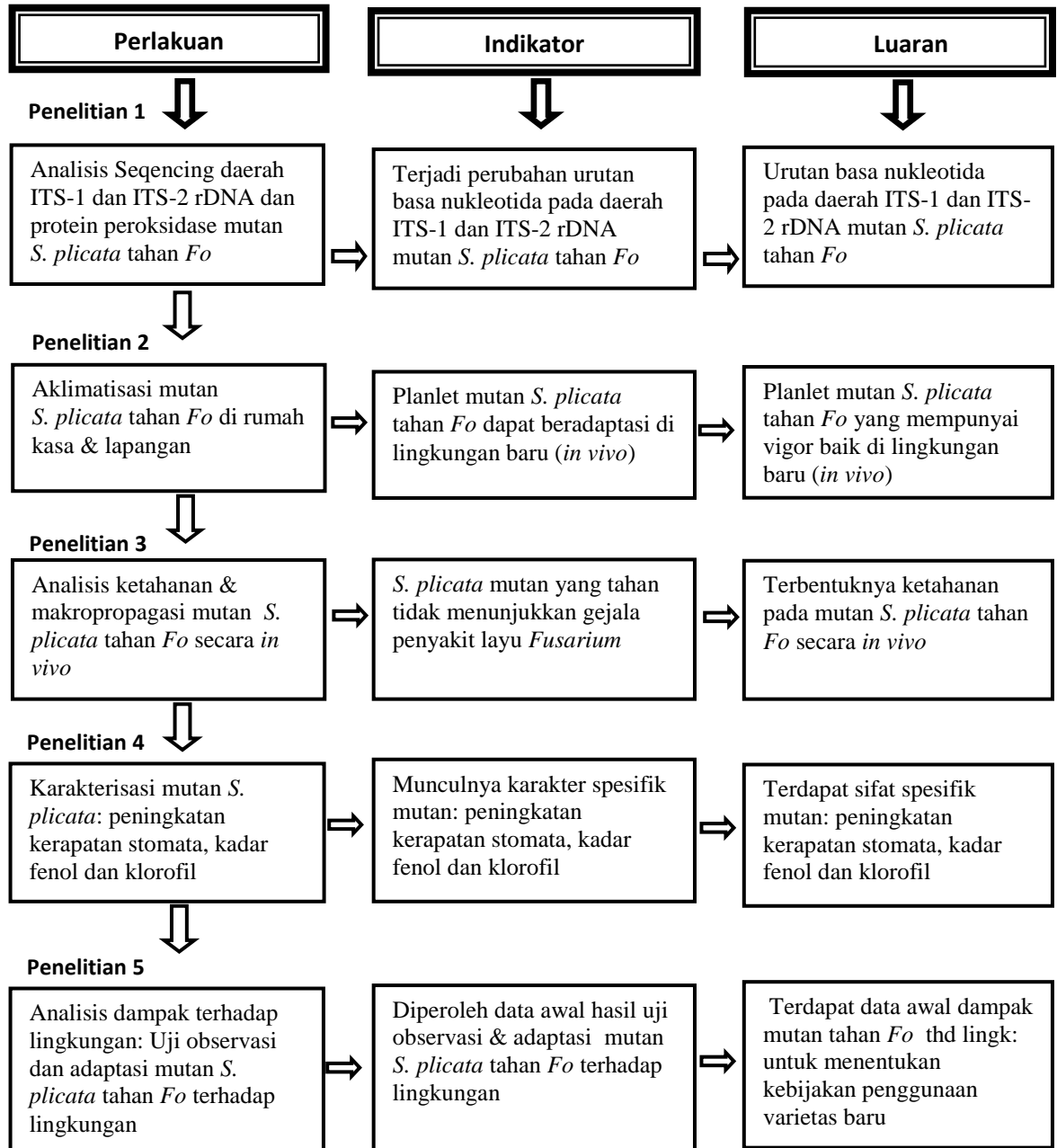
dalam tabung berisi larutan kloralhidrat dalam air (5:1). Tabung dipanasi dalam waterbath selama \pm 10-15 menit hingga potongan daun tersebut transparan. Potongan daun diletakkan dalam larutan kloralhidrat pada gelas benda. Permukaan yang ada stomatanya diletakkan disebelah atas, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati pada 5 bagian daerah yang berlainan. Tiap sel epidermis (E) ditandai dengan (x), tiap stoma (S) ditandai dengan (O). Kerapatan stomata merupakan jumlah stomata persatuan luas daerah pengamatan. Hasil akhir adalah rata-rata dari 5 buah pengamatan.

4. Analisis dampak terhadap lingkungan

Analisis dampak terhadap lingkungan mutan *S. plicata* dilakukan untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru yang tata kerjanya diatur dalam Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 61/Permentan/Ot.140/10/2011: Tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas.

- a. Uji adaptasi adalah kegiatan uji lapang dibeberapa agroekologi bagi tanaman, untuk mengetahui keunggulan dan interaksi varietas terhadap lingkungan.
- b. Uji observasi adalah kegiatan uji lapang tanaman untuk mengetahui sifat sifat unggul dan daya adaptasi varietas terhadap lingkungan pada beberapa agroekologi

Tahapan penelitian Tahun II disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam Gambar 4.



Gambar 4. Bagan Alir Tahapan Penelitian Tahun II

Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan didukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda

dan 5 ulangan mutan *S. plicata* dibandingkan kontrol.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda atau DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf kepercayaan 95% (Gomes & Gomes, 1984).

LUARAN ATAU HASIL

Luaran atau hasil yang diharapkan dari penelitian Tahun II adalah (1) **Mutan** anggrek *S. plicata* tahan terhadap *Fusarium oxysporum* (2) Publikasi ilmiah berupa artikel ilmiah yang dipaparkan pada Seminar Nasional, International dan Jurnal International. Publikasi disebarluaskan melalui media jurnal/seminar sebagai berikut:

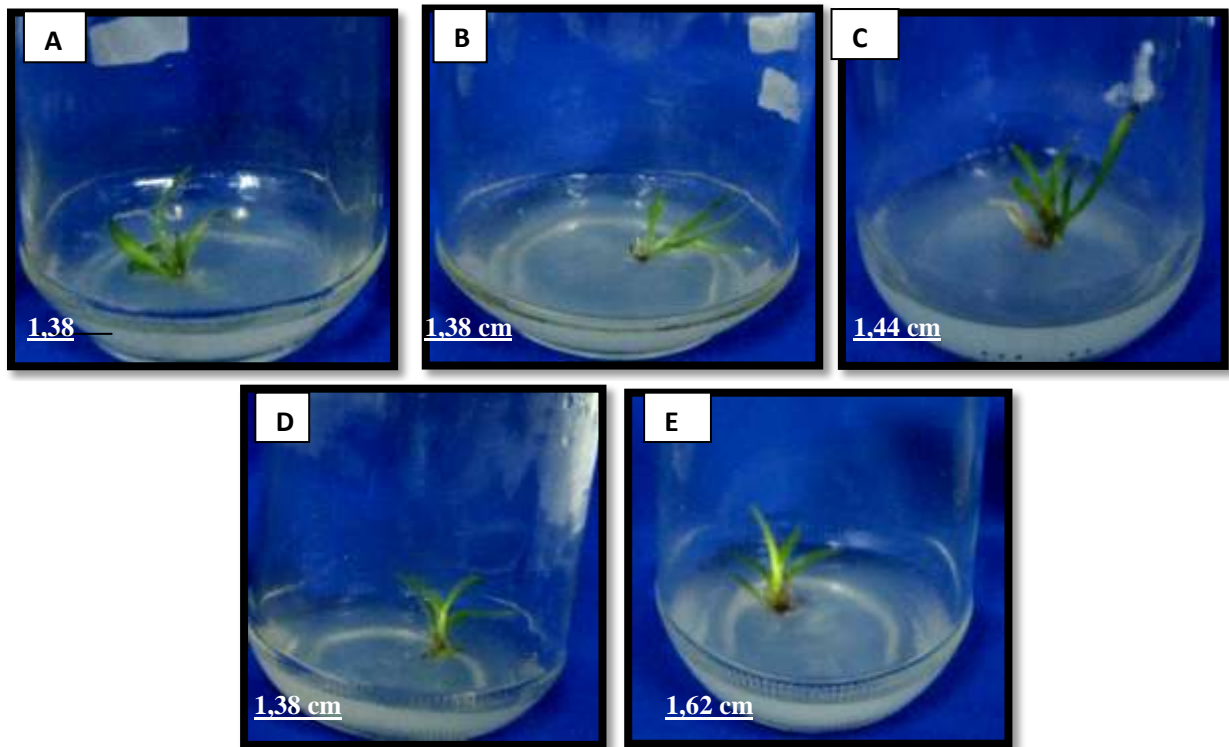
No	Jenis Publikasi	Judul Publikasi	Nama Jurnal/Seminar/Penerbit
1	Jurnal Internasional	Analysis of Peroxidase Activity and Total Phenol from <i>Spathoglottis plicata</i> Bl. Plantlet Toward to <i>Fusarium oxysporum</i>	International Journal of Applied Agricultural Sciences. ISSN: 2469-7877 (Print); ISSN: 2469-7885 (Online). http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ijaas
2	Symposium International	Induce Resistance of <i>Spathoglottis plicata</i> Toward to <i>Fusarium oxysporum</i>	International Wildlife Symposium 2016 (IWS 2016). Lampung University, October 18-20, 2016.
3	Seminar Nasional	Analisis Lignin dan Indeks Stomata Anggrek Tanah (<i>Spathoglottis plicata</i>) Hasil <i>Induced Resistance</i> Terhadap <i>Fusarium oxysporum</i> Secara <i>In Vitro</i> .	Prosiding SEMIRATA 2016 Bidang MIPA BKS-PTN Wilayah Barat 22-24 Mei 2016. ISBN: 978-602-71798-1-3. Pp: 2243-2247

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini terdiri dari hasil uji ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fo* serta analisis aktivitas enzim peroksidase, kandungan total fenol, kandungan klorofil dan indeks stomata. Berikut pengamatan yang telah dilakukan dan pembahasan terhadap parameter seleksi anggrek *S. plicata* dengan AF dan ketahanan anggrek *S. plicata* terhadap *Fo* disajikan sebagai berikut.

A. Pengujian Ketahanan Planlet *Spathoglottis plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* secara *In Vitro*

Seleksi ketahanan *S. plicata* terhadap *F. oxysporum* dilakukan secara langsung pada planlet dalam botol kultur dengan menginokulasikan secara langsung 1-2 tetes mikrokonidium *F. oxysporum* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL mikrokonidium pada planlet secara *in vitro*. Planlet yang telah diinokulasi *F. oxysporum* diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 24 jam (Hadisutrisno, 1995). Perlakuan inokulasi dilakukan secara *in vitro* sehingga kondisi lingkungan bisa terjaga. Planlet *S. plicata* umur satu hari setelah diinokulasi dengan *Fo* disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Planlet *S. plicata* yang ditanam pada medium VW pada berbagai konsentrasi satu hari setelah inokulasi *Fo*. A= kontrol (0 ppm), B= konsentrasi AF (10 ppm), C= konsentrasi AF (20 ppm), D= konsentrasi AF (30 ppm), dan E= konsentrasi AF (40 ppm).

Hasil pengamatan terhadap gejala kelayuan pada daun planlet yang dilakukan setiap hari selama 4 minggu menunjukkan adanya gejala layu pada planlet anggrek *S. plicata* di dalam botol kultur. Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala layu atau kuning yang muncul dapat ditentukan intensitas penyakit dan kriteria ketahanan pada planlet yang telah diinokulasi dengan *F. oxysporum* secara *in vitro* Wibowo (2002). Intensitas penyakit hasil uji ketahanan *S. plicata* disajikan dalam Tabel 4.

Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala layu atau kuning yang muncul dapat ditentukan intensitas penyakit (IP) dan kriteria ketahanan masing-masing perlakuan Wibowo (2002). Intensitas penyakit hasil uji ketahanan *S. plicata* disajikan dalam Tabel 4.

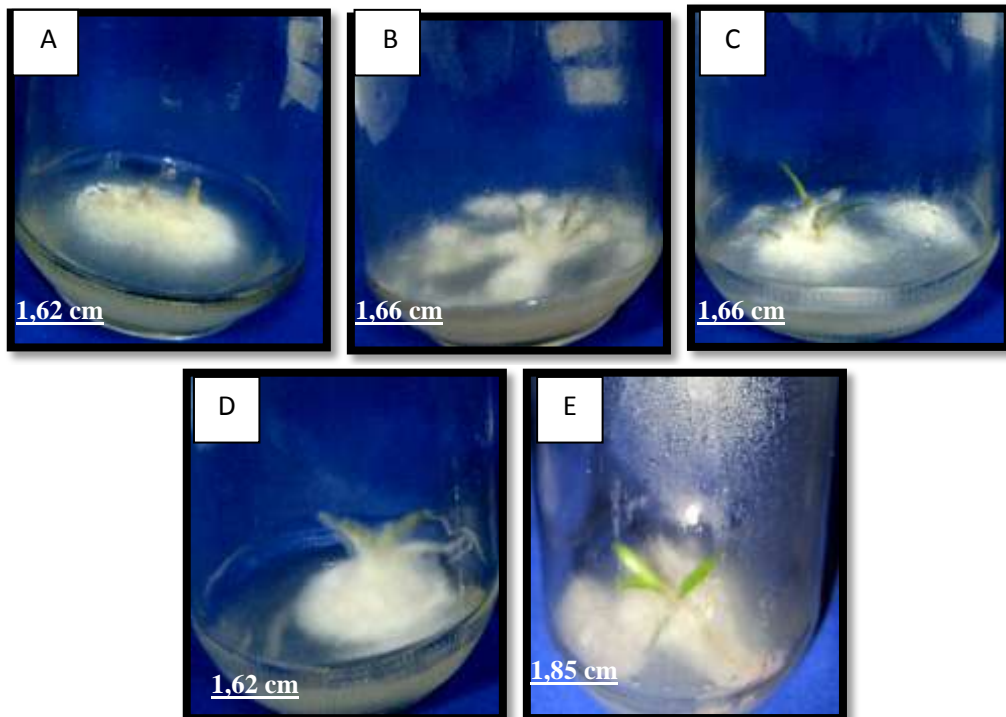
Tabel 4. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan *Spathoglottis plicata* pada setiap perlakuan AF

Perlakuan	Hari Pengamatan							
	4		12		20		28	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
Kontrol	33%	Moderat	83%	Rentan	91%	Rentan	91%	Rentan
10 ppm	0%	Tahan	33%	Moderat	66%	Rentan	83%	Rentan
20 ppm	0%	Tahan	0%	Tahan	33%	Moderat	33%	Moderat
30 ppm	0%	Tahan	0%	Tahan	0%	Tahan	33%	Moderat
40 ppm	0%	Tahan	0%	Tahan	0%	Tahan	0%	Tahan

Keterangan : IP = Intensitas Penyakit

Data pada Tabel 4 menunjukkan bahwa kriteria ketahanan pada planlet hasil perlakuan kontrol dan pemberian asam fusarat 10 ppm menghasilkan kriteria ketahanan planlet yang rentan dengan intensitas penyakit mencapai 91% dan 83%, tetapi intensitas penyakit tertinggi ditunjukkan oleh planlet dari perlakuan kontrol yaitu 91%. Pada perlakuan pengimbasan dengan asam fusarat pada konsentrasi 20 dan 30 ppm menghasilkan planlet yang memiliki intensitas penyakit mencapai 33%, sehingga kriteria ketahanannya adalah moderat. Pada perlakuan pengimbasan asam fusarat 40 ppm tidak terdapat gejala serangan penyakit (IP = 0%) sehingga kriteria ketahanan planlet adalah tahan.

Berdasarkan data intensitas penyakit dan ketahanan di atas dapat diketahui bahwa perlakuan asam fusarat 40 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga dapat menekan intensitas penyakit hingga 0% dan menaikkan kriteria menjadi tahan. Planlet *S. plicata* yang telah diinokulasi *Fusarium oxysporum* pada hari pengamatan ke-28 disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Planlet *S. plicata* yang ditanam pada medium VW pada berbagai konsentrasi hari ke-28 setelah inokulasi *Fo*.

- A= planlet *S. plicata* kontrol,
- B= planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat 10 ppm,
- C= planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat 20 ppm,
- D= planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat 30 ppm
- E= planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat 40 ppm

B. Karakterisasi Planlet *Spathoglottis plicata* B1

Karakter planlet *S. plicata* yang berhubungan dengan ketahanannya terhadap *F. oxysporum* antara lain dapat ditinjau dari aktivitas enzim peroksidase, ketebalan lignin, fenol total, kandungan klorofil total, klorofil a klorofil b, dan indeks stomata.

1. Analisis Aktivitas Enzim Peroksidase

Aktivitas peroksidase sebagai mekanisme ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *F. oxysporum* telah diukur menggunakan metode Saravanan *et al.* (2004). Hasil analisis aktivitas enzim peroksidase dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Aktivitas enzim peroksidase planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm b/v)	Aktivitas Enzim Peroksidase (unit/mg/menit)
0 (Kontrol)	0,183 ± 1.1773E-03 ^a
10	0,279 ± 2.0320E-03 ^b
20	0,413 ± 2.2300E-04 ^c
30	0,440 ± 7.5100E-04 ^c
40	0,536 ± 2.8933E-04 ^d

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan Tabel 5. di atas dapat diketahui bahwa pemberian AF pada medium kultur meningkatkan aktivitas enzim peroksidase. Aktivitas enzim peroksidase tertinggi diperoleh dari perlakuan pengimbasan asam fusarat 40 ppm.

2. Analisis Fenol Total

Penambahan kandungan fenol total pada planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF yang di inokulasikan *F. oxysporum* juga merupakan salah satu indikator adanya mekanisme ketahanan secara *in vitro*. Pengukuran kadar fenol total pada planlet *S. plicata* menggunakan metode Aberouman and Deokule (2008). Hasil dari pengukuran kurva standar asam galat diperoleh persamaan garis regresi linier $y = 0.001x + 0.002$ dan memiliki nilai kolerasi ($R^2 = 0.998$) yang menunjukkan keragaman antara konsentrasi asam galat dengan absorbansi bersifat homogen. Berdasarkan kurva standar asam galat tersebut maka dapat dicari kadar fenol total dari masing-masing perlakuan berdasarkan persamaan garis regresinya Tabel 7.

Tabel 7 Kadar fenol total (%) planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat

Perlakuan	Rata-rata Kandungan fenol total (%)
0 ppm	10,13 ± 4.1111E-02 ^a
10 ppm	27,19 ± 1.2287E-01 ^b
20 ppm	31,33 ± 5.2689E-01 ^c
30 ppm	34,93 ± 3.0111E-01 ^d
40 ppm	35,53 ± 4.1111E-02 ^d

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Pada Tabel 7 di atas terlihat peningkatan kadar fenol total dari sekitar 10,13 % pada kontrol, meningkat menjadi 27.19% pada perlakuan AF 10 ppm, diikuti 31.33% pada 20 ppm, 34.93% pada 30 ppm dan 35,53% pada 40 ppm. Peningkatan fenol total sejalan dengan semakin meningkatnya konsentrasi AF. Vidhyasekaran (1997) berpendapat, bahwa salah satu parameter terjadinya peningkatan ketahanan tanaman terhadap patogen adalah meningkatnya senyawa fenol.

3. Analisis Kandungan Klorofil

Pengaruh pengimbasan asam fusarat (AF) terhadap planlet anggrek tanah dapat diketahui terhadap kandungan klorofilnya. Kandungan klorofil diamati pada daun planlet anggrek tanah yang diimbas dengan AF maupun kontrol. Metode analisis klorofil yang digunakan adalah metode Harboune (1987). Kandungan klorofil pada daun planlet anggrek tanah yang di tanam pada medium *Vacin & Went* (VW) dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Kandungan klorofil daun planlet *S. plicata* hasil pengimbasan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Kandungan Klorofil a (mg/g Jaringan)	Kandungan Klorofil b (mg/g Jaringan)	Kandungan Klorofil total (mg/g Jaringan)
0 (Kontrol)	1,722 ± 1.1309E-02 ^a	0,585 ± 2.5537E-02 ^a	2,309 ± 2.7503E-02 ^a
10	2,157 ± 4.7393E-02 ^b	1,470 ± 1.3237E-02 ^a	3,625 ± 1.0504E-01 ^b
20	2,834 ± 5.8198E-03 ^c	2,582 ± 1.8300E-03 ^b	5,413 ± 8.1599E-03 ^c
30	3,297 ± 2.9527E-04 ^d	3,966 ± 9.1400E-03 ^c	7,258 ± 6.1367E-03 ^d
40	3,957 ± 1.8898E-02 ^e	5,642 ± 3.6749E-01 ^d	9,592 ± 2.2269E-01 ^e

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan Tabel 8 di atas dapat diketahui adanya peningkatan kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total pada planlet anggrek tanah. Peningkatan kandungan klorofil pada planlet anggrek tanah seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam fusarat yang diberikan. Uji BNT pada taraf nyata 5% menunjukkan bahwa kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total daun planlet anggrek tanah pada perlakuan konsentrasi AF 40 ppm lebih tinggi dari pada seluruh perlakuan lainnya.

4. Analisis Indeks Stomata

Indeks stomata planlet anggrek tanah dengan berbagai konsentrasi asam fusarat yang di tanam pada medium *Vacin & Went* (VW) di sajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Indeks stomata planlet *S. plicata* hasil pengimbasan AF

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm b/v)	Analisis Stomata
Kontrol (0 ppm)	5,32 ± 3.1867E-02 ^a
10	7,38 ± 1.1000E-03 ^b
20	8,62 ± 4.7270E-01 ^c
30	11,66 ± 1.9733E-02 ^d
40	13,40 ± 1.1633E-02 ^e

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Tabel 9 di atas, menunjukkan adanya peningkatan indeks stomata dari sekitar 5,32% pada kontrol, menjadi 7,38% pada perlakuan AF 10 ppm, diikuti 8,62% pada perlakuan AF 20 ppm, 11,66% pada perlakuan AF 30 ppm, dan pada konsentrasi AF 40 ppm menghasilkan indeks stomata 13,40%.

C. Analisis Sequencing daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA mutan *S. plicata* tahan *Fo*

Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) nuklear ribosomal DNA (rDNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S r DNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga. (Brinegar, 2009). Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R) (Baldwin *et al.*, 1995; Baldwin & Markos, 1998).

Sampel *S. plicata* yang digunakan untuk penanda molekular dengan analisis ITS DNA, yaitu yang mewakili pada analisis RAPD (Tahun I).

Ampifikasi daerah ITS dilakukan dengan menggunakan pasangan primer F1 (5'GATCGCG GCGGCGACTTGGGCGGTT-3') sebagai primer *forward* dan R1 (5'-GGTAGTCCCGCCTG ACCTGGG-3') sebagai primer *reverse* (Mueller et al., 2008).

Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 700-800 bp. Hal tersebut sesuai dengan analisis dengan metoda ITS rDNA, yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu pada tumbuhan berbiji (Baldwin & Markos, 1995; Baldwin *et al.*, 1998; Chase *et al.*, 2005).

Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada *S. plicata* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm. Adanya mutasi pada *S. plicata* perlakuan dapat disebabkan karena semula melalui persilangan alami, kemudian diikuti oleh pemilihan ragam oleh pemulia tanaman. Dapat pula terjadi karena pengaruh perbedaan faktor lingkungan di habitat.

BAB VII. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang sudah dicapai dalam penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Kriteria ketahanan planlet *S. plicata* pada hari ke-28 (0 ppm) kontrol dan 10 ppm adalah rentan. Pada 20 ppm dan 30 ppm kriteria ketahanannya yaitu moderat. Pada konsentrasi 40 ppm kriteria ketahanannya adalah tahan dengan intensitas penyakit hingga 0%
2. Planlet *S. plicata* yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* memiliki karakter ekspresi yang berbeda dengan planlet yang tidak tahan terhadap *Fusarium oxysporum*.
 - a. Terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada planlet yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* dibandingkan kontrol. Hal tersebut berbanding lurus dengan semakin tinggi konsentrasi asam fusarat yang diberikan semakin meningkat aktivitas enzim peroksidase.
 - b. Terjadi peningkatan kandungan fenol pada planlet yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* dibanding kontrol
 - c. Kandungan klorofil a, b, dan total pada daun planlet yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* mengalami peningkatan dibandingkan kontrol dengan semakin tinggi konsentrasi asam fusarat yang diberikan.
 - d. Indeks stomata pada daun planlet *S. plicata* yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* mengalami peningkatan dibandingkan daun planlet yang tidak tahan terhadap *Fusarium oxysporum*.
3. Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 700-800 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada *S. plicata* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm

DAFTAR PUSTAKA

- Agrawal AA, Tuzun S, & Bent E. 1999. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores, Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 390 p.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York. 922 p.
- Alkahtani M, Omer SA, El-Naggar MA, Abdel-Kareem EM, & Mahmoud MA. 2011. Pathogenesis-related Protein and Phytoalexin Induction Against Cucumber Powdery Mildew by Elicitors. *International Journal of Plant Pathology* 2(2): 63-71.
- Anonymous. 2010. *Pedoman Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas Tanaman Perkebunan*. Ditjenbun.Jakarta.
- Anonymous. 2013a. *Spathoglottis plicata* Bl. <http://www.tipsrawatrumah.com/2013/06/anggrek-tanah-spathoglottis-ground.html>. Diakses 21 April 2014.
- Anonymous. 2013b. Images for *Spathoglottis plicata* Bl. <http://www.petanimudabogor.com/product/41/445/Anggrek-Tanah-Spathoglottis-plicata#/image-product/img1346-1341639906.jpg>. Diakses 22 April 2014.
- Anonymous. 2014. *Spathoglottis plicata* Bl. <https://www.google.co.id/#q=anggrek+tanah+spathoglottis+plicata>. Diakses 21 April 2014.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojecichowski, Campbell CS, & Donoghue MJ. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277.
- Baldwin BG & Markos S. 1998. Phylogenetic Utility of the ETS of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of Calycadenia (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* (10) 3: 449-463.
- Bouizgarne, B, Bouteau HEM, Frankart C, Reboutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadrami EI. 2006. Early Physiological Responses of *Arabidopsis thaliana* Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.
- Boras O, Santos R, Matos A, Cabral P, & Arzola RS. 2001. A First Attempt to Use A *Fusarium subglutinans* Culture Filtrate For The Selection of Pineapple Cultivar to Fusariose Disease. *Plant Breeding* 120(5): 345-438.
- Brinegar C, 2009. Assessing Evolution and Biodiversity in Plants at the Molecular Level. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 5 (2): 149-159.

- Chen CM, de la Cerda KA, Kaminski JE, Douhan GW, & Wong FP. 2009. Geographic Distribution and rDNA ITS Region Sequence Diversity of *Waitea circinata* var. *circinata* Isolated from Annual Bluegrass in the United States. *Plant Disease* (93) 9: 906-911.
- Djatinika I. 2012. Seleksi Bakteri Antagonis untuk Mengendalikan Layu *Fusarium* pada Tanaman *Phalaenopsis*. *J.Hort.* 22(3):276-284.
- Gomes KA & Gomes AA. 1984. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*, Edisi ke-2. Terjemahan dari: *Statistical procedures for Agricultural Researchs*. Syamsudin E & Baharsyah JS. UI Press. Jakarta.
- Guida V, Criscuolo G, Tamburino R, Malorni L, Parente1 A, & Di Maro A. 2010. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB Reports*. <http://bmbreports.org>. Diakses 25 januari 2013.
- Hadisutrisno B. 1995. Kajian Pengendalian Hayati Penyakit Busuk Batang Vanili dengan Isolat Lemah *Fusarium batatatis* Tucker. *Buletin Ilmiah Azolla* 21: 27-35.
- Hadisutrisno B. 2004. *Taktik dan Strategi Perlindungan Tanaman Menghadapi Gangguan Penyakit Layu Fusarium*. Makalah Simposium Nasional I di Purwokerto, 2-3 Maret.
- He CY, Hsiang T, & Wolyn DJ. 2002. Induction of Systemic Disease Resistance and Pathogen Defence Responses in *Asparagus officinalis* Inoculated with Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51: 225-230.
- Jang IC, Park SY, Kim KY, Kwon SY, Kim JG, & Kwak SS. 2004. Differential Expression of 10 Sweetpotato Peroxidase Genes in Response to Bacterial Pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 451-455.
- Djaenuddin N, 2003. Bioekologi dan Pengelolaan Penyakit Layu *Fusarium oxysporum*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros. pp. 67-71.
- Landa BB, Cachinero-Diaz JM, Lemanceu P, Jimenez-Diaz RM, & Alabouvette C, 2002. Effect of Fusaric Acid and Phytoanticipins on Growth of Rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
- Lea P. & Leegood RC. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. 364 p.
- Luhova L, Lebeda A, Hedererova D, & Pec P. 2003. Activities of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum sativum* L. Under Different Light Conditions. *Plant Soil Environ* 49: 151-157.
- Marzuki I. 2014. *Pengenalan Varietas Unggul Pala Dan Cengkih*. Makalah. Disampaikan pada Pertemuan Evaluasi Dan Tukar Menukar Informasi/Teknologi Antar POPT dan PBT Lingkup BBPPTP Ambon Tanggal 4 November 2014.

- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, & Teixeira JB. 1995. Race 1 *Fusarium* Wilt tolerance on banana plants selected by Fusaric Acid. *Euphytica* 84: 67-71.
- Morpurgo R, Lopato SV, Afza R, & Novak FJ. 1994. Selection parameters for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and 4 on Diploid Banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* 75: 121-129.
- Nurcahyani E, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. Terakreditasi SK No. 110/DIKTI/Kep/2009. ISSN: 1411-7525. Vol. 12 /No. 1: 12-22
- Nurcahyani E. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Disertasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 201 p. Tidak Dipublikasikan.
- Nurcahyani, E., Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Palmer GD. 2011. *The control of orchids*. Accessed 20 January 2012. http://www.ebow.com/info_8525784_control-fusarium-wilt-orchids.html
- Remotti PC, Löffler HJM & Loten-Doting LV. 1997. Selection of Cell Lines and Regeneration of Plants Resistance to Fusaric Acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pear'. *Euphytica* 96: 237 – 245.
- Ruzin SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York. 307 p.
- Semangun H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Toyoda H, Hayashi H, & Yamamoto K. 1984. Selection of Resistance Tomato Calli to Fusaric Acid. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*. 50: 538-540.
- Vidhyasekaran P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defense Mechanism*. Marcel Dekker. New York. 553 p.
- Wedge DE & Elmer WH. 2008. *Fusarium wilt of orchids*. *ICOGO Bull.* Vol. 2. No.3. pp. 161-168.

Wibowo A. 2002. Pengendalian Penyakit Layu Fusarium pada Pisang dengan Menggunakan Isolat Nonpatogenik *Fusarium* sp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 6: 65-70.

Ye XY & Ng TB. 2002. Isolation of a Novel Peroxidase from *French bean* legumes and First Demonstration of Antifungal Activity of A Non-Milk Peroxidase. *Life Sciences* 71: 1667-1680.

No	Perguruan Tinggi	NIDN	Nama	Judul	Skema
1	Akademi Keperawatan Bahrul Ulum Jombang	0017017601	ZAUHANI KUSNUL H	Karakterisasi Kandungan Bahan Aktif dan Uji Toksisitas Ekstrak Propolis sebagai Kandidat Imunoterapi Kanker Serviks	Hibah Bersaing
2	Akademi Peternakan Brahma Putra	0009066201	YUNIANITA	Proteksi Protein DDGS dengan Tanin dari Daun Jati Terfermentasi	Fundamenta I
3	Akademi Peternakan Brahma Putra	0014056301	WAHYU PRIHTIYANTORO	Karakterisasi Fenotip dan Genotip Faktor-Faktor Virulensi Escherichia coli dari Kasus Kolibasilosis Burung Puyuh	Fundamenta I
4	Akademi Teknnologi Warga Surakarta	0617026901	MUSABBIKHAH	Inovasi Mesin Press Multi Fungsi Sistem Hidrolik Untuk Mencetak Biobriket Optimal Yang Memanfaatkan Limbah Padat Sebagai Bahan Bakar Alternatif Yang Murah Menggunakan Metode MRSN	Hibah Bersaing
5	IKIP Budi Utomo	0722075901	HARUN AHMAD	PEMAHAMAN KELUARGA TKI TERHADAP TEKNOLOGI KOMUNIKASI UNTUK KEPENTINGAN KOMUNIKASI PENDIDIKAN DALAM PEMBENTUKAN KARAKTER ANAK DI KABUPATEN INDRAMAYU	Fundamenta I
6	IKIP Budi Utomo	0017066402	RATNA DJUNIWATI LISMININGSIH	PENYUSUNAN BUKU PENGEMBANGAN BAHAN AJAR BERBASIS PROJEK UNTUK MENINGKATKAN KARAKTER MAHASISWA LEMBAGA PENDIDIKAN TENAGA KEPENDIDIKAN	Hibah Bersaing
7	IKIP Mataram	0816068102	DEDI SUMARSONO	Developing English Materials at IKIP Mataram Based on Students' Need	Hibah Bersaing
8	IKIP Mataram	0803068101	LOVY HERAYANTI	PENGEMBANGAN MEDIA PEMBELAJARAN BERBASIS MOODLE UNTUK MENINGKATKAN PENGUASAAN KONSEP DAN KETERAMPILAN BERPIKIR KREATIF CALON GURU FISIKA	Hibah Bersaing
9	IKIP PGRI Jember	0007046401	EVI HANIZAR	PEMBUATAN ANTIBODI POLIKLONAL SY 86 UNTUK PENGEMBANGAN METODE DIAGNOSIS INFERTILITAS PRIA	Hibah Bersaing
10	IKIP PGRI Madiun	0714027501	NURI ATININGSIH	Pengembangan Model Pembelajaran Bahasa Inggris Berbasis Karakter Dan Berwawasan Budaya Lokal Sebagai Upaya Optimalisasi Implementasi Kurikulum 2013 di Sekolah Menengah Pertama.	Hibah Bersaing
11	IKIP PGRI Madiun	0014086702	AGUS BUDI SANTOSO	PENGEMBANGAN BUKU AJAR MKU BAHASA INDONESIA BERBASIS KARAKTER DENGAN MENGOPTIMALKAN KEMAMPUAN MENULIS ILMIAH BAGI MAHASISWA IKIP PGRI MADIUN	Hibah Bersaing
12	IKIP PGRI Madiun	0030016602	SUMANI	PENGEMBANGAN MODUL PEMBELAJARAN MIKRO BERBASIS MORAL INTELLIGENCE DENGAN PENDEKATAN INSTRUCTION (INSTRUCTIONAL APPROACH)	Hibah Bersaing
13	IKIP PGRI Madiun	0711126601	SANUSI	Pengembangan Bahan Ajar Berorientasi KKNi untuk Penguatan Scientific Approach pada Mata Kuliah Evaluasi dan Proses Pembelajaran Matematika	Hibah Bersaing
14	IKIP PGRI Madiun	0318097104	ARIS WURYANTORO	Pengembangan Buku Ajar Menulis Sastra yang Berorientasi pada Pembentukan Karakter Siswa Kelas VIII SMP Se-Kabupaten Ngawi	Hibah Bersaing
15	IKIP PGRI Madiun	0701126101	ABRAHAM NURCAHYO	MODEL PEMBERDAYAAN MASYARAKAT GUNA PENINGKATAN KUNJUNGAN WISATAWAN KE SITUS DAN MUSEUM TRINIL NGAWI	Hibah Bersaing

No	Perguruan Tinggi	NIDN	Nama	Judul	Skema
1801	Universitas Lambung Mangkurat	0026106302	MUHAMMAD FAUZI	Model Penguatan Ketahanan Pangan Rumahtangga Petani Miskin Di Lahan Rawa Kalimantan Selatan dan Simulasi Kebijakannya.	Unggulan PT
1802	Universitas Lambung Mangkurat	0018115801	ASMU I	Rancangan Corporate Social Responsibility (CSR) untuk Meningkatkan Kesehatan Masyarakat Daerah Lahan Basah di Kecamatan Gambut Kabupaten Banjar Propinsi Kalimantan Selatan	Unggulan PT
1803	Universitas Lampung	0018105302	ADELINA HASYIM	PROBLEMATIKA PENERAPAN KURIKULUM 2013 TINGKAT SEKOLAH DASAR (SD)DI KOTA BANDAR LAMPUNG	Fundamenta I
1804	Universitas Lampung	0025036702	MARTA DINATA	PENGARUH LATIHAN DAN PEMULIHAN TERHADAP PENINGKATAN VO2 MAX	Fundamenta I
1805	Universitas Lampung	0031106503	ENDANG NURCAHYANI	ANALISIS POLA DNA DAN PROFIL PROTEIN ANGGREK TANAH (<i>Spathoglottis plicata</i> Bl.) HASIL INDUCED RESISTANCE TERHADAP <i>Fusarium oxysporum</i>	Fundamenta I
1806	Universitas Lampung	0008127005	MUHARTONO	AKTIVITAS ANTIKANKER SENYAWA BRUSEIN-A TERHADAP EKSPRESI GEN P53, BAX, DAN CASPASE 3 PADA TIKUS YANG DIINDUKSI DIMETILBENZAANTRASEN	Fundamenta I
1807	Universitas Lampung	0023097202	LUKMANUL HAKIM	PENGEMBANGAN METODE ALIRAN DAYA TIGA FASA UNTUK ANALISA JARINGAN DISTRIBUSI TENAGA LISTRIK	Fundamenta I
1808	Universitas Lampung	0026086104	RUSDI EVIZAL	Adaptasi klon kopi lokal pada naungan hutan lindung program hutan kemasyarakatan	Fundamenta I
1809	Universitas Lampung	0018097205	NOVITA TRESIANA	KEGAGALAN PEMERINTAH LOKAL DALAM PEMBANGUNAN ERA OTONOMI DAERAH: (Kebijakan Deliberatif: menggagas multistakeholder governance body dalam musrenbang desa untuk mewujudkan kebijakan/program pembangunan yang unggul di Kabupaten Lampung Selatan Provinsi Lampung)	Fundamenta I
1810	Universitas Lampung	0220127001	DEWI SARTIKA	ISOLASI DAN EFEKTIFITAS LISIS FAGE LITIK SEBAGAI BIOPRESERVATIF DALAM MENURUNKAN CEMARAN SALMONELLA VANNAMEI PADA UDANG SEGAR SERTA KEAMANANNYA SECARA IN VIVO	Fundamenta I
1811	Universitas Lampung	0028126402	ARINAL HAMNI	Karakterisasi dan optimasi pemesinan inconel 718 menggunakan sistem pelumasan kwantitas minimum dan metode respon permukaan	Fundamenta I
1812	Universitas Lampung	0023096903	EDWIN AZWAR	ANALISA KUAT TARIK KOMPOSIT BETON SELULOSA DAN HEMISELULOSA DARI SABUT KELAPA	Hibah Bersaing
1813	Universitas Lampung	0028105708	ROCHMIYATI	PENGEMBANGAN MODEL BAHAN AJAR BERBASIS KURIKULUM 2013 UNTUK PEMBELAJARAN TEMATIK TERPADU DI SEKOLAH DASAR	Hibah Bersaing
1814	Universitas Lampung	0028047203	DIKPRIDE DESPA	SMART MONITORING BESARAN LISTRIK, TEMPERATUR DAN BANDWIDTH BERBASIS MINI SINGLE BOARD COMPUTER BCM 2835	Hibah Bersaing
1815	Universitas Lampung	0008076602	MADI HARTONO	PENGUNAAN FEED ADDITIVE BRUSEIN-A DARI BUAH MAKASAR (<i>Brucea javanica</i>) TERHADAP PERFORMAN AYAM JANTAN TIPE MEDIUM	Hibah Bersaing
1816	Universitas Lampung	0013068104	AHMAD TUSI	Monitoring Leaf Water Potential (LWP) Pada Tanaman Kopi Robusta Menggunakan Near Infrared Spectroscopy untuk Peningkatan Kualitas Biji Kopi	Hibah Bersaing
1817	Universitas Lampung	0019116402	TUGIYONO	Eksplorasi Potensi Produktivitas Dan Potensi Pengembangan Pakan Biologi Pada Ekosistem Mangrove	Hibah Bersaing

No	Perguruan Tinggi	NIDN	Nama	Judul	Skema
1818	Universitas Lampung	0027107002	DYAH KOESOEMAWARDANI	Optimasi proses rusip restrukturisasi dan rusip kering beku menjadi bumbu instan	Hibah Bersaing
1819	Universitas Lampung	0014037102	HERLINAWATI	IDENTIFIKASI DAN PEMANFAATAN GELOMBANG ULTRASONIK LUMBA-LUMBA UNTUK TERAPI AUTIS	Hibah Bersaing
1820	Universitas Lampung	0023075401	SYAIFUL HIKAM	PENGEMBANGAN PADI HIBRIDA SAWAH DAN GOGO MELALUI PEMANFAATAN GEOMETRIK MARKA GENETIK DARI SUMBER GENETIK LOKAL LAMPUNG PADA LINGKUNGAN ORGANIK	Hibah Bersaing
1821	Universitas Lampung	0030107101	SONNY WIDIARTO	Pembuatan Plastik Ramah Lingkungan dari Campuran Limbah Tapioka dan Poli Asam Laktat	Hibah Bersaing
1822	Universitas Lampung	0010056505	LUSMEILIA AFRIANI	Pemodelan Perkuatan Tanah Dengan Matras Beton Sebagai Perkuatan Jalan Diatas Tanah Lempung Dengan Sistem Pengontrolan Menggunakan Mikrokontroler Arduino Uno	Hibah Bersaing
1823	Universitas Lampung	0021086003	AGUS SUYATNA	Pengembangan Program Pembelajaran Pemanasan Global dengan Pendekatan Saintifik Bagi Siswa SMA	Hibah Bersaing
1824	Universitas Lampung	0007037006	INDRA MAMAD GANDIDI	Produksi Bio-Oil dari Sampah Kota Bandar Lampung dengan Metode Pirolisis Berkatalis Dolomite Alam Lampung serta Improvisasi Proses dan Teknologi untuk Meningkatkan Kualitas Bio-Oil	Hibah Bersaing
1825	Universitas Lampung	0028065807	ERLINA RUFDAIDAH	PENGEMBANGAN MODEL PEREKONOMIAN KOPERASI SEKOLAH MENENGAH PERTAMA (SMP) MELALUI PENINGKATAN PERAN KOMITE SEKOLAH DALAM PROGRAM BINA LINGKUNGAN DI KOTA BANDARLAMPUNG	Hibah Bersaing
1826	Universitas Lampung	0004087204	AGUSTIANSYAH	STUDI PERBAIKAN PERTUMBUHAN, PRODUKSI, DAN MUTU BENIH KEDELAI DENGAN APLIKASI UNSUR HARA MIKRO DAN GIBERELIN	Hibah Bersaing
1827	Universitas Lampung	0031085204	MUHAMMAD THOHA BS JAYA	PENGEMBANGAN MODEL PEMBELAJARAN DENGAN PENDEKATAN SAINTIFIK (SCIENTIFIC APPROACH) PADA KURIKULUM 2013 TINGKAT SEKOLAH DASAR (SD) BERBASIS PEMBENTUKAN KARAKTER SISWA DI KABUPATEN PESAWARAN	Hibah Bersaing
1828	Universitas Lampung	0011066907	YUNIAR AVIATI SYARIEF	KAJI TERAP MODEL PENYULUHAN SEBAGAI UPAYA MENINGKATKAN PERILAKU KEWIRAUSAHAAN PETANI JAGUNG DI LAMPUNG SELATAN	Hibah Bersaing
1829	Universitas Lampung	0011066106	YAYUK NURMIATY	Pemupukan NPK Susulan dalam Upaya Mendapatkan Vigor Awal Benih yang Tinggi serta Efektivitas Invigorasi Benih dalam Produksi Kedelai	Hibah Bersaing
1830	Universitas Lampung	0021087603	ANNA GUSTINA	Model Komunikasi Mengenai Kajian Kebijakan Keberlanjutan Sistem Agrobisnis Dalam rangka Penataan kawasan agropolitan di kabupaten Tanggamus	Hibah Bersaing
1831	Universitas Lampung	0028068102	SIMON SUMANJOYO HUTAGALUNG	Model Tata Kelola (Governance) Dalam Rangka Akselerasi Penyelenggara Pendidikan Pada Daerah Otonom Baru di Provinsi Lampung	Hibah Bersaing
1832	Universitas Lampung	0021058103	ARISTOTELES	PENGGUNAAN OPTICAL CHARACTER RECOGNATION (OCR) PADA APLIKASI MOBILE 'VIRTUAL GUIDE' MUSEUM LAMPUNG	Hibah Bersaing
1833	Universitas Lampung	0027017102	JORFRI BOIKE SINAGA	Rancang Bangun Model Pembangkit Listrik dengan Menggunakan Teknologi Pompa Tanpa Motor (Hydraulic Ram Pump) untuk Membantu Memenuhi Listrik Pedesaan di Provinsi Lampung	Hibah Bersaing
1834	Universitas Lampung	0006055805	RUDY SUTRISNA	Sinergi Introduksi Nutrien Pembatas, Probiotik dan Vaksinasi terhadap Peningkatan Titer Antibodi Avian Influenza Itik Petelur	Hibah Bersaing

No	Perguruan Tinggi	NIDN	Nama	Judul	Skema
1835	Universitas Lampung	0015066703	SAMSU UDAYANA NURDIN	PRODUKSI NASI INSTAN FUNGSIONAL UNTUK PENDERITA DIABETES MELITUS	Hibah Bersaing
1836	Universitas Lampung	0023126403	SITI HUDAIDAH	Teknologi Diagnosis Cepat Lymphocytis Disease Virus dan Perbaikan Manajemen Budidaya Ikan Hias Genus Amphiprion	Hibah Bersaing
1837	Universitas Lampung	0019025804	HANINDA BHARATA	Pengembangan Model Pembelajaran Matematika SMP Berbasis Pendidikan Multicultural di Lampung	Hibah Bersaing
1838	Universitas Lampung	0020077509	DEDY HERMAWAN	Pengembangan Model Reformasi Birokrasi Era Otonomi Daerah: Model Kebijakan Kerjasama Antar Daerah Melalui Penetapan Zona Integritas Anti Korupsi Dan Penguatan Kapasitas Kelembagaan Lokal Dalam Rangka Mewujudkan Good Governance	Hibah Bersaing
1839	Universitas Lampung	0011116602	SIMPARMIN BR GINTING	PENENTUAN RASIO CAMPURAN REAKTAN DAN KONDISI OPERASI TERBAIK PADA SINTESIS ZSM-5 DARI PRETREATED ZEOLIT ALAM LAMPUNG (PZAL) DAN BAGASSE FLY ASH (BFA) SERTA UJI PERFORMA KATALITIK PADA PEMBUATAN ETIL ASETAT	Hibah Bersaing
1840	Universitas Lampung	0015047001	TARKONO	PEMBUATAN ETERNIT BERBASIS SERAT TANDAN KOSONG KELAPA SAWIT DAN RAMAH LINGKUNGAN	Hibah Bersaing
1841	Universitas Lampung	0019087103	DWI YULIANTI	Pengembangan Model dan Perangkat Pengembangan Kurikulum di Propinsi Lampung	Unggulan PT
1842	Universitas Lampung	0029086202	SITI SAMHATI	Pengembangan Model dan Perangkat Pembelajaran Membaca Cepat yang Efektif Berbasis Pembentukan Karakter	Unggulan PT
1843	Universitas Lancang Kuning	0021068106	ENNY INSUSANTY	MODEL PENGELOLAAN JASA LINGKUNGAN DI HUTAN ADAT RUMBIO KABUPATEN KAMPAR, RIAU	Hibah Bersaing
1844	Universitas Lancang Kuning	1021105401	SUDARMIN	Penataan Arsitektur dan Kawasan Kerajaan Kampar Kiri sebagai Pelestarian Budaya dan Pariwisata	Hibah Bersaing
1845	Universitas Ma Chung	0711097601	SOETAM RIZKY WICAKSONO	PENGEMBANGAN SITUS PENDUKUNG COMPUTER SUPPORTED COLLABORATIVE LEARNING DALAM LABORATORIUM	Hibah Bersaing
1846	Universitas Ma Chung	0722127702	TITIK DESI HARSOYO	Pengembangan Model Perilaku Disposasi Rumah Tangga Berbasis 3R (Reduce, Reuse, Recycle) Untuk Meningkatkan Partisipasi Kelompok Masyarakat Perempuan Dalam Pengelolaan Sampah	Hibah Bersaing
1847	Universitas Ma Chung	0717036601	YUSWANTO	PENGEMBANGAN PROGRAM SISTEM INFORMASI AKUNTANSI BERBASIS AKRUAL SESUAI DENGAN STANDAR AKUNTANSI PEMERINTAHAN (SAP)	Hibah Bersaing
1848	Universitas Ma Chung	0701096401	STEFANUS YUFRA M TANEQ	Pemberdayaan Wanita dan Pengentasan Kemiskinan Masyarakat Pesisir melalui Revitalisasi Pasar Tradisional: Studi Tentang Model Kewirausahaan Kolektif di Dalam Koperasi Pasar (KOPPAS)	Hibah Bersaing
1849	Universitas Mahaputra Muhammad Yamin	1014038502	HARISSATRIA	Kriopreservasi Spermatozoa Kerbau dalam Bahan Pengencer Tris Hydroxymethyl-Aminometan yang Disuplementasi Gluthatione untuk Penyediaan Semen Beku Inseminasi Buatan	Pekerti
1850	Universitas Mahasaraswati Denpasar	0011105708	DIAN TARININGSIH	PENGEMBANGAN MODEL USAHA PENDEDERAN IKAN NILA DI DESA SANDING, KECAMATAN TAMPAKSIRING KABUPATEN GIANYAR	Hibah Bersaing
1851	Universitas Mahasaraswati Denpasar	0026065907	DEWA AYU PUSPAWATI	INOVASI PEMBELAJARAN KOLABORASI ETNOSAINS LANSKAP BUDAYA SUBAK MELALUI FOTOGRAFI BERPARTISIPASI	Hibah Bersaing
1852	Universitas Mahasaraswati Denpasar	0820088501	AGUS WAHYUDI SALASA GAMA	MODEL PEMASARAN PADA PASAR SENI GUWANG KABUPATEN GIANYAR PROPINSI BALI	Hibah Bersaing

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN *PROFESSORSHIP*
UNIVERSITAS LAMPUNG**



**PERAKITAN VARIETAS UNGGUL VANILI
(*Vanilla planifolia* Andrews.) TAHAN PENYAKIT LAYU
FUSARIUM BERBASIS TEKNIK MOLEKULAR DAN
INDUCED RESISTANCE DENGAN ASAM FUSARAT**

TIM PENELITI

**Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si. (SINTA ID: 6115457)
Dr. HARDOKO INSAN QUDUS, M.Si. (SINTA ID: 6039340)
Dr. SUMARDI, M.Si. (SINTA ID: 6008224)**

**Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Professorship
Nomor Kontrak: 478/UN26.21/PN/2022
Tanggal 17 Mei 2022**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN PROFESSORSHIP UNIVERSITAS LAMPUNG**

Judul : Perakitan Varietas Unggul Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Tahan Penyakit Layu Fusarium Berbasis Teknik Molekular dan *Induced Resistance* dengan Asam Fusarat

Manfaat saintifik/sosial : Hasil akhir dari roadmap penelitian ini berupa tersedianya varietas Vanili Tahan Penyakit Layu Fusarium; dengan tersedianya bibit tersebut diharapkan kualitas, produksi dan daya jual akan meningkat sehingga dapat memajukan perekonomian para petani vanili.

Ketua Peneliti
a. Nama lengkap : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
b. SINTA ID : 6115457
c. Jabatan fungsional : Lektor kepala
d. Program studi : Biologi Terapan
e. Nomor HP : 085228255200
f. Alamat surel (e-mail) : endang.nurcahyani@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti (1)
a. Nama lengkap : Dr. Hardoko Insan Qudus, M.Si.
b. SINTA ID : 6039340
c. Program studi : Kimia
d. Alamat surel (e-mail) : hardoko.insan@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti (2)
a. Nama lengkap : Dr. Sumardi, M.Si.
b. SINTA ID : 6008224
c. Program studi : Biologi
d. Alamat surel (e-mail) : sumardi.1965@fmipa.unila.ac.id

Mahasiswa yang terlibat (1)
a. Nama lengkap : Azahra Putri Najla
b. NPM : 1917061003
c. Program studi : Biologi Terapan
d. Alamat surel (e-mail) : azahra2856@gmail.com

Jumlah staf yang terlibat : 1 orang
Mitra penelitian : Petani Vanili Srimenganten, Kec. Pulau Panggang, Tanggamus
Lokasi penelitian : FMIPA Unila, UGM Yogyakarta dan Tanggamus Lampung
Lama penelitian : 6 (enam) bulan
Biaya penelitian : Rp. 50.000.000,00,- (Lima puluh Juta Rupiah)
Sumber dana : DIPA BLU-Unila T.A. 2022

Bandar Lampung, 25 September 2022



(Dr. Eng. Sripto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.)
NIP. 19740705200003100106

Ketua Peneliti,

(Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.)
NIP. 196510311992032003

Menyetujui,
Ketua LPPM Universitas Lampung

(Dr. Ir. Lusmeilla Amani, D.E.A.)
NIP. 196505101993032008



IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian: Perakitan Varietas Unggul Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Tahan Penyakit Layu Fusarium Berbasis Teknik Molekular dan *Induced Resistance* dengan Asam Fusarat

2. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):
Mutan *Vanilla planifolia* Andrews, Asam fusarat, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (**Jenis material yang akan diteliti**), Teknik molekular berupa analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*, serta analisis enzim peroksidase mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium (**Segi penelitian**).

3. Masa Pelaksanaan

Mulai : April 2022

Berakhir : September 2022

4. Usulan Biaya: Rp. 50.000.000,-

5. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan):

Laboratorium Botani ruang *In Vitro* dan Rumah Kasa, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM; UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung.

6. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

Universitas Gadjah Mada, terutama Pusat Studi Bioteknologi, Laboratorium Rekayasa Genetika. Kontribusi dari instansi tersebut berperan dalam menganalisis bidang molekular yaitu analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot* mutan *Vanilla planifolia* Andrews. Kerjasama ini akan diwujudkan dengan melibatkan seorang staf teknisi pada instansi tersebut.

7. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek)

Teori mekanisme *Induce Resistance* vanili terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* berdasarkan analisis DNA *probe* dalam *Southern Blot*, dapat diketahui keberadaan dan ukuran gen yang menjadi mutan pada organisme tersebut, secara ilmiah **memberikan kontribusi bidang analisis molekular**; hal ini membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen penyebab vanili tahan terhadap *Fov*.

8. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala ilmiah dan tahun rencana publikasi)

Publikasi direncanakan akan disebarluaskan melalui media Jurnal International bereputasi dan Seminar International sebagai berikut.

- a. **OnLine Journal of Biological Sciences**; url: <https://thescipub.com/ojbs> atau **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**; url: <https://smujo.id/biodiv/index>
Tahun publikasi : 2023
Judul publikasi : “Characterization of Superior Varieties of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) Resistant to Fusarium Wilt Disease Based on Induced Resistance with Fusaric Acid.”
- b. **The 3rd International Conference On Natural Sciences, Mathematics, Applications, Research, and Technology (ICON-SMART 2022), Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Sam Ratulangi, Website: <http://www.icon-smart.org/>**
Tahun penyelenggaraan : 3-4 Juni 2022
Metode pelaksanaan : Hibrid di Discovery Kartika Plaza Hotel, Kuta, Bali
Judul yang diseminarkan : “Assembly of Superior Variety of Vanilla (*Vanilla Planifolia* Andrews.) Resistant to Fusarium Wilt Disease Based on Molecular Techniques and Induced Resistance with Fusaric Acid”

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	iii
DAFTAR ISI	v
RINGKASAN	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	18
BAB 5. KESIMPULAN	30
REFERENSI	31
LAMPIRAN	35

RINGKASAN

Salah satu komoditas perkebunan dengan nilai ekonomi yang cukup tinggi dan telah mempunyai nama cukup baik di pasaran Internasional adalah vanili. Kendala produksi dalam budidaya vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) salah satunya diakibatkan oleh penyakit busuk batang (Layu Fusarium). Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (*Fov*) yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif walaupun beberapa penelitian telah dilakukan. Penggunaan varietas unggul vanili yang tahan penyakit layu Fusarium dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting.

Penelitian tentang *Induced Resistance* planlet vanili dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi vanili yang tahan. Inokulasi isolat jamur *Fov* pada vanili tahan juga telah dilakukan, dilanjutkan dengan analisis pola DNA, profil protein serta analisis *sequencing*. Hasil dari penelitian sebelumnya sesuai *Roadmap* Riset: **a)** Konsentrasi AF toleran untuk seleksi vanili tahan *Fov* yaitu 90-110 ppm; **b)** Penekanan perkembangan jamur *Fov* hasil seleksi AF pada konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 ppm dan 100 ppm; **c)** Pita DNA baru berukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19) diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan vanili terhadap *Fov*; **d)** Pita protein baru (berat molekul ± 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan vanili terhadap *Fov*; **e)** Hasil analisis *sequencing* memperlihatkan bahwa amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, pada vanili yang diperlakukan dengan AF konsentrasi 90 ppm, 100 ppm, dan 110 ppm mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2, maupun 26S rDNA.

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dicapai, seperti diuraikan diatas, yaitu diperolehnya mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium, selanjutnya mutan vanili tersebut perlu dikaji lebih mendalam ke dalam lingkungan yang relevan yaitu skala *in vivo* dalam rumah kaca, dan selanjutnya uji coba di lapangan pada tahapan penelitian berikutnya. **Tujuan jangka panjang** dalam keseluruhan penelitian ini adalah memperoleh bibit/varietas mutan vanili yang tahan terhadap penyakit layu Fusarium. **Target khusus** yang ingin dicapai adalah **1)** menganalisis keberadaan mutan dan ukuran dari gen yang menjadi mutan pada vanili tahan *Fov* dengan analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*; **2)** Uji ketahanan dan karakterisasi vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*; **3)** Analisis dampak terhadap lingkungan: uji observasi dan uji adaptasi mutan vanili tahan *Fov* terhadap lingkungan untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah tersedianya data yang akurat dalam skala *in vivo* untuk memperoleh bibit/varietas mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium.

Luaran penelitian adalah: **1)** satu artikel ilmiah dalam jurnal internasional bereputasi: Journal of Biological Diversity; url: <https://smujo.id/biodiv/index>; Tahun rencana publikasi: 2023. Judul rencana publikasi: "Assembling Superior Varieties of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) Resistant to Fusarium Wilt Disease Based on Molecular Techniques"; **2)** Buku hasil penelitian ber-ISBN; **3)** Pemakalah dalam Seminar International: the 6th International Seminar on Sciences (ISS)" penyelenggara FMIPA IPB University; tahun rencana penyelenggaraan: 9-10 Agustus 2022"; **4)** Hasil Uji TKT di level TKT 4-6; dan **5)** Satu artikel yang dipresentasikan dalam pertemuan ilmiah oleh LPPM Unila.

Kata kunci : Mutan *Vanilla planifolia*; *Shouthern Blot*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*; *induced resistance*, *in vivo*

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang dan Permasalahan

Salah satu komoditas perkebunan di Indonesia dan di Provinsi Lampung khususnya, dengan nilai ekonomi yang cukup tinggi dan telah mempunyai nama cukup baik di pasaran Internasional adalah vanili. Di pasaran internasional vanili Indonesia dikenal dengan sebutan *Java Vanilla Beans* karena mempunyai kualitas terbaik dengan kadar *vanillin* 2,75% (Hadipoetyanti, 2007). *United Nations Development Programme* (UNDP), merekomendasikan bahwa vanili Indonesia tidak berbeda dari "Bourbon vanili" yang memiliki citra komoditas sangat baik di masyarakat internasional (Umamaheswari & Mohanan, 2011).

Penyakit Busuk Batang Vanili (BBV) atau dikenal juga sebagai Penyakit layu *Fusarium* disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* (Fov) yang dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar dengan akibat matinya tanaman 50 - 100%, atau bahkan tidak dapat berproduksi serta mutu buah yang berasal dari tanaman yang sakit sangat rendah (Hadisutrisno, 2004; Nurcahyani *et al.*, 2012). Penyakit ini sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif walaupun beberapa penelitian telah dilakukan. Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang aman, efisien dan efektif serta aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan varietas yang tahan (Nurcahyani *et al.*, 2021a; Nurcahyani *et al.*, 2021b; Nurcahyani *et al.*, 2021c).

Ketahanan terhadap penyakit dapat diperoleh dengan cara pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*), yaitu perlakuan sebelum infeksi patogen dengan senyawa kimia maupun dengan inokulasi mikroorganisme non patogenik (Sumardiyono dkk., 2015; Walters *et al.*, 2013). Ketahanan terimbis merupakan ketahanan yang terekspressi setelah tanaman diserang patogen serta dapat dimanfaatkan sebagai alat penting untuk untuk pengendalian hama dan penyakit tumbuhan (Heil and Bostock, 2002; War *et al.*, 2012).

Penggunaan Asam Fusarat (AF) sebagai agen penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan varian yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah

diregenerasikan menjadi tanaman maka tanaman tersebut resisten terhadap infeksi *Fo* (Purwati dkk., 2007; Gupta and Acharya, 2018).

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Sukmadjaja dkk., 2013). Asam fusarat tidak beracun apabila konsentrasi yang diberikan yaitu di bawah 10^{-6} M. Asam fusarat merupakan komponen penting dalam proses infeksi, tanaman inang yang insensitif terhadap AF diduga juga resisten/toleran terhadap infeksi *Fo* (Bouizgarne *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2008; Singh and Upadhyay, 2014).

Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada *Arabidopsis thaliana* (Bouizgarne *et al.*, 2006); tanaman nanas (Borras *et al.*, 2001), vanili (Nurcahyani *et al.*, 2012; Nurcahyani *et al.*, 2014; Nurcahyani *et al.*, 2017; Nurcahyani *et al.*, 2018); Anggrek Tanah *Spathoglottis plicata* Bl. (Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b; Andari *et al.*, 2018); *Dendrobium sonia* (Dehgahi *et al.*, 2015); Cassava (Nurcahyani *et al.*, 2019a; Nurcahyani *et al.*, 2019b; Nurcahyani *et al.*, 2021a; Nurcahyani *et al.*, 2021c); *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. (Nurcahyani *et al.*, 2020; Nurcahyani *et al.*, 2021). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Penelitian tentang *Induced Resistance* planlet vanili dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi vanili yang tahan. Inokulasi isolat jamur *Fov* pada vanili tahan juga telah dilakukan, dilanjutkan dengan analisis pola DNA, profil protein serta analisis *sequencing*. Hasil dari penelitian sebelumnya sesuai *Roadmap* Riset adalah: **a)** Konsentrasi AF toleran untuk seleksi vanili tahan *Fov* yaitu 90-110 ppm; **b)** Penekanan perkembangan jamur *Fov* hasil seleksi AF pada konsentrasi 110 ppm

lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 ppm dan 100 ppm; **c**). Pita DNA baru berukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19) diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan vanili terhadap *Fov*; **d**). Pita protein baru (berat molekul ± 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan vanili terhadap *Fov*; **e**). Hasil analisis *sequencing* memperlihatkan bahwa amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, pada vanili yang diperlakukan dengan AF konsentrasi 90 ppm, 100 ppm, dan 110 ppm mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA.

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dicapai, seperti diuraikan di atas, yaitu diperolehnya mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium, selanjutnya mutan vanili tersebut perlu dikaji lebih mendalam ke dalam lingkungan yang relevan yaitu skala *in vivo* dalam rumah kaca, dan selanjutnya uji coba di lapangan pada tahapan penelitian berikutnya. **Tujuan jangka panjang** dalam keseluruhan penelitian ini adalah memperoleh bibit/varietas mutan vanili yang tahan terhadap penyakit layu Fusarium. **Target khusus** yang ingin dicapai adalah **1**). menganalisis keberadaan mutan dan ukuran dari gen yang menjadi mutan pada vanili tahan *Fov* dengan analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*; **2**). Uji ketahanan dan karakterisasi vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*; **3**). Analisis dampak terhadap lingkungan: uji observasi dan uji adaptasi mutan vanili tahan *Fov* terhadap lingkungan untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Hasil yang diharapkan dari penelitian ini adalah tersedianya data yang akurat dalam skala *in vivo* untuk memperoleh bibit/varietas mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium.

Berdasarkan latar belakang di atas maka diperlukan penelitian yang lebih mendalam tentang *Induced Resistance* mutan *V. planifolia* tahan penyakit layu Fusarium berbasis teknik molekular, sehingga pada akhirnya akan diperoleh varietas unggul vanili tahan penyakit layu Fusarium.

B. Tujuan Khusus

Tujuan khusus yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Analisis keberadaan mutan dan ukuran dari gen mutan pada vanili tahan *Fov* dengan analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*
2. Uji ketahanan dan karakterisasi vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*
3. Analisis dampak terhadap lingkungan yaitu uji observasi dan uji adaptasi mutan vanili tahan *Fov* terhadap lingkungan

C. Urgensi Penelitian

Rencana penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya sesuai *Roadmap* Riset yang disajikan pada Gambar 1. Penelitian yang diajukan dalam proposal ini sangat penting untuk dilanjutkan dalam rangka mencapai tujuan akhir dari keseluruhan penelitian tentang vanili yaitu diperolehnya bibit/varietas baru vanili yang sudah teruji dalam skala laboratorium maupun di lapangan berbasis teknik molekular. Data awal dalam analisis dampak mutan *V. planifolia* terhadap lingkungan penting dilakukan karena data ini diperlukan dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru (mutan *V. planifolia* tahan *Fov*).

Apabila uji coba bibit *V. planifolia* mutan tahan *Fov* di rumah kaca tersebut berhasil, kemudian dilanjutkan uji coba dilapangan (Rencana penelitian selanjutnya) pada daerah-daerah endemik vanili yang terkena penyakit busuk batang vanili (*Fov*), dan apabila uji di lapangan tersebut berhasil maka selanjutnya bibit mutan diusulkan untuk dipatenkan, dan lisensinya ditawarkan ke perusahaan swasta untuk diproduksi massal.

Dalam jangka panjang, hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat petani vanili pada khususnya dalam memperoleh bibit unggul vanili yang tahan penyakit layu *Fusarium*, sehingga nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual vanili *V. planifolia* serta pendapatan petani vanili di Indonesia.

Temuan yang ditargetkan dalam proposal penelitian yang diajukan ini adalah:

- a) Keberadaan mutan dan ukuran dari gen yang menjadi mutan pada vanili tahan *Fov* dengan analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*; dengan diketahui ukuran gen-nya, maka dapat memperkuat pendapat bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan vanili tahan terhadap *Fov*, sehingga data ini dapat digunakan penguat dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru (mutan *V. planifolia* tahan *Fov*).
- b) Kriteria ketahanan dan karakterisasi vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*
- c) **Data awal** dari uji observasi dan uji adaptasi mutan vanili dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Tata kerja diatur dalam Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 61/Permentan/Ot.140/10/2011 Tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas (Anonymous, 2010).

Rencana Target Capaian pada penelitian ini disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Rencana Target Capaian dalam penelitian

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS ¹⁾
1	Artikel ilmiah dimuat di Jurnal	Internasional bereputasi	ada	tidak ada	Published (2023)
		Nasional SINTA 4 (DOI)	tidak ada	tidak ada	tidak ada
2	Buku ber ISBN	Buku hasil penelitian ber ISBN	ada	tidak ada	Terbit (2023)
2	Diseminarkan	Internasional	ada	tidak ada	Dilaksanakan (2022)
		Nasional	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		Universitas	ada	tidak ada	Dilaksanakan (2022)
3	Laporan penelitian		ada	tidak ada	ada
4	Laporan penggunaan anggaran (keuangan)		ada	tidak ada	ada
5	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)				4-6

2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ketahanan terimbis (*induced resistance*).

Pengendalian penyakit secara hayati dapat melalui interaksi antara populasi patogen dan agens hayati baik secara langsung maupun tidak langsung. Ketahanan terimbis bersifat tidak spesifik terhadap jenis patogen, sehingga dapat lebih efisien dalam pelaksanaannya (Agrios 2005). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Jendoubi *et al.*, 2015).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Saravanan *et al.*, 2004; Nurcahyani *et al.*, 2012). Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani *et al.*, 2012) dan *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016b).

Contoh aplikasi gen peroksidase yang diekspresikan dengan reporter *gus* (β -*glucuronidase*) pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) (Jang *et al.*, 2004). Enzim peroksidase yang diinduksi oleh patogen berbagai tumbuhan juga telah dilaporkan, misalnya pada mentimun (*Cucumis sativus*) (Alkahtani *et al.*, 2011), *Eustoma grandiflorum* (Popa *et al.*, 2009), kacang tanah (Ye & Ng, 2002), kacang kapri (Luhova *et al.*, 2003), *Phytolacca dioica* L (Guida *et al.*, 2010), vanili (Nurcahyani *et al.*, 2012) dan *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016b).

B. Tanaman *Vanilla planifolia* Andrews

Vanili merupakan tumbuhan epifit dan termasuk ke dalam familia Orchidaceae. Genus vanili terdiri dari sekitar 150 spesies, tetapi yang bernilai ekonomis hanya 3 spesies yaitu *V. planifolia* Andrews, *V. tahitensis* J. Wi Moore dan *V. pompona* Schieda (Besse *et al.*, 2004; Minoo *et al.*, 2008; Umamaheswari & Mohanan, 2011). Spesies yang banyak dibudidayakan, khususnya di Indonesia

adalah *V. planifolia* Andrews (Anandaraj *et al.*, 2005; Rajeev P & Dinesh R, 2005; Palama *et al.*, 2010).

International Standar Organization (ISO) telah menetapkan spesifikasi vanili yang diperdagangkan di seluruh dunia. Secara nasional telah ditetapkan oleh Dewan Standardisasi Nasional dengan nama Standar Nasional Indonesia (SNI). Standar ini meliputi definisi, klasifikasi, syarat mutu, cara pengambilan contoh, cara uji, syarat penandaan, dan cara pengemasan. Pada SNI ini produk vanili digolongkan dalam empat jenis mutu, yaitu mutu IA, mutu IB, mutu II, dan mutu III (Hadipoentyanti *et al.*, 2007). Perkembangan mutu vanili Indonesia sesuai selera pasar diharapkan merupakan vanili bermutu paling baik, yaitu mutu IA meliputi ukuran polong dan kadar vanilinnnya yang tinggi. Mutu IA yang digemari konsumen akan diperoleh bila buah berasal dari tanaman yang sehat dan sedikit pestisida kimiawi.

C. Penyakit Layu *Fusarium* (Penyakit busuk batang vanili)

Fusarium oxysporum f. sp. *vanillae* (Fov) patogen pada tanaman vanili dapat bertahan secara alami di dalam medium tumbuh dan pada akar-akar tanaman sakit. Apabila terdapat tanaman peka, melalui akar yang luka dapat segera menimbulkan infeksi. (Semangun, 2001; Hadisutrisno, 2004). Perakaran menjadi busuk dan dapat meluas ke atas sampai ke pangkal batang. Jika akar rimpang dipotong akan tampak bahwa epidermis dan hipodermis berwarna ungu, sedang *phloem* dan *xylem* berwarna ungu merah jambu muda. Akhirnya seluruh akar rimpang menjadi berwarna ungu (Semangun, 2001)

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu *Fusarium***, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati. Selain itu, *F. oxysporum* tidak diskriminatif, mereka dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting. *F. oxysporum* terbukti sangat sulit diberantas karena spora *F. oxysporum* juga dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama, sehingga rotasi tanaman bukan merupakan metode kontrol yang tepat (Djaenuddin, 2003).

D. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002).

Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, anyelir dan planlet vanili secara *in vitro* (Nurchayani *et al.*, 2012; Nurchayani *et al.*, 2014). Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen.

E. Southern Blot

Southern Blot merupakan proses perpindahan fragmen DNA yang terpisah secara elektroforesis dari gel ke membran. Metode ini diambil dari nama penemunya yaitu Edward M. Southern. Prinsipnya adalah kapilaritas, dimana bufer yang merupakan fase gerak diasumsikan akan membawa fragmen DNA dari gel ke membran. Karena muatan DNA negatif sedangkan muatan membran positif maka fragmen DNA akan menempel (blot) pada membran. Membran yang digunakan pada proses *southern blot* adalah membran nitroselulosa. Metode ini merupakan kombinasi dari elektroforesis gel agarose untuk memisahkan DNA berdasarkan ukuran fragmennya. DNA yang memiliki bobot molekul tinggi sebelumnya sudah dipotong terlebih dahulu menggunakan enzim endonuklease restriksi, kemudian dipisahkan dan dipindahfkan ke membran filter. Proses perpindahan fragmen DNA pada metode ini mengikuti prinsip kapilaritas, yaitu prinsip dimana buffer yang merupakan fase gerak membawa fragmen DNA dari gel menuju membran (Watson *et al.*, 2004; Lipinwati 2014).

Metode ini mengkombinasikan elektroforesis gel agarosa untuk memisahkan DNA berdasarkan ukurannya dan kemudian ditransfer ke membran filter untuk selanjutnya dilakukan hibridisasi dengan probe. Untuk mengidentifikasi ataupun melacak suatu fragmen DNA spesifik, diperlukan suatu pelacak (*probe*). DNA dipisahkan terlebih dahulu dengan elektroforesis. *Probe* yang dilabel akan hibridisasi pada pita-pita DNA untuk mengetahui apakah DNA tersebut mengandung gen yang diinginkan. *Southern Blot* mendeteksi DNA rantai tunggal dengan menggunakan DNA sebagai pelacak. Kegunaan dari *Southern Blot* adalah untuk menganalisis keberadaan mutan yang ada pada suatu organisme dan dapat diketahui ukuran dari gen yang menjadi mutan pada organisme tersebut (Southern, 2006; Lipinwati, 2014).

F. Uji Adaptasi Dan Uji Observasi Untuk Calon Varietas Unggul

Bibit unggul bermutu memiliki peranan yang utama dalam proses budidaya dan dituntut memiliki mutu fisiologis, mutu fisik dan genetis yang sesuai standar agar hasil produksi dari tanaman sesuai dengan yang diharapkan. Varietas unggul adalah varietas yang telah dilepas oleh pemerintah yang mempunyai kelebihan dalam potensi hasil dan/atau sifat-sifat lainnya. Suatu jenis tanaman memiliki potensi genetik yang disebut plasma nutfah, yang dapat dimanfaatkan untuk pengembangan/menciptakan jenis unggul atau varietas baru. Untuk menghasilkan bibit dengan varietas unggul, perlu diselenggarakan kegiatan eksplorasi dan inventarisasi plasma nutfah dan pemuliaan tanaman maupun kegiatan lain yang berkaitan dengan upaya untuk menemukan jenis baru serta varietas unggul. **Calon varietas unggul** dapat berasal dari varietas baru berupa galur, hibrida, **mutan**, transgenik ataupun varietas lokal yang mempunyai potensi hasil tinggi (Marzuki, 2014).

Seleksi dan uji observasi adalah dasar pembentukan varietas pada tanaman perkebunan (Marzuki, 2014). Sebelum bibit bisa disebarluaskan atau menjadi produk komersial dilakukan berbagai pengujian seperti uji adaptasi atau uji observasi. Hal ini diatur melalui UU No. 12 tahun 1992, PP No.44 tahun 1995 dan Peraturan Menteri Pertanian No. 61/Permentan/OT.140/8/2011.

Uji Adaptasi adalah kegiatan uji lapang di beberapa agroekologi bagi tanaman semusim, untuk mengetahui keunggulan dan interaksi varietas terhadap lingkungan. Uji adaptasi ini merupakan salah satu cara untuk menilai kelayakan suatu varietas untuk dapat dilepas secara resmi kepada masyarakat pengguna. (Anonymous, 2010).

G. Hasil penelitian Sebelumnya yang sudah dicapai

Proposal yang diajukan dalam penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya sesuai *Roadmap* Riset yang disajikan pada **Gambar 1**.

Hasil penelitian yang sudah dicapai sebelumnya adalah diperolehnya mutan *V. planifolia* tahan penyakit layu Fusarium, dengan kesimpulan sebagai berikut.

1. Kisaran konsentrasi Asam Fusarat toleran untuk seleksi planlet *V. planifolia* secara *in vitro* adalah 90-110 ppm
2. Secara *in vitro* penekanan jamur *Fov* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 dan 100 ppm, konsentrasi AF 110 ppm mampu mengimbangi ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ketahanan
3. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase dan ketebalan lignin pada planlet *V. planifolia* tahan *Fov*
4. Pita DNA baru (spesifik) mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19) 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *V. planifolia* yang tidak diimbangi (kontrol) dan diimbangi AF. Pita protein (berat molekul ± 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Protein dengan berat molekul sekitar 18 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fov*.

5. Hasil analisis *sequencing* memperlihatkan bahwa amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, pada vanili yang diperlakukan dengan AF konsentrasi 90 ppm, 100 ppm, dan 110 ppm mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA.
6. Mutan *V. planifolia* selanjutnya di aklimatisasi di rumah kaca, kemudian dilakukan propagasi/perbanyak di rumah kaca.

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dicapai, seperti diuraikan diatas, yaitu diperolehnya mutan vanili tahan penyakit layu Fusarium, selanjutnya mutan vanili tersebut perlu dikaji lebih mendalam ke dalam lingkungan yang relevan yaitu skala *in vivo* dalam rumah kaca, dan selanjutnya uji coba di lapangan pada tahapan penelitian berikutnya. Tujuan jangka panjang dalam keseluruhan penelitian ini adalah memperoleh bibit/varietas mutan vanili yang tahan terhadap penyakit layu Fusarium. Target khusus yang ingin dicapai dalam proposal ini adalah 1). menganalisis keberadaan mutan dan ukuran dari gen yang menjadi mutan pada vanili tahan *Fov* dengan analisis DNA menggunakan *probe* dalam *Southern Blot*; 2). Uji ketahanan dan karakterisasi vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*; 3). Analisis dampak terhadap lingkungan: uji observasi dan uji adaptasi mutan vanili tahan *Fov* terhadap lingkungan untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru.

Peta Jalan (*Road Map*) riset/penelitian disajikan pada **Gambar 1** sebagai berikut.

Roadmap riset

Perakitan Varietas Unggul Vanili
(*Vanilla planifolia* Andrews) Tahan Penyakit
Layu Fusarium Berbasis Teknik Molekular dan
Induced Resistance dengan Asam Fusarat

STUDI PENDAHULUAN (*)

Seleksi *in vitro* planlet dengan asam fusarat

1. Medium MS + asam fusarat (AF) konsentrasi 0, 90, 100, dan 110 ppm
2. Penanaman planlet *V. planifolia* secara *in vitro*
3. Pengamatan parameter pertumbuhan (persentase planlet hidup, tinggi & jumlah tunas, jumlah daun & akar)

PENELITIAN SUDAH DILAKUKAN (*)

Pengamatan karakter anatomi dan uji biokimia *V. planifolia* hasil pengimbasan AF Pengamatan Pola DNA & Profil protein *V. planifolia* tahan *Fov*

1. Menggunakan metoda SDS-PAGE untuk analisis profil protein
2. Menggunakan metode RAPD untuk analisis pola DNA

PENELITIAN SUDAH DILAKUKAN (*)

1. Analisis Seqencing daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dan protein peroksidase mutan *V. planifolia* tahan *Fov*
2. Analisis ketahanan & mikropropagasi mutan *V. planifolia* tahan *Fov* secara *in vitro*
3. Karakterisasi mutan *V. planifolia*: peningkatan kerapatan stomata dan klorofil

PENELITIAN DILAKUKAN dalam PPr. (**) 2022

1. Propagasi bibit *V. planifolia* mutan tahan *Fov* di rumah kaca (*in vivo*)
2. Analisis DNA mutan *V. planifolia* menggunakan *probe* dalam *Southern blot*.
3. Uji ketahanan dan karakterisasi mutan vanili yang tahan *Fov* secara *in vivo*
4. Analisis dampak terhadap lingkungan: Uji observasi dan adaptasi mutan *V. planifolia* tahan *Fov* terhadap lingkungan untuk memperoleh Data Awal.

RENCANA PENELITIAN YANG AKAN DILAKUKAN (***)

1. Uji di lapangan pada beberapa sentra lokasi vanili endemik busuk batang (*Fov*)
2. Apabila uji coba bibit *V. planifolia* mutan tahan *Fov* di lapangan tersebut berhasil, selanjutnya bibit mutan tersebut dipatenkan, kemudian lisensinya dijual ke perusahaan swasta untuk diproduksi massal

Keterangan:

(*) Penelitian Pendahuluan & Penelitian yang sudah dilakukan

(**) Penelitian yang dilakukan dalam penelitian ini (PPr. 2022)

(***)Rencana Penelitian yang akan dilakukan setelah kegiatan yang diusulkan dalam proposal ini selesai

Gambar 1. Road Map Riset/Penelitian

BAB III. METODE PENELITIAN

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari tahap kegiatan dalam penelitian.

1. Analisis *Southern Blot*

DNA yang digunakan dalam penelitian ini, adalah hasil dari isolasi mutan DNA *Vanilla planifolia* yang di propagasi secara *in vivo* di rumah kaca.

Analisis *Southern Blot* dilakukan mengikuti prosedur dari Panaud *et al.* (1993).

DNA genomik (20 µg) dipotong menggunakan enzim restriksi BamHI dan EcoRI. DNA yang terpotong difraksionasi pada gel agarose 1% selama semalam. Selanjutnya, DNA ditransfer (*blotting*) ke membran nylon hybond N+ (Amersham). DNA fragmen dari gen cry1A(b) dipotong dengan enzim restriksi BamHI dan EcoRI dan dilabel dengan pelabel dig-UTP (Boehringer Mannheim) menggunakan mesin PCR. DNA genomik mutan vanili pada membran dihibridisasi dengan *probe* yang terlabel dan dilakukan deteksi signal serta autoradiografi.

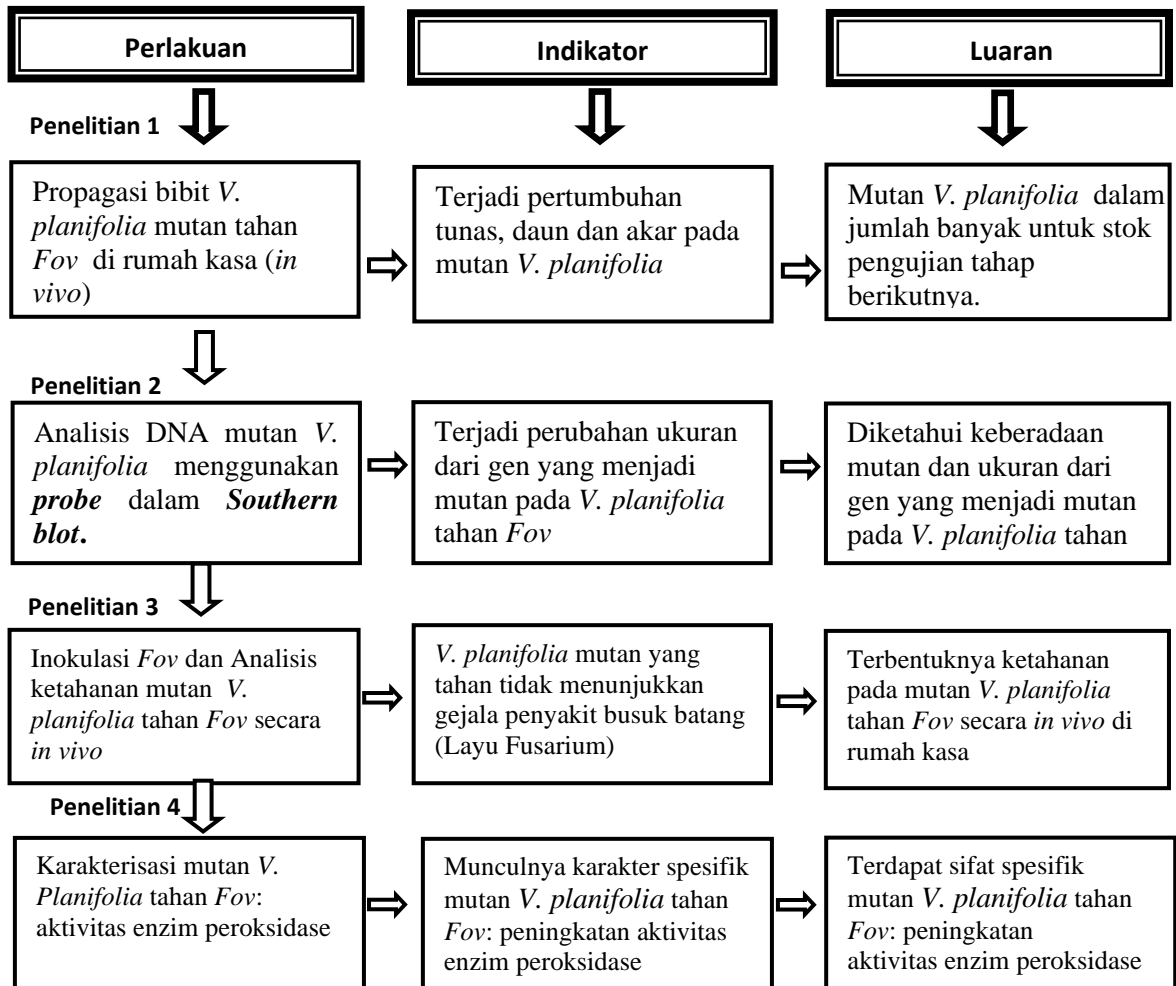
2. Analisis ketahanan mutan *V. planifolia* tahan *Fov* secara *in vivo* di rumah kaca

Aklimatisasi dilakukan dengan memindahkan planlet ke dalam *polybag* dan di aklimatisasikan selama 2 minggu di *rumah kaca*, kemudian diadakan propagasi. Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fov* dilakukan secara langsung pada mutan *V. planifolia*. Mikrokonidium jamur *Fov* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL ditetaskan pada daun 1-2 tetes, kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

3. Analisis Enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Dibuat campuran 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 ml ekstrak enzim dari daun planlet *P. amabilis*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂. Campuran diendapkan dalam suhu kamar dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer (*Beckman DU-65*) diatur dengan panjang gelombang 420 nm dan dibaca dari nol. Pada tahap awal ditambahkan 100 µL 1% H₂O₂ pada kuvet yang sudah terisi campuran sampel dan dibaca. Aktivitas enzim dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah aktivitas berubahnya OD 420 nm pada spektrofotometer per menit.

Tahapan penelitian pada penelitian PPr. 2022 disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam **Gambar 2**.



Gambar 2. Bagan Alir Tahapan Penelitian dalam Penelitian

Berikut disajikan tabulasi pembagian tugas dalam penelitian ini

Tim Peneliti Dosen

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi waktu (Jam/Minggu)	Uraian Tugas
1	Dr. Endang Nurcahyani, M.Si./ 0031106503 (Ketua)	Program Studi Biologi Terapan FMIPA Unila	Molekular Bioteknologi Tumbuhan	10	-Manajemen Penelitian -Analisis Molekular: Analisis DNA mutan <i>V. planifolia</i> menggunakan probe dalam Southern blot . -Inokulasi <i>Fov</i> dan Analisis ketahanan mutan <i>V. planifolia</i> tahan <i>Fov</i> secara <i>in vivo</i> (rumah kaca) -Monitoring seluruh kegiatan penelitian
2	Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S./0003026102 (Anggota 2)	Program Studi Kimia FMIPA Unila	Kimia Analitik	8	Karakterisasi mutan <i>V. planifolia</i> tahan <i>Fov</i> : Analisis aktivitas enzim peroksidase
3	Dr. Sumardi, M.Si./ 0025036505 (Anggota 1)	Program Studi Magister Biologi FMIPA Unila	Mikrobiologi	8	-Isolasi jamur <i>F. oxysporum</i> dari <i>V. planifolia</i> -Perbanyakkan monospora <i>F. oxysporum</i>

Mahasiswa yang terlibat penelitian

No	Nama/NPM	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi waktu (Jam/Minggu)	Uraian Tugas
1	Azahra Putri Najla/ 1917061003	Prodi S1 Biologi Terapan FMIPA Unila	Bioteknologi Tumbuhan	10	- Propagasi bibit <i>V. planifolia</i> mutan tahan <i>Fov</i> di rumah kaca (<i>in vivo</i>)
2	Rina Maryani/ 2127021010	Prodi S2 Biologi FMIPA Unila	Bioteknologi Tumbuhan	10	- Analisis dampak terhadap lingkungan: Uji observasi dan adaptasi mutan <i>V. planifolia</i> tahan <i>Fov</i> terhadap lingkungan

Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di

dukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan 5 ulangan mutan *V. planifolia* dibandingkan kontrol. Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Tukey Comparison pada taraf kepercayaan 95%.

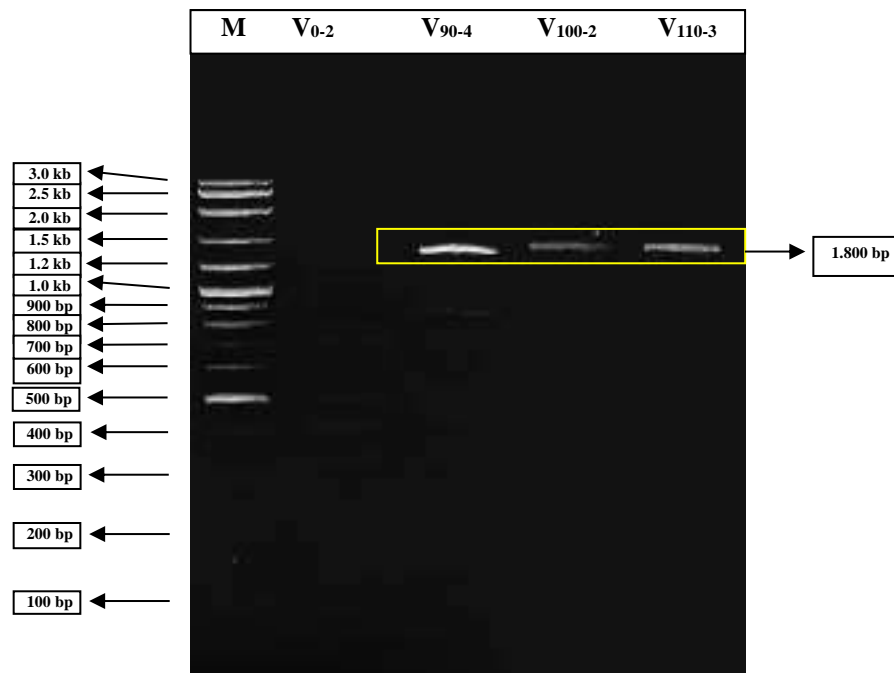
BAB 4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian dibagi dalam empat bagian, dimulai dari: 1) Analisis DNA mutan *V. planifolia* menggunakan *probe* dalam *Southern blot*, untuk mengetahui keberadaan mutan dan ukuran dari gen yang menjadi mutan pada *V. planifolia* tahan *Fov*; 2) Hasil uji ketahanan planlet vanili terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* (*Fov*), yang meliputi: (a) hasil isolasi isolat dan monospora *Fov*; (b) hasil inokulasi *Fov* pada mutan vanili; 3) Karakterisasi mutan *V. planifolia* tahan *Fov*: aktivitas enzim peroksidase; terdapat sifat spesifik mutan *V. planifolia* tahan *Fov*: peningkatan aktivitas enzim peroksidase; 4) Analisis dampak terhadap lingkungan: Uji observasi dan adaptasi mutan *V. planifolia* tahan *Fov* terhadap lingkungan, untuk mendapatkan data awal dampak mutan *V. planifolia* tahan *Fov* yang digunakan dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Hasil penelitian dan pembahasannya berturut-turut disajikan sebagai berikut.

1. Analisis *Southern Blot*

DNA yang digunakan dalam penelitian ini, adalah hasil dari isolasi mutan DNA *Vanilla planifolia* yang di propagasi secara *in vivo* di rumah kaca. Analisis *Southern Blot* dilakukan mengikuti prosedur dari Panaud *et al.* (1993).

Hasil analisis *Southern Blot* pada mutan *Vanilla planifolia* tahan *Fov* disajikan pada **Gambar 1** sebagai berikut.



Gambar 1. Hasil analisis *Southern Blot* dari DNA sampel mutan tanaman *Vanilla planifolia* dibandingkan dengan kontrol, yang dipotong dengan enzim *EcoRI* dan *Bam HI*. **Keterangan:** M = ladder, **V₉₀₋₄**; **V₁₀₀₋₂**; **V₁₁₀₋₃**= mutan tanaman *V. planifolia* , **V₀₋₂**= tanaman kontrol (tanpa perlakuan asam fusarat dan inokulasi *Fov*).

Identifikasi tanaman mutan menggunakan amplifikasi PCR dari mutan sangat penting karena dengan teknik tersebut dapat mengidentifikasi tanaman putatif transgenik secara cepat dan dalam jumlah yang banyak. Jadi dengan teknik tersebut akan menghemat waktu dan tenaga, namun demikian informasi mengenai gen target yang telah tertransfer akan menjadi fungsional tidak dapat dijelaskan dengan teknik PCR, oleh karena itu identifikasi keberadaan mutan perlu dilakukan menggunakan analisis *Southern Blot*; dengan metode *Southern Blot* ini akan diketahui informasi tentang jumlah kopi dari gen target sehingga level ekspresi dari masing-masing gen target yang ditransfer dapat ditentukan.

DNA dari 3 mutan dan 1 kontrol tanaman vanili digunakan sebagai bahan untuk analisis *Southern Blot*. Setelah dipotong dengan 2 enzim restriksi *EcoRI* dan *BamHI* yang merupakan enzim pengapit gen *cry1A(b)* (sekitar 1.800 bp), DNA ditransfer ke membran nylon dan selanjutnya dihibridisasi dengan probe spesifik

gen *cry1A(b)* serta dideteksi dengan senyawa chemiluminesen (NBT-BCIP). Hasil hibridisasi *Southern Blot* menunjukkan bahwa 3 sampel tanaman yang positif pada pengujian PCR ternyata juga positif pada analisis *Southern Blot*-nya yang ditandai dengan terbentuknya 1 pita DNA. Hasil ini semakin membuktikan bahwa gen *cry1A(b)* yang ditembakkan telah terintegrasi ke dalam kromosom tanaman vanili. Pola pita DNA yang terbentuk sama karena sampel tanaman T1 yang diuji merupakan tanaman yang berasal dari tanaman yang sama.

Dengan pemotongan menggunakan 2 macam enzim restriksi *EcoRI* dan *BamHI* dihasilkan 1 pita DNA yang mempunyai ukuran se-kitar 1.800 bp. Hasil ini menunjukkan bahwa gen *cry1A(b)* telah terintegrasi pada genom mutan tanaman vanili. Dari fragmen DNA tersebut, fragmen yang berukuran 1,8 kb bersesuaian dengan sekuen gen *cry1A(b)* utuh.

2. Analisis ketahanan mutan *V. planifolia* tahan *Fov* secara *in vivo* di rumah kaca

Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fov* dilakukan secara langsung pada mutan *V. planifolia*. Mikrokonidium jamur *Fov* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL diteteskan pada daun 1-2 tetes, kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002). Mutan *V. planifolia* dan vanili kontrol di rumah kaca disajikan berturut turut pada Gambar 2, Gambar 3, Gambar 4 dan Gambar 5 sebagai berikut.



Gambar 2. Tanaman *V. planifolia* kontrol (tanpa perlakuan Asam Fusarat dan inokulasi *Fov*)



Gambar 3. Mutan tanaman *V. planifolia* perlakuan Asam Fusarat 90 ppm dan inokulasi *Fov*)



Gambar 4. Mutan tanaman *V. planifolia* perlakuan Asam Fusarat 100 ppm dan inokulasi *Fov*)



Gambar 5. Mutan tanaman *V. planifolia* perlakuan Asam Fusarat 110 ppm dan inokulasi *Fov*)

kontrol. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 90 ppm dan 100 ppm kecuali pada $V_{90.6}$ dan $V_{100.5}$. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 110 ppm kecuali pada $V_{110.4}$ dan $V_{110.8}$. Gejala tersebut merupakan karakteristik layu *Fusarium*, sehingga dapat dilakukan perhitungan persentase daun layu atau kuning (**Tabel 1**).

Tabel 1. Persentase daun layu atau kuning pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan	Persentase daun layu atau kuning pada hari pengamatan ke:				
	0	4	8	12	16
Kontrol	0	31,25	68,75	93,75	100,00
90 ppm	0	18,75	25,00	31,25	37,50
100 ppm	0	25,00	31,25	50,00	50,00
110 ppm	0	0,00	6,25	6,25	18,75

Berdasarkan **Tabel 1** diketahui, gejala daun layu atau kuning yang muncul pada hari ke-5 setelah inokulasi menunjukkan bahwa persentase daun layu atau kuning pada kontrol telah mencapai rata-rata 31,25%. Pada perlakuan 90 dan 100 ppm persentase daun layu atau kuning mencapai 18,75% dan 25,00%, sedangkan perlakuan 110 ppm baru menunjukkan gejala daun layu pada hari ke-16. Hasil pengamatan hari ke-8 menunjukkan bahwa persentase daun layu atau kuning pada perlakuan 90 ppm meningkat menjadi 25,00%. Peningkatan persentase daun layu atau kuning juga terjadi pada perlakuan 100 ppm yaitu menjadi 31,25%, sedangkan pada perlakuan 110 ppm persentase daun layu atau kuning 6,25%.

Kenaikan persentase daun layu atau kuning pada pengamatan hari ke-12 terjadi pada kontrol, perlakuan 90 ppm dan 100 ppm (93,75%; 31,25%; dan 50,00%). Untuk perlakuan 110 ppm tidak mengalami kenaikan persentase daun layu atau kuning. Persentase daun layu atau kuning pada hari ke-16 setelah inokulasi, pada kontrol meningkat menjadi 100%, pada perlakuan 90 ppm terjadi peningkatan pula menjadi 37,50%, dan pada perlakuan 110 ppm menjadi 18,75%, sedangkan pada perlakuan 100 ppm tidak mengalami kenaikan persentase tetap 50,00%.

Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala daun layu atau kuning yang muncul maka dapat diketahui persentase intensitas penyakit dan kriteria ketahanan dari masing-masing perlakuan (**Tabel 2**).

Tabel 2. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan dan tingkat ketahanan vanili pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan	Hari pengamatan							
	4		8		12		16	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
Kontrol	62,50	Rentan	91,67	Rentan	93,75	Rentan	100,00	Rentan
90 ppm	31,25	Moderat	33,33	Moderat	41,67	Moderat	50,00	Moderat
100 ppm	33,33	Moderat	41,67	Moderat	50,00	Moderat	50,00	Moderat
110 ppm	00,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan

Keterangan: IP= Intensitas Penyakit

Berdasarkan **Tabel 2** dapat diketahui bahwa pada hari ke-16, intensitas penyakit tertinggi ditunjukkan oleh kontrol (100%), sehingga dinyatakan rentan terhadap penyakit layu *Fusarium*, sedangkan perlakuan 90 dan 100 ppm memiliki intensitas penyakit 50%, dan kriteria ketahanannya adalah moderat. Pada perlakuan 110 ppm intensitas penyakit sebesar 25% sehingga kriteria ketahanannya adalah tahan. Berdasar hal tersebut dapat diketahui bahwa intensitas penyakit perlakuan AF 110 ppm tidak mengalami peningkatan sejak hari ke-8 hingga ke-16.

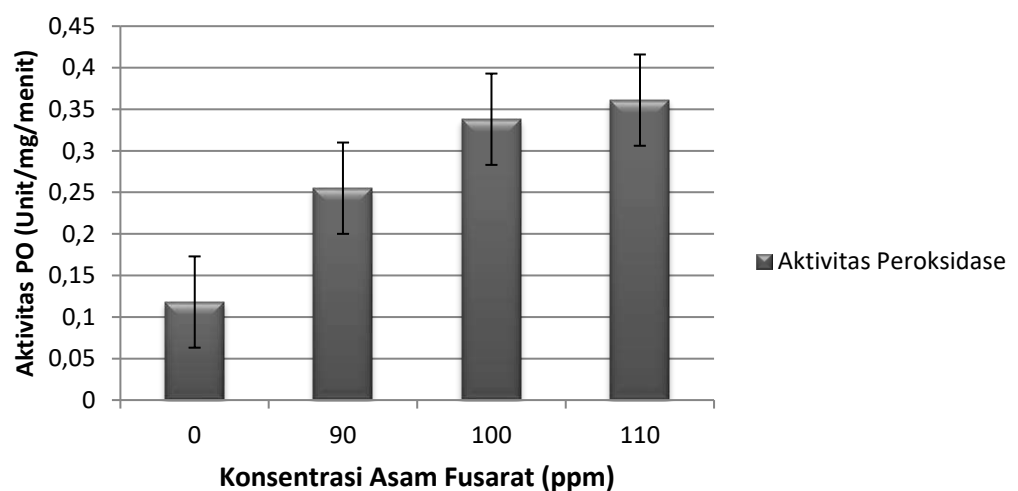
Berdasarkan data intensitas penyakit dan kategori ketahanannya, dapat diketahui pula bahwa perlakuan AF 110 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik, dapat menekan intensitas penyakit hingga 25% dan menaikkan kriteria menjadi tahan. Hal ini menunjukkan bahwa AF mampu mengimbas ketahanan planlet vanili terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Arai dan Takeuchi (1993) yang menyatakan bahwa toksin murni AF dan filtrat AF dapat digunakan sebagai komponen seleksi karena adanya korelasi antara ketahanan terhadap toksin dengan ketahanan terhadap penyakit. Hasil penelitian ini juga mendukung pernyataan Agrios (2005) yang menyatakan bahwa ekspresi dari pengimbasan ketahanan adalah dengan menurunnya intensitas penyakit.

3. Analisis Enzim peroksidase

Mutagen dapat menyebabkan perubahan basa DNA sehingga struktur gen juga mengalami perubahan (Silverio *et al.*, 2007). Jika terjadi perubahan gen dapat mengaktifasi gen yang berperan dalam pertahanan, sehingga akan terbentuk mutan yang tahan terhadap suatu penyakit (Potdukhe, 2004). Menurut Saravanan *et al.* (2004) gen ketahanan hipersensitif dominan yang diekspresikan pada tanaman adalah gen penyandi enzim peroksidase. Enzim ini umumnya berperan dalam mekanisme ketahanan terhadap penyakit sehingga aktivitasnya dapat dijadikan sebagai induksi ketahanan.

Pada penelitian ini, aktivitas enzim peroksidase sebagai suatu mekanisme ketahanan mutan vanili terhadap *Fov* telah diukur dengan menggunakan metode Saravanan *et al.* (2004), pada mutan vanili yang diimbasi asam fusarat (konsentrasi 90 ppm, 100 ppm, dan 110 ppm), dan kontrol. Hasil penelitian yang berupa histogram dari aktivitas enzim peroksidase disajikan pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Aktivitas enzim peroksidase vanili yang tidak diimbasi (kontrol) dan mutan vanili diimbasi asam fusarat (90, 100, dan 110 ppm), umur 14 hari

Berdasarkan **Gambar 9** di atas dapat diketahui adanya indikasi peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang signifikan dari tiga konsentrasi cekaman AF yang berbeda. Pada konsentrasi AF 90 ppm menghasilkan aktivitas peroksidase 0,25 U/mg/min, konsentrasi 100 ppm menyebabkan aktivitas peroksidase 0,34 U/mg/min dan pada konsentrasi AF 110 ppm menghasilkan 0,36 U/mg/min. Pada

kontrol, aktivitas peroksidase sebesar 0,12 U/mg/min. Satu unit aktivitas enzim adalah perubahan absorbansi pada spektrofotometer pada satu mg protein per menit. Hasil penelitian tersebut membuktikan adanya peningkatan konsentrasi cekaman AF akan meningkatkan pula aktivitas enzim peroksidase.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Jang *et al.* (2004) yang meneliti aktivitas enzim peroksidase pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) setelah diinfeksi dengan bakteri *Pectobacterium chrysanthemi* dengan lama waktu yang berbeda-beda, menunjukkan bahwa aktivitas peroksidase meningkat 3-4 kali. Aktivitas enzim peroksidase juga pernah diteliti oleh Popa *et al.* (2009), pada transforman *Eustoma grandiflorum* yang diimbas strain *Agrobacterium rhizogenes* yang berbeda. Hasil menunjukkan bahwa peningkatan aktivitas peroksidase 1-2,5 kali pada genotip *Heidi pink*, 1-2 kali pada *Heidi blue* dan 3,1-10,8 kali pada *Echo white*.

Selain itu penelitian ini juga didukung oleh penelitian Yanti (2011), yang menunjukkan bahwa ada peningkatan aktivitas enzim peroksidase sekitar 8 kali pada bibit pisang kepok yang diperlakukan dengan mutagen *Ethyl Methane Sulphonat* (EMS) dibandingkan kontrol. Aktivitas enzim peroksidase juga telah dipublikasi oleh Harni *et al.* (2012), pada tanaman nilam (*Pogostemon cablin*) yang diinfeksi oleh bakteri endofit dan nematoda *Pratylenchus brachyurus* menunjukkan adanya peningkatan yang signifikan oleh *Achromobacter xylosoxidans* TT2, *Pseudomonas putida* EH11 dan *Alcaligenes faecalis* NJ16. Yuhermita (2002), melaporkan bahwa pada buah cabe rawit yang tahan penyakit antraknosa mengalami peningkatan aktivitas peroksidase 2 kali lebih tinggi dibandingkan dengan cabai keriting yang rentan. Hadi (2003), menyatakan bahwa tanaman karet yang tahan terhadap penyakit *Corynespora* mempunyai aktivitas enzim peroksidase yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol.

Menurut Saravanan *et al.* (2004), pembentukan protein peroksidase dan aktivitasnya tergantung dari tingkat cekaman patogen dan jenis patogennya. Fakta ini didukung oleh penelitian Alkahtani *et al.* (2011), yang meneliti berbagai perlakuan cekaman abiotik terhadap mentimun dapat meningkatkan aktivitas enzim peroksidase. Selanjutnya Sprecher *et al.* (1993) meneliti aktivitas enzim

peroksidase pada *Myriophyllum spicatum* L. dan *Hydrilla verticillata*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim peroksidase meningkat 2-3 kali dibanding kontrol setelah diinduksi oleh cekaman herbisida.

Adanya indikasi peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang signifikan dari tiga konsentrasi cekaman AF yang berbeda pada planlet vanili diduga karena cekaman AF dapat menyebabkan peningkatan senyawa peroksida (H_2O_2). Bouizgarne *et al.* (2006) dan Patel *et al.* (2007), menyatakan bahwa AF pada konsentrasi 10^{-7} dapat mengimbas produksi dan meningkatkan H_2O_2 dalam medium kultur. Peroksida merupakan senyawa yang dapat memicu meningkatnya aktivitas enzim peroksidase. Selain H_2O_2 sebagai senyawa yang bersifat toksik bagi patogen, enzim peroksidase juga dapat menjadi katalisator dalam pembentukan lignin.

Selanjutnya, Agrios (2005) mengemukakan bahwa pada tanaman yang tahan terjadi peningkatan aktivitas peroksidase, sedangkan pada tanaman yang peka tidak ada perubahan atau bahkan aktivitas peroksidase menurun dibandingkan dengan tanaman sehat.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan di muka dapat diambil kesimpulan dan saran sebagai berikut.

1. Hasil hibridisasi *Southern Blot* menunjukkan bahwa 3 sampel tanaman yang positif pada pengujian PCR ternyata juga positif pada analisis *Southern Blot*-nya yang ditandai dengan terbentuknya 1 pita DNA. Hasil ini semakin membuktikan bahwa gen *cry1A(b)* yang ditembakkan telah terintegrasi ke dalam kromosom tanaman vanili. Pola pita DNA yang terbentuk sama karena sampel tanaman T1 yang diuji merupakan tanaman yang berasal dari tanaman yang sama.
2. Secara *in vivo* penekanan perkembangan jamur *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* menggunakan seleksi asam fusarat pada konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 dan 100 ppm. Konsentrasi asam fusarat 110 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik, sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%.
3. Semakin meningkat konsentrasi asam fusarat maka meningkat pula aktivitas peroksidase pada tanaman vanili tahan *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*.

REFERENSI

- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York. 922 p.
- Alkahtani M, Omer SA, El-Naggar MA, Abdel-Kareem EM, & Mahmoud MA. 2011. Pathogenesis-related Protein and Phytoalexin Induction Against Cucumber Powdery Mildew by Elicitors. *International Journal of Plant Pathology* 2(2): 63-71.
- Anandaraj M, Rema J, Sasikumar B, & Suseela-Bhai R. 2005. *Vanilla (Extension Pamphlet)*. Printers Castle, Kochi. 11p.
- Andari G, **Nurcahyani E**. 2018. Analisis Kandungan Klorofil Hasil Ketahanan Terimbas *Fusarium oxysporum* terhadap *Spathoglottis plicata* Secara *In Vitro*. *Musamus Journal of Animal Livestock Science*, 1 (1). pp. 17-26.
- Anonymous. 2010. *Pedoman Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas Tanaman Perkebunan*. Ditjenbun.Jakarta.
- Bouizgarne, B, Bouteau HEM, Frankart C, Rebutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadrami EI. 2006. Early Physiological Responses of *Arabidopsis thaliana* Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.
- Brinegar C, 2009. Assessing Evolution and Biodiversity in Plants at the Molecular Level. Kathmandu University Journal of Science, *Engineering and Technology* 5 (2): 149-159.
- Dehgahi, R., Latiffah, Z., Azhar, M., Alireza, J., and Sreeramanan, S. 2015. Effects of Fusaric Acid Treatment on The Protocorm-like Bodies of *Dendrobium sonia*-28. Springer. 253(5): 1373–1383.
- Guida V, Criscuolo G, Tamburino R, Malorni L, Parente1 A, & Di Maro A. 2010. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB Reports*. <http://bmbreports.org>. Diakses 25 januari 2013.
- Gupta, N.S., and Acharya, K. 2018. Fungal Toxin as Potential Tool for *in vitro* Selection and Regeneration of Resistant Plants. *Asian J. Plant Pathol.* 12(1) : 38-45.
- Hadipoentyanti E, Ruhnayat A, Udarno L. 2007. *Booklet Teknologi Unggulan Tanaman Perkebunan: Vanili*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. 21 p.
- Hadisutrisno B. 2004. *Taktik dan Strategi Perlindungan Tanaman Menghadapi Gangguan Penyakit Layu Fusarium*. Makalah Simposium Nasional I di Purwokerto, 2-3 Maret.
- Heil, M., and Bostock, R.M. 2002. Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. *Annals of Botany*. 89: 503-512.

- Jang IC, Park SY, Kim KY, Kwon SY, Kim JG, & Kwak SS. 2004. Differential Expression of 10 Sweetpotato Peroxidase Genes in Response to Bacterial Pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 451-455.
- Djaenuddin N, 2003. Bioekologi dan Pengelolaan Penyakit Layu Fusarium: *Fusarium oxysporum*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros. pp. 67-71.
- Jendoubi, W., Harbaoui, K., and Hamada,W. 2015. Salicylic Acid-Induced Resistance Against *Fusarium oxysporum* s.p. *Radici-Lycopersici* in Hydroponic Grown Tomato Plants. *Journal of New Sciences, Agriculture and Biotechnology*. ISSN 2286-5314, 21(5): 985-995.
- Lipinwati. 2014. Diagnosis Molekuler Human Papilloma Virus (HPV) Penyebab Kanker Serviks. *Jambi Medical Journal*. 2(1): 78-86.
- Luhova L, Lebeda A, Hedererova D, & Pec P. 2003. Activities of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum sativum* L. Under Different Light Conditions. *Plant Soil Environ* 49: 151-157.
- Marzuki I. 2014. *Pengenalan Varietas Unggul Pala Dan Cengkih*. Makalah. Disampaikan pada Pertemuan Evaluasi Dan Tukar Menukar Informasi/Teknologi Antar POPT dan PBT Lingkup BBPPTP Ambon Tanggal 4 November 2014.
- Minoo D, Jayakumar VN, Veena SS, Vimala J, Basha A, Saji KV, Babu KN, & Peter KV. 2008. Genetic Variations and Interrelationships in *Vanilla planifolia* and Few Related Species as Expressed by RAPD Polymorphism. *Genet. Resour Crop Evol* 55: 459-470.
- Nurcahyani E**, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. 12 (1): 12-22.
- Nurcahyani E.**, Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia Andrews*) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Nurcahyani E.**, R. Agustrina, & T.T. Handayani. 2016a. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Science* 4 (5): 102-105.
- Nurcahyani E.**, Rochmah Agustrina, Erdi Suroso, & Gardis Andari. 2016b. Analysis of Peroxidase Enzyme and Total Phenol from Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Bl) as Result of the *In Vitro* Fusaric Acid Selection Toward To *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Applied Agricultural Science* 2 (6): 79-82.

- Nurcahyani E.**, Sumardi I., Hadisutrisno B., & Suharyanto E., 2017. DNA Pattern Analysis of *Vanilla planifolia* Andrews Plantlet which Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *WJPLS* 3 (4): 27-34.
- Nurcahyani E**, Yulianty, Suharyanto E. 2018. In Vivo Study: Characterization of Mutants *Vanilla planifolia* Andrews Resistant To Fusarium Wilt Disease Based On Analysis of the Lignin and the Phenol Content. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*. 11 (3) I: 15-18.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Irawan B, Sari EY, Sari TL. 2019a. In Vitro Study: Induced Resistance of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Plantlet Against *Fusarium oxysporum* Based on Analysis of Phenol Content. *WJPLS*. 5 (2): 195-198.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Irawan B, Sari EY, Sari TL. 2019b. Analisis Pola DNA Planlet Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum*. *Journal of Tropical Upland Resources*, 1 (01): 93-102.
- Nurcahyani**, Sumardi, Qudus HI, Palupi A, Sholekhah. 2019c. Analysis of Chlorophyll *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Results of the Resistance to *Fusarium oxysporum* and Drought Stress. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*. 12 (11) I: 41-46.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Qudus HI, Wahyuningsih S, Sholekhah, Palupi A. 2020. In Vitro Selection *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Plantlets Result of Induced Resistance With Fusaric Acid. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences*. *WJPLS*. 6 (2): 25-28.
- Nurcahyani E**, Sholekhah, Sumardi, HI Qudus. 2021a. Analysis of Total Carbohydrate and Chlorophyll Content of The Orchid Plantlet [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.] Resistant Fusarium Wilt Disease. *J. Phys.: Conf. Ser.* **1751** 012061. pp.: 1-5.
- Nurcahyani E**, HI Qudus, Evlin F. 2021b. Analysis of the Protein Profile of Cassava Plantlets (*Manihot esculenta* Crantz.) Resistance to Fusarium Wilt Disease. *OnLine Journal of Biological Sciences*. 21 (2): 327-333.
- Nurcahyani E**, HI Qudus, Evlin F. 2021c. Analysis of The Reducing Sugar of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Mutant Plantlets Resistant to Fusarium Wilt.". *AIP Conference Proceedings* 2331, 050010. pp.: 1-4.
- Panaud, O., G. Magpantay, and S. McCouch. 1993. A protocol for non-radioactive DNA labelling and detection in the RFLP analysis of rice and tomato using single copy probes. *Plant Mol. Biol.* 11(1).
- Popa G, Brezeanu A, Cornea CP, & Boe JP. 2009. Peroxidase Activity in *Eustoma grandiflorum* Plants Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Rom. J. Biol.– Plant Biol* 54:41-46.
- Purwati, R.D., Setyobudi, U., dan Sudarsono. 2007. Penggunaan Asam Fusarat dalam Seleksi *In Vitro* untuk Resistensi Abaka terhadap *Fusarium Oxysporum* F.Sp. *Cubense*. *Jurnal Littri*. ISSN 0852 – 8212, 13(2): 64-72.

- Rajeev P & Dinesh R. 2005. *Vanilla* (Extension Pamphlet). VA. Parthasarathy, Indian Institute of Spices Research. Printers Castle. Kochi.
- Saravanan T, Bhaskaran R, & Muthusamy M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* Wilt Disease. *Plant Pathology Journal* 3: 72-80.
- Semangun H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Singh, V.K., and Upadhyay, R.S. 2014. Fusaric Acid Induced Cell Death and Changes in Oxidative Metabolism of *Solanum lycopersicum* L. *Botanical Studies*. p: 55-66.
- Southern E. 2006. Southern blotting. *Nature Protocols*. 1(2): 518–525.
- Sumardiyono, C., Suharyanto, Suryanti, Putri, R., dan Yufita, D.C. 2015. Deteksi Pengimbasan Ketahanan Pisang terhadap Penyakit Layu Fusarium dengan Asam Fusarat. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 19(1): 40–44.
- Sukmadjaja, D., Purnamaningsih, R., dan Priyatno, T.P. 2013. Seleksi *In Vitro* dan Pengujian Mutan Tanaman Pisang Ambon Kuning untuk Ketahanan terhadap Penyakit Layu Fusarium. *Jurnal AgroBiogen*. 9(2): 66-76.
- Umamaheswari R & Mohanan KV. 2011. A Study of the Association of Agronomic Characters in *Vanilla planifolia* Andrews. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5 (1): 53-58.
- Walters, D.R., Ratsep, J., and Havis, N.D. 2013. Controlling Crop Diseases using Induced Resistance: Challenges for The Future. *Journal of Experimental Botany*. 64(5): 1263-1280.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., and Sharma, H.C. 2012. Mechanisms of Plant Defense Against Insect Herbivores. *Plant signaling and behavior*. 7(10): 1306-20.
- Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. 2004. *Molecular Biology of The Gene* 5th ed. San Fransisco: Benjamin Cummings.
- Wu, H.S., Bao,W., Liu, D.Y., Ling, N., Ying, R.R., Raza, W., and Shen, Q.R. 2008. Effect of Fusaric Acid on Biomass and Photosynthesis of Watermelon Seedlings Leaves. *Caryologia*. 61(3): 258-268.



KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS LAMPUNG

LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT

GedungRektoratLantai 5, Jalan Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145

Telepon (0721) 705173, Fax. (0721) 773798, e-mail : lppm@kpa.unila.ac.id

www.lppm.unila.ac.id

**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN Penelitian Professorship**

NOMOR : 478 /UN26.21/PN/2022

TANGGAL : 17 Mei 2022

ANTARA

**PEJABAT PEMBUAT KOMITMEN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS LAMPUNG**

DAN

Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si.

**PENANGGUNGJAWAB KEGIATAN PENELITIAN DENGAN JUDUL
PERAKITAN VARIETAS UNGGUL VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews.)
TAHAN PENYAKIT LAYU FUSARIUM BERBASIS TEKNIK MOLEKULAR
DAN INDUCED RESISTANCE DENGAN ASAM FUSARAT**

**FAKULTAS MIPA
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

RINGKASAN KONTRAK

Kegiatan yang dananya berasal dari DIPA BLU Universitas Lampung

1. No /Tgl DIPA : DIPA-023.17.2.677516/2022, 17 November 2021
2. Kode Keg /Sub Keg/MAK : 4471.DBA.004.051.B.525119 Tahun Anggaran 2022 (Penelitian)
3. No. dan Tanggal SPK : 478/UN26.21/PN/2022 Tanggal 17 Mei 2022
4. Nama Penanggungjawab : Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si /Penanggung Jawab Kegiatan Penelitian Professorship Unila
5. Alamat Penanggungjawab : Jl. Prof. Sumantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung
6. Nomor Pokok Wajib Pajak : 25.821.330.5-542.000
7. Nilai SPK/Surat Perjanjian : Rp 50.000.000,-
8. Uraian dan volume Pekerjaan : Penelitian dengan Judul **"PERAKITAN VARIETAS UNGGUL VANILI (*Vanilla planifolia* Andrews.) TAHAN PENYAKIT LAYU FUSARIUM BERBASIS TEKNIK MOLEKULAR DAN INDUCED RESISTANCE DENGAN ASAM FUSARAT"**
9. Cara Pembayaran :
 1. Kegiatan penelitian pembayaran angsuran I (satu) sebesar 70% (dari nilai pekerjaan) atau 70% x Rp 50.000.000,- yakni sebesar Rp 35.000.000,- (*Tiga Puluh Lima Juta Rupiah*), setelah surat perjanjian pelaksanaan pekerjaan ini ditandatangani oleh kedua belah pihak dan menyerahkan proposal-proposal kegiatan tersebut dari Pihak Kedua kepada Pihak Pertama
 2. Kegiatan penelitian pembayaran angsuran II (dua) sebesar 30% (dari nilai pekerjaan) atau 30% x Rp 50.000.000,- yakni sebesar Rp 15.000.000,- (*Lima Belas Juta Rupiah*), setelah pekerjaan selesai 100% dinyatakan dengan Berita Acara Serah Terima pekerjaan dan menyerahkan laporan hasil kegiatan dari Pihak Kedua kepada Pihak Pertama.
 3. Pembayaran tersebut di atas dilakukan melalui kas Badan Layanan Umum (BLU) ke Rekening Pihak Kedua pada Bank : **BNI Tanjung Karang** dengan nomor rekening "0070747211 a.n **Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si.** sebagai penanggung jawab kegiatan **Penelitian Professorship Universitas Lampung.**
10. Jangka waktu pelaksanaan : 149 (Seratus Empat Puluh Sembilan) kalender terhitung tanggal 17 Mei – 13 Oktober 2022
11. Tanggal Penyelesaian Pekerjaan : 13 Oktober 2022
12. Jangka waktu Pemeliharaan : 149 hari
- Ketentuan Sanksi :
 1. Apabila terjadi ketelambatan pekerjaan tanpa adanya alasan yang diterima oleh pemberi pekerjaan dikenakan sanksi/denda sebesar 1/1000 (satu permil) untuk setiap hari keterlambatan dengan denda maksimal sebesar 5%, (lima persen) dari jumlah harga borongan.
 2. Segala resiko yang timbul akibat keterlambatan pekerjaan tersebut ini sepenuhnya menjadi beban dan tanggung jawab pihak II. Maka kami sebagai pihak I dapat membatalkan SPK secara sepihak dan pihak II tidak berhak menuntut kerugian apapun dari instansi kami.

Bandar Lampung, 17 Mei 2022

Pejabat Pembuat Komitmen LPPM Universitas Lampung,


Lusmelilia Afriani, DEA
NIP156505101993032008

**LAPORAN
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**



JUDUL PENELITIAN

**ANALISIS POLA DNA DAN KARAKTERISASI CASSAVA
(*Manihot esculenta* Crantz.) HASIL *INDUCED RESISTANCE*
TERHADAP *Fusarium oxysporum***

TIM PENELITI

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (Ketua) NIDN 0031106503
Dr. Bambang Irawan, M.Sc. (Anggota) NIDN 0003036504
Dr. Sumardi, M.Si. (Anggota) NIDN 0025036505

**Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian PASCASARJANA
Nomor Kontrak: 1571/UN26.21/PN/2018 Tanggal 9 Juli 2018**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG

Judul Penelitian : Analisis Pola DNA dan Karakterisasi Cassava
(*Manihot esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap
Fusarium oxysporum

Jenis penelitian : Penelitian Dasar

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
b. NIDN : 0031106503
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi : Magister Biologi
e. Nomor HP : 085228255200
f. Alamat surel (e-mail) : endang_nurcahyani@yahoo.com

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr. Bambang Irawan, M.Sc.
b. NIDN : 0003036504
c. Program Studi : Magister Biologi

Anggota Peneliti (2)

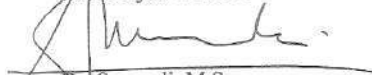
a. Nama Lengkap : Dr. Sumardi, M.Si.
b. NIDN : 0025036505
c. Program Studi : Magister Biologi

Jumlah mahasiswa yang terlibat : 2 orang
Jumlah staf yang terlibat : 1 (satu) orang
Lokasi kegiatan : Laboratorium Botani, Ruang *In Vitro*, FMIPA Unila
Lama kegiatan : 6 bulan
Biaya Penelitian : Rp.40.000.000,-
Sumber dana : BLU-Unila-2018


Bandar Lampung, 3 Oktober 2018

Mengetahui,

Ketua Program Studi Biologi
Pascasarjana FMIPA


Dr. Sumardi, M.S.
NIP. 196503251991031003

Ketua Peneliti,



Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
NIP. 196510311992032003

Menyetujui,

Direktur Pascasarjana Unila,


Prof. Mustofa Usman, Ph.D.
NIP. 195701011984041001

Ketua LPPM Unila


W. Warsono, Ph.D.
NIP. 196302161987031003

**IDENTITAS DAN URAIAN UMUM
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**

1. **Judul Penelitian** : Analisis Pola DNA dan Karakterisasi Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum*

2. **Tim Peneliti**

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Program Studi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.	Ketua	Molekular Bioteknologi Tumbuhan	Magister Biologi	20
2.	Dr. Bambang Irawan, M.Sc.	Anggota 1	Mikologi	Magister Biologi	10
3.	Dr. Sumardi, M.S.	Anggota 2	Mikrobiologi	Magister Biologi	10

3. **Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):**

Planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), Asam fusarat, *Fusarium oxysporum* (**Jenis material yang akan diteliti**), Analisis molekular: Pola DNA Cassava Hasil *Induced Resistance* atau Pengimbasan Ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum*, Aktivitas Peroksidase, Kandungan Fenol, Klorofil, Ketebalan lignin, Struktur Anatomi (**Segi penelitian**).

4. **Masa Pelaksanaan**

Mulai : Bulan April Tahun 2018

Berakhir : Bulan Oktober Tahun 2018

5. **Usulan Biaya** : Rp. 40.000.000,- (Empat puluh juta rupiah)

6. **Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan)**

Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM; UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung.

7. **Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)**

Universitas Gadjah Mada, terutama Pusat Studi Bioteknologi, Laboratorium Rekayasa Genetika. Kontribusi dari instansi tersebut berperan dalam membantu menganalisis bidang molekular yaitu Analisis DNA planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Kerjasama ini akan diwujudkan dengan melibatkan seorang staf teknisi pada instansi tersebut.

8. Temuan yang ditargetkan lulusan S-2

- a. Mahasiswa dapat melaksanakan penelitian dan lulus dengan tepat waktu sesuai yang ditargetkan (1,5 tahun).
- b. Mahasiswa dapat melaksanakan presentasi di seminar internasional dan menulis temuannya pada jurnal internasional yang terindeks.

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek)

Teori mekanisme Pengimbasan ketahanan (*Induce Resistance*) planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) terhadap *Fusarium oxysporum* berdasarkan pola DNA dan karakterisasi spesifiknya, secara ilmiah **memberikan kontribusi bidang analisis molekular**; dengan diketahuinya pola DNA nya, membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan Cassava tahan terhadap *Fusarium oxysporum*.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran untuk setiap penerima Hibah Penelitian Pascasarjana (Nasional/ Internasional)

Science domain International. **Annual Research & Review in Biology**; DOI: <http://dx.doi.org/10.9734/arrb> url: <http://www.sciencedomain.org/journal/32>

atau:

IOSR Journal of Agricultural and Veterinary Science (IOSR-JAVS); url: www.iosrjournals.org/iosr-javs.html;

Tahun rencana publikasi: 2019

Judul rencana publikasi: **“DNA Pattern of *Manihot esculenta* Crantz. Planlet Resistance to *Fusarium oxysporum*.”**

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	iii
DAFTAR ISI	v
RINGKASAN	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. METODE PENELITIAN	9
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	14
REFERENSI	15
LAMPIRAN-LAMPIRAN	19
1. ABSTRAK ICASMI MAHASISWA	21
2. POSTER ICASMI MAHASISWA	22
3. SERTIFIKAT ICASMI MAHASISWA	23
4. SERTIFIKAT ICASMI ENDANG NURCAHYANI	24
5. ABSTRAK SEMINAR NASIONAL PFI	25
6. SERTIFIKAT SEMINAR NASIONAL PFI	23

RINGKASAN

Universitas Lampung (Unila) telah menetapkan **tiga program unggulan**, yakni **(1) kearifan lokal**, **(2) ketahanan pangan** dan **(3) energi** secara khusus dalam Renstra Penelitian Unila 2016-2020. **Program bidang ketahanan pangan**, penelitian benih didorong untuk menghasilkan benih lokal dan unggul. **Unila pada saat ini, dalam bidang ketahanan pangan, memberikan perhatian yang serius terhadap kegiatan penelitian yang terkait dengan singkong (Cassava)**. Hal tersebut karena komoditas ini merupakan produk unggulan Provinsi Lampung. Sejalan dengan pencapaian renstra Unila tersebut (Program bidang ketahanan pangan), dalam proposal ini diajukan penelitian tentang pengendalian penyakit Layu Fusarium pada Cassava dengan tujuan jangka panjang: untuk memperoleh varietas unggul Cassava lokal Lampung tahan *Fusarium oxysporum*, berdasarkan analisis molekular: Pola DNA dan karakter spesifik.

Penyakit layu Fusarium masih merupakan kendala produksi dalam budidaya Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif. Penggunaan kultivar Cassava yang tahan penyakit layu Fusarium dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting.

Penelitian pendahuluan pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*) Cassava dengan asam fusarat (AF) telah dimulai, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang tahan (resisten). Dalam waktu dekat segera dilakukan inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) pada planlet tahan tersebut secara *in vitro*. Untuk memperoleh gambaran mekanisme terbentuknya ketahanan tanaman terimbas, maka perlu dilakukan kajian lebih mendalam tentang pola DNA dan karakter spesifik dari Cassava yang tahan terhadap *Fo*.

Tujuan jangka panjang dalam penelitian ini adalah memperoleh bibit (varietas) Cassava yang tahan terhadap *Fo*. **Target khusus** yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah (1) Teori baru tentang mekanisme ketahanan Cassava terhadap *Fo* (2) Karakter spesifik Cassava yang tahan *Fo*, dan (3) Pola DNA Cassava tahan *Fo*. Teori baru hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi acuan metode ketahanan terimbas pada tanaman Cassava di Indonesia terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Tahapan kegiatan yang dilakukan meliputi: (1) Pengujian ketahanan Cassava terhadap *Fo* secara *in vitro*, diharapkan akan diperoleh Cassava yang bersifat tahan, (2) Pengujian lignifikasi, diharapkan terbentuk ketahanan struktural pada epidermis akar Cassava, (3) Analisis enzim peroksidase (termasuk *Patogenesis-Related protein/PR-protein*), yang diduga akan mendegradasi epidermis *Fusarium oxysporum*, dan (4) Analisis pola DNA Cassava, dengan metode RAPD, diharapkan dapat diketahui pola dari gen ketahanan Cassava yang tahan.

Secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 80 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 20, 40 dan 60 ppm, mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ke tahan. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase, kandungan fenol total, kandungan klorofil dan ketebalan lignin pada planlet *Cassava* tahan *Fo*. Pita DNA baru (spesifik) mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1300 bp (OPB_14) dan 1150 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *Cassava* terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *Cassava* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF.

Kata kunci : *Manihot esculenta*; Pola DNA; *Induced Resistance*; *Fusarium oxysporum*; *in vitro*

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan pada Allah S.W.T. atas limpahan Rahmat yang diberikan kepada penyusun, sehingga penyusunan **Laporan Penelitian** yang berjudul “**Analisis Pola DNA dan Karakterisasi Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum***” dapat diselesaikan.

Penelitian ini dibiayai oleh **Dana DIPA BLU Universitas Lampung Tahun Anggaran 2018**, sesuai dengan **Surat Perjanjian Penugasan Penelitian PASCASARJANA Nomor: 1344/UN26.21/PN/2018 Tanggal 25 Juni 2018**, untuk itu penyusun mengucapkan terima kasih atas kesempatan tersebut.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Universitas Lampung; Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung; Dekan Fakultas MIPA Universitas Lampung atas bantuan fasilitas yang diberikan, serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan Laporan Akhir ini. Penyusun berharap semoga hasil laporan ini bermanfaat bagi yang memerlukan.

Bandar Lampung, 4 November 2018

Penyusun

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Ketela pohon, ubi kayu, singkong atau **Cassava** (*Manihot esculenta* Crantz. atau *Manihot utilissima* Pohl.) adalah perdu tahunan tropika dan subtropika dari suku Euphorbiaceae. Umbinya dikenal luas sebagai makanan pokok penghasil karbohidrat dan daunnya sebagai sayuran (Wikipedia, 2017).

Indonesia adalah negara terbesar kedua penghasil Cassava setelah Nigeria dengan rata-rata total penyediaan selama lima tahun sebesar 9,67 juta ton atau sebesar 10,61% dari total penyediaan singkong dunia, diikuti dengan Negara Brazil, India dan United Republic of Tanzania masing-masing berkisar antara 8,67 – 4,96 juta ton atau sebesar 9,52% – 5,44%, selebihnya menyumbang di bawah 5,30% (Pusadatin, 2013).

Sentra lahan Cassava di Indonesia dikuasai oleh Provinsi Lampung dengan luas lahan panen 324,100 ha pada tahun 2012. Tahun 2013, produksi singkong di Provinsi Lampung mencapai 8,33 juta ton. Keadaan ini menjadikan Lampung sebagai penyuplai sepertiga produksi Cassava nasional dari produksi nasional sebesar 23,92 juta ton (Badan Pusat Statistik, 2015). Namun demikian, masih banyak kendala produksi dalam budidaya Cassava, antara lain penyakit layu *Fusarium*. Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif. Penggunaan kultivar Cassava yang tahan penyakit tersebut dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting.

Arinze (2005) dan Okigbo *et al.* (2009) melaporkan bahwa 50% umbi Cassava yang diproduksi dan dipanen di Nigeria hilang karena penyakit. Penyebab utama yang menyebabkan pembusukan Cassava meliputi: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botryodiplodia theobromae*, *Collectotrichum* spp, *Geotrichum candidum*, *Penicillium chrysogenum*, *Pennicillium digatum*, *Fusarium oxysporum* (Ogunleye *et al.*, 2014; Okigbo *et al.*, 2015; Gwa *et al.*, 2015). Organisme ini mengurangi kuantitas dan juga kualitas umbi tanaman tersebut (Amusa *et al.*, 2003).

Bahan kimia telah terbukti membantu pengendalian penyakit Cassava terutama saat umbi sudah terserang pathogen (Markson *et al.*, 2012). Masalah utama bahan kimia adalah bahwa hal itu merupakan tantangan besar bagi ekosistem dan juga penggunaan bahan kimia yang sering menjadi predisposisi organisme target terhadap resistensi. Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang aman, efisien, efektif dan aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan varietas yang tahan (resisten). Penggunaan varietas unggul yang tahan

terhadap *Fo* dengan daya hasil tinggi merupakan salah satu alternatif pengendalian penyakit yang penting dan tidak menimbulkan dampak negatif seperti penggunaan pestisida. Pengembangan kultivar Cassava tahan *Fo* tersebut dapat dilakukan antara lain dengan metode seleksi *in vitro* yaitu mengkulturkan eksplan berupa jaringan atau organ pada medium yang mengandung asam fusarat konsentrasi selektif (Bouizgarne *et al.*, 2006).

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Asam ini dapat bersifat toksin (konsentrasi lebih dari 10^{-5} M) sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Landa *et al.*, 2002; Bouizgarne *et al.*, 2006), tetapi pada konsentrasi yang non toksik (di bawah 10^{-6} M) justru membantu mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen (Bouizgarne *et al.*, 2006). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Arai dan Takeuchi, 1993). Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), nanas (Borras *et al.*, 2001), *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b) dan vanili (Nurcahyani *et al.*, 2012; Nurcahyani, 2013; Nurcahyani *et al.*, 2014; Nurcahyani *et al.*, 2017). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Pada tanaman yang diperlakukan dengan AF, akan mengaktivasi gen-gen di antaranya gen peroksidase (Saravanan *et al.*, 2004). Perbandingan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis dapat dilakukan untuk mengidentifikasi produk gen yang dihasilkan selama planlet Cassava diseleksi dengan menggunakan AF. Metode elektroforesis protein satu dimensi dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Maniatis *et al.*, 1982).

Selain itu, keragaman genetik pada planlet Cassava akibat perlakuan dengan Af, dapat dideteksi dengan penanda molekular, salah satunya adalah *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*. Metode RAPD adalah penanda berbasis *Polymerase Chain Reaction (PCR)* dengan menggunakan 10 basa primer acak (Welsh & Mc Clelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Penggunaan AF dalam konsentrasi yang toleran sejauh ini belum pernah dilaporkan secara pasti dan tepat dalam pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*) planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) terhadap *Fo*. Oleh karena itu, penelitian tentang peranan AF sebagai pengimbas ketahanan secara *in vitro* menarik untuk dilakukan. Pengendalian penyakit layu *Fusarium* pada Cassava dengan AF sepanjang pengetahuan penulis belum pernah dilakukan dan belum diketahui: (1) Mekanisme ketahanan Cassava terimbas terhadap *F. oxysporum* (2) Karakter spesifik Cassava yang tahan terhadap *F. oxysporum*, dan (3) Pola DNA Cassava tahan *F. oxysporum*.

B. Tujuan Khusus

Beberapa masalah didalam penanggulangan penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *F.oxysporum* pada Cassava selama ini belum terpecahkan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan:

1. Mendapatkan teori baru tentang mekanisme ketahanan terimbas (*induced resistance*) Cassava terhadap jamur *F. oxysporum*.
2. Mengkarakterisasi Cassava hasil *Induced resistance* terhadap jamur *F.oxysporum*.
3. Mengkaji pola DNA Cassava yang bersifat tahan terhadap jamur *F. oxysporum*.

C. Urgensi Penelitian

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam budidaya Cassava di Lampung khususnya dan di Indonesia pada umumnya adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *F.oxysporum (Fo)* dan bersifat tular medium. Pengendalian penyakit pada Cassava selama ini dilakukan menggunakan pestisida yang sering menimbulkan polusi terhadap lingkungan (Markson *et al.*, 2012). Salah satu cara pengendalian penyakit yang aman terhadap lingkungan, yaitu menggunakan varietas yang tahan (resisten) dengan mekanisme terimbas atau *induced resistance* (Agrios, 2005).

Pengimbasan ketahanan oleh AF pada Cassava diduga akan menyebabkan: (1) terbentuknya lignin (lignifikasi), sehingga tanaman Cassava akan terlindung secara struktural dari penetrasi hifa *F. oxysporum*, (2) Pembentukan protein peroksidase (*Pathogenesis Related-protein/ PR-protein*) yang diduga akan mendegradasi epidermis *Fusarium*

oxysporum, (3) terjadinya perubahan pola DNA pada planlet Cassava yang bersifat tahan sehingga akan dapat diketahui gen ketahanannya. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian lebih mendalam tentang berbagai hal tersebut sebagai teori baru mekanisme ketahanan Cassava terhadap jamur *F. oxysporum*. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat dalam menanggulangi penyakit tersebut sehingga nantinya akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual Cassava serta pendapatan petani Cassava di Indonesia.

Universitas Lampung (Unila) telah menetapkan **tiga program unggulan**, yakni **(1) kearifan lokal**, **(2) ketahanan pangan** dan **(3) energi** secara khusus dalam Renstra Penelitian Unila 2016-2020. **Program bidang ketahanan pangan**, penelitian benih didorong untuk menghasilkan benih lokal dan unggul. **Unila pada saat ini, dalam bidang ketahanan pangan, memberikan perhatian yang serius terhadap kegiatan penelitian yang terkait dengan singkong (Cassava)**. Hal tersebut karena komoditas ini merupakan produk unggulan Provinsi Lampung. Sejalan dengan pencapaian renstra Unila tersebut (Program bidang ketahanan pangan), dalam proposal ini diajukan penelitian tentang pengendalian penyakit Layu Fusarium pada Cassava dengan tujuan jangka panjang: untuk memperoleh varietas unggul Cassava lokal Lampung tahan *Fusarium oxysporum*, berdasarkan analisis molekular: Pola DNA dan karakter ekspresi spesifiknya.

Temuan dan luaran inovasi yang ditargetkan serta kontribusinya pada pengembangan keilmuan:

1. Ditemukannya mekanisme ketahanan Cassava terhadap penyakit layu Fusarium dengan teknik *Induced Resistance* (Ketahanan Terimbasi) secara *in vitro*; dengan diketahuinya pengetahuan dasar tersebut, nantinya bagi petani Cassava di Lampung khususnya dan di Indonesia umumnya, dapat mempraktekkan sendiri metode tersebut secara lebih sederhana.
2. Dalam jangka panjang akan diperoleh bibit (varietas) Cassava tahan penyakit layu Fusarium; dengan tersedianya bibit Cassava tahan penyakit tersebut, nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual Cassava serta pendapatan petani Cassava di Lampung khususnya dan Indonesia pada umumnya.

Rencana Target Capaian pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rencana Target Capaian dalam penelitian

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS ¹⁾
1	Artikel ilmiah dimuat di Jurnal	Internasional terindeks	ada	tidak ada	<i>published</i>
		Nasional Terakreditasi	tidak ada	tidak ada	tidak ada
2	Presentasi/makalah dalam Seminar	Internasional	tidak ada	ada	dilaksanakan
		Nasional	tidak ada	ada	dilaksanakan
3	Laporan penelitian		ada	tidak ada	ada
4	Draft Tesis disetujui pembimbing		ada	tidak ada	ada
5	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)		ada	ada	2

TKT 2=Formulasi konsep teknologi dan aplikasinya

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ketahanan terimbas (*induced resistance*).

Pengendalian penyakit secara hayati dapat melalui interaksi antara populasi patogen dan agens hayati baik secara langsung maupun tidak langsung. Ketahanan terimbas bersifat tidak spesifik terhadap jenis patogen, sehingga dapat lebih efisien dalam pelaksanaannya (Agrios 2005). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Vidhyasekaran, 1999). PR-protein adalah protein yang dikeluarkan oleh tanaman sebagai tanggapan terhadap beberapa senyawa pengimbas (*inducer*). Infeksi tanaman oleh berbagai patogen seperti jamur, bakteri, dan virus dapat menyebabkan terbentuknya PR-protein (Park *et al.*, 2004; Edreva, 2005). Sintesis dan akumulasi PR-protein ini sangat berperan penting dalam pertahanan tanaman terhadap patogen. Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani, 2012; Nurcahyani, 2013; Nurcahyani, 2014; Nurcahyani, 2017); dan anggrek tanah *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani, 2016a; Nurcahyani, 2016b)

Protein tumbuhan anti jamur (PR-protein) telah diklasifikasi menurut Yun *et al.* (1997) menjadi 4 kelompok, kemudian diperbarui oleh van Loon & van Strien (1999) menjadi 14 kelompok dan ditambahkan oleh Park *et al.* (2004) dan Edreva (2005) menjadi 16 kelompok. Kelompok PR-9 dikenal sebagai **enzim peroksidase**, merupakan isozim dan ditemukan hampir pada semua tumbuhan (van Loon & van Strien, 1999; Edreva, 2005). Enzim proksidase mampu mengkatalisis reaksi senyawa fenolik menjadi senyawa kuinon dengan menghasilkan H₂O₂ yang bersifat toksik bagi patogen (Jang *et al.*, 2004; Patel *et al.*, 2007).

Contoh aplikasi gen peroksidase yang diekspresikan dengan reporter *gus* (*β-glucuronidase*) pada tomat (*Lycopersicon esculentum*) telah dilaporkan oleh Medina (1999), demikian pula pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) (Jang *et al.*, 2004). Enzim peroksidase yang diinduksi oleh patogen berbagai tumbuhan juga telah dilaporkan, misalnya pada

mentimun (*Cucumis sativus*) (Alkahtani *et al.*, 2011), *Eustoma grandiflorum* (Popa *et al.*, 2009), kacang tanah (Ye & Ng, 2002), kacang kapri (Luhova *et al.*, 2003), *Phytolacca dioica* L (Guida *et al.*, 2010), vanili (Nurcahyani *et al.*, 2014), dan *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016).

Ketahanan yang di induksi oleh *Fusarium oxysporum* diindikasikan oleh meningkatnya PR-protein yang termasuk didalamnya: peroksidase, polifenol okidase, kitinase dan β -1,3 glukonase (Saravanan, 2004; Mei *et al.*, 2004; Leelasuphakul *et al.*, 2006; Khan *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2009; Alkhatani *et al.*, 2011). Selain bersifat toksik bagi patogen, enzim peroksidase juga berperan sebagai katalisator dalam proses pembentukan lignin (Bouizgarne *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2007). Lea & Leegood (1999) mengemukakan bahwa pembentukan enzim peroksidase akan mendorong terbentuknya lignifikasi melalui jalur fenilpropanoid dan merupakan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen. Pada tanaman yang tahan terhadap patogen, fase awal infeksi patogen, akan terbentuk lignin yang tebal pada bagian dinding sel tanaman yang berhubungan dengan patogen, dan menghambat perkembangan hifa patogen (Stein *et al.* 1993).

B. Tanaman Singkong atau Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

Sebagian besar produksi ubi kayu dunia (lebih dari 90%) berasal dari Afrika Barat. Pada tahun 2008, Nigeria merupakan penghasil ubi terbesar di dunia, menghasilkan 35,02 juta metrik tones (FAO, 2008).

Indonesia dikenal sebagai negara yang sangat cocok sebagai media tanam untuk tanaman pangan salah satunya yaitu ubi kayu (*Manihot utilissima*). Ubi kayu merupakan komoditas tanaman pangan di Indonesia yang menempati urutan ketiga setelah padi dan jagung (Ginting 2002). Indonesia adalah negara terbesar kedua penghasil singkong setelah Nigeria dengan rata-rata total penyediaan selama lima tahun sebesar 9,67 juta ton atau sebesar 10,61% dari total penyediaan singkong dunia, diikuti dengan Negara Brazil, India dan United Republik of Tanzania masing-masing berkisar antara 8,67 – 4,96 juta ton atau sebesar 9,52% – 5,44%, selebihnya menyumbang di bawah 5,30% (Pusadatin, 2013).

Indonesia masih memiliki banyak ketersediaan lahan pertanian yang kosong, sehingga produksi singkong setiap tahunnya mengalami peningkatan. Sentra lahan singkong di Indonesia dikuasai oleh provinsi Lampung dengan luas lahan panen 324,100 ha pada tahun 2012. Tahun 2013, produksi singkong di Provinsi Lampung mencapai 8,33 juta ton. Keadaan ini menjadikan Lampung sebagai penyuplai sepertiga produksi singkong nasional dari produksi nasional sebesar 23,92 juta ton (Badan Pusat Statistik, 2015).

Dalam perkembangannya, singkong tidak hanya digunakan sebagai bahan pangan yang dikonsumsi langsung namun juga digunakan sebagai bahan utama beberapa industri olahan berbahan baku singkong. Penggolongan jenis singkong dapat dibedakan menjadi dua macam yaitu jenis singkong manis yang dapat dikonsumsi langsung dan singkong pahit yang perlu dilakukan pengolahan terlebih dahulu. Menurut Winarno (2004), singkong dapat dibedakan menurut warna, rasa, umur dan kandungan sianidanya (HCN), jika singkong memiliki rasa pahit maka kandungan sianidanya cukup tinggi. Disisi lain, singkong memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi, meskipun rendah akan protein (Prihatman dan Kemal, 2000). Dikalangan masyarakat, singkong diolah menjadi bahan pangan pokok setelah beras dan jagung.

C. Penyakit Layu *Fusarium*

Fusarium oxysporum (*Fo*) patogen pada tanaman dapat bertahan secara alami di dalam medium tumbuh dan pada akar-akar tanaman sakit. Apabila terdapat tanaman peka, melalui akar yang luka dapat segera menimbulkan infeksi. (Semangun, 2001; Hadisutrisno, 2004). Perakaran menjadi busuk dan dapat meluas ke atas sampai ke pangkal batang. Jika akar rimpang dipotong akan tampak bahwa epidermis dan hipodermis berwarna ungu, sedang *phloem* dan *xylem* berwarna ungu merah jambu muda. Akhirnya seluruh akar rimpang menjadi berwarna ungu (Semangun, 2001)

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu Fusarium**, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati. Selain itu, *F. oxysporum* tidak diskriminatif, mereka dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting. *F. oxysporum* terbukti sangat sulit diberantas karena spora *F. oxysporum* juga dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama, sehingga rotasi tanaman bukan merupakan metode kontrol yang tepat (Djaenuddin, 2003).

D. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002).

Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbangi sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan

telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, anggrek tanah, anyelir, dan vanili. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen.

E. Deteksi mutan dengan PCR

Seiring dengan semakin berkembangnya teknologi yang berbasis marka DNA, maka saat ini telah ditemukan tiga tipe marka DNA dengan segala kelebihan dan kekurangan masing-masing (Semagn *et al.*, 2006). Ke tiga tipe marka DNA adalah: (1) marka yang berdasarkan pada hibridisasi DNA (RFLP); (2) marka yang berdasarkan pada reaksi rantai polimerase RAPD dan AFLP; dan (3) marka yang berdasarkan pada PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik dalam DNA sasaran. (Azrai, 2005; Semagn *et al.*, 2006).

Marka molekular yang dapat dimanfaatkan dalam mengkaji ketahanan planlet *S. plicata* terhadap *Fusarium oxysporum* antara lain: RAPD. Prinsip kerja marka RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok marka dominan (Williams *et al.* 1990; Welsh & McClelland, 1990). Keunggulan dari teknik analisis menggunakan marka RAPD antara lain adalah (1) kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, (2) hemat biaya, (3) mudah dipelajari, dan (4) primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh (Bardakci, 2001; Semagn *et al.*, 2006).

F. Studi pendahuluan yang telah dilaksanakan dan hasil yang sudah dicapai

Studi pendahuluan yang sudah dilakukan meliputi:

1. *In vitro* propagasi Cassava yang bertujuan untuk mendapatkan planlet dalam jumlah banyak untuk stok pengujian tahap penelitian berikutnya secara efisien. Efisiensi waktu ini penting untuk mendapatkan secara cepat dengan mencoba beberapa organ meristem dan variasi medium.
2. Telah dilakukan seleksi planlet Cassava dengan asam fusarat berbagai konsentrasi (0, 20, 40, 60, dan 80 ppm) yang bertujuan untuk memperoleh kandidat mutan. Beberapa galur mutan akan diuji dengan inokulan jamur *F. oxysporum*

Hasil studi pendahuluan yang sudah dicapai meliputi:

1. *In vitro* propagasi planlet Cassava

Dari penelitian pendahuluan yang telah dilakukan diperoleh bahwa medium dengan komposisi MS+BAP 1 mg/l dihasilkan planlet dengan pertumbuhan paling cepat dibandingkan dengan yang lain.

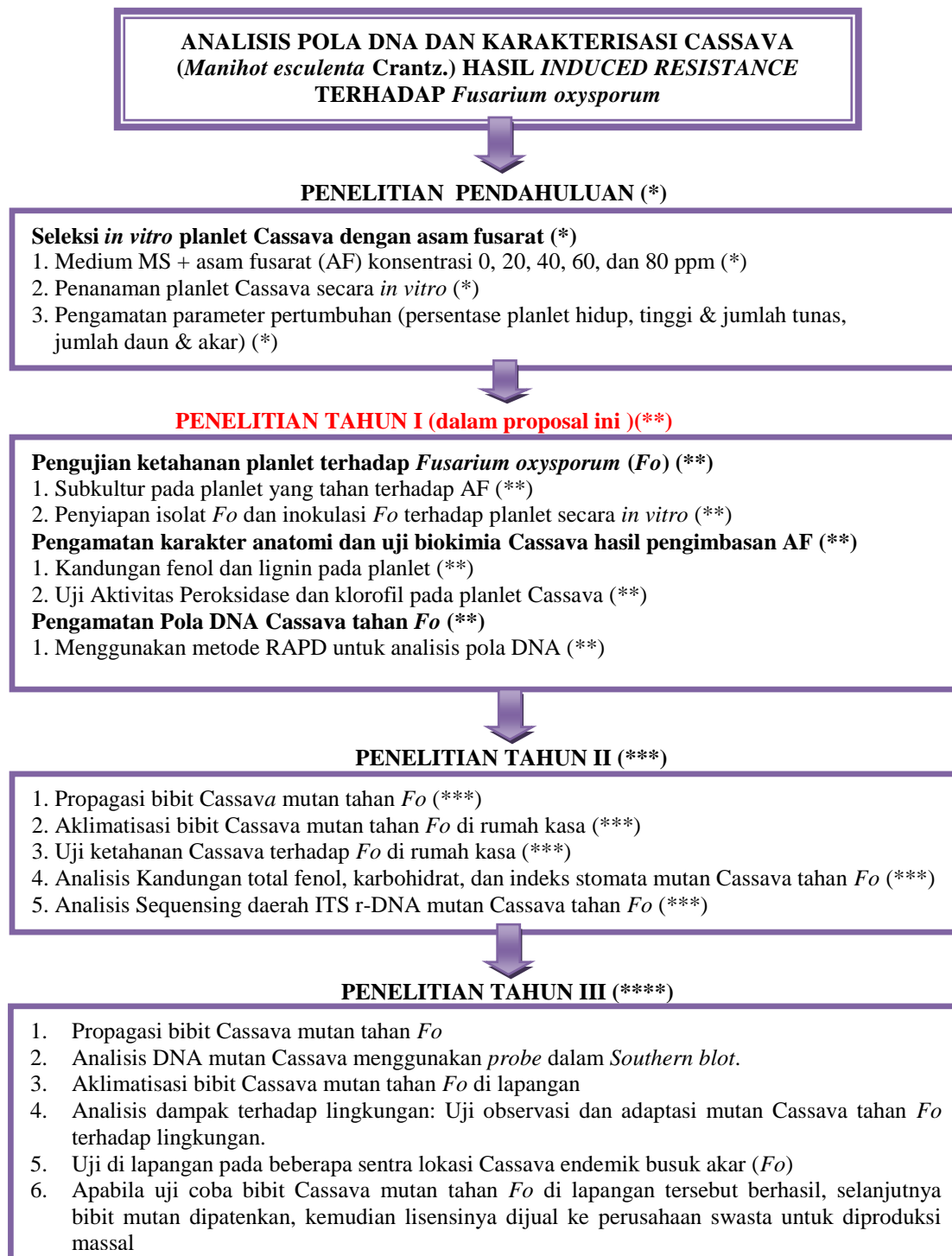
2. Seleksi Planlet Cassava dengan Asam Fusarat

Seleksi planlet Cassava dengan AF konsentrasi 0, 20, 40, 60, dan 80 ppm diperoleh hasil bahwa konsentrasi AF toleran untuk pertumbuhan optimum adalah 20 ppm–80 ppm. Hasil seleksi *in vitro* dengan AF yang disubkultur pada medium multiplikasi menghasilkan jumlah planlet Cassava hidup sebesar 22,24% (20 ppm), 17,10% (40 ppm), dan 15,69% (60 ppm), 10,59% (80 ppm) yang insensitif terhadap AF. Selanjutnya planlet-planlet tersebut disubkultur untuk mendapatkan kandidat yang stabil. Kandidat tersebut akan diseleksi pada tahap berikutnya dengan inokulat *F. oxysporum*, kemudian di analisis aktivitas enzim peroksidase, ketebalan lignin, kandungan fenol, kandungan klorofil, dan pola DNA nya.

BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan mulai bulan April 2018 sampai dengan bulan Oktober 2018 di Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM. Bahan penelitian berupa planlet Cassava yang diimbas asam fusarat. Roadmap riset disajikan pada **Gambar 1**.

A. Roadmap riset

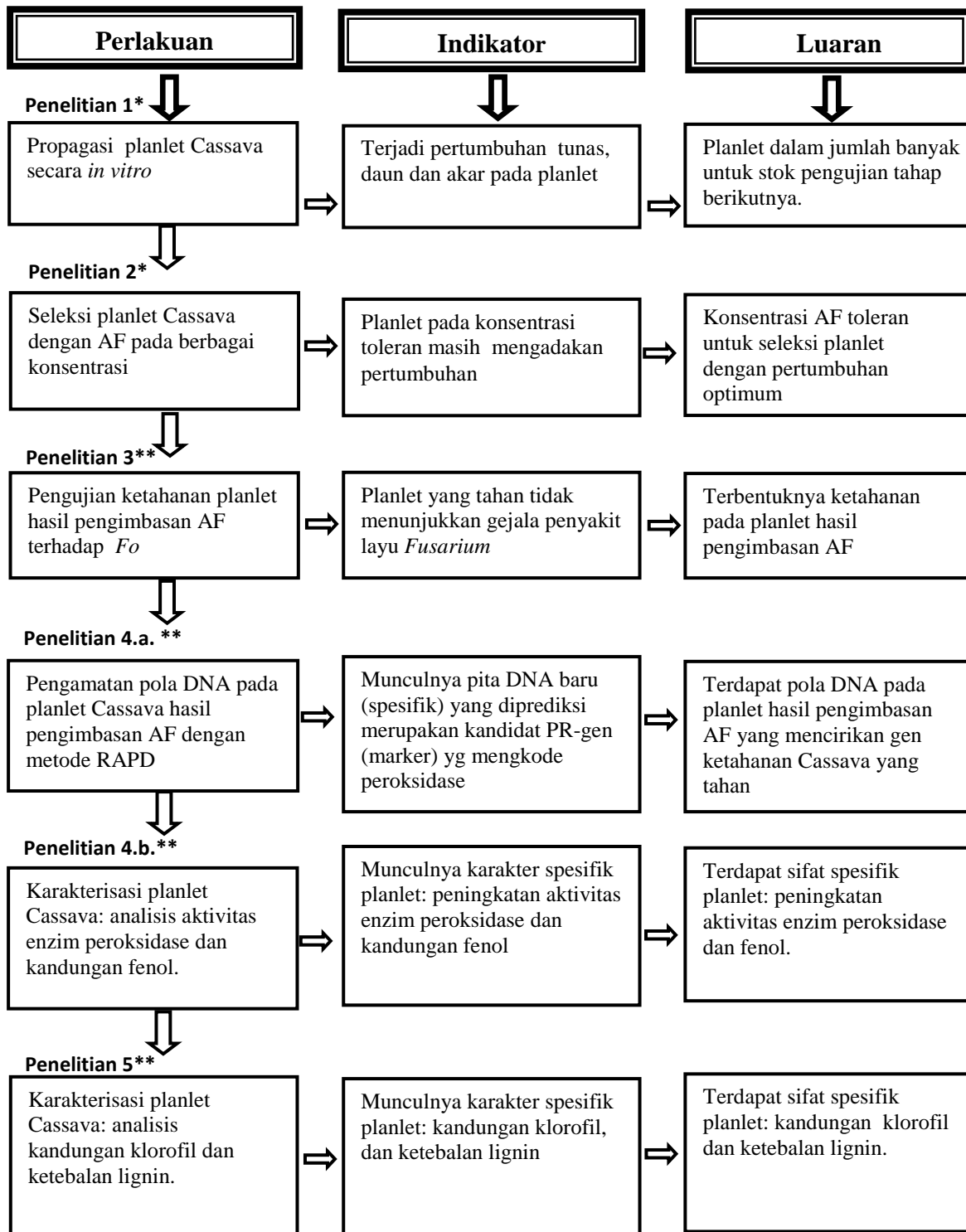


Gambar 1. Roadmap Riset

Keterangan:

- (*) : Penelitian Pendahuluan yang sudah dilakukan
- (**) : Penelitian Tahun I (**dilakukan dalam PPS 2018**)
- (***) : Penelitian Tahun II
- (****) : Penelitian Tahun III

Tahapan penelitian pada **penelitian ini** (Tahun I) disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam Gambar 2.



Gambar 2. Bagan alir tahapan penelitian

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari **tahap kegiatan yang dilaksanakan dalam penelitian ini** (Tahun I).

1. Pengujian ketahanan planlet Cassava terhadap *F. oxysporum*

Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fo* dilakukan secara langsung pada planlet dalam botol kultur. Mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL diteteskan pada planlet 1-2 tetes. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

2. Pola DNA planlet Cassava

Isolasi DNA dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511 (Daryono & atsuaki, 2002). Untuk analisis PCR, disiapkan DNA *template* yang telah dilarutkan dalam TE, *ice box*, dan primer yang digunakan (Tabel 1). Kemudian dibuat premix PCR dengan komposisi: kit KAPPA2G *Fast ReadyMix* sebanyak 12,5 µL, primer 2,5 µL pada konsentrasi 100 µM, DNA *template* 1,0 µL pada konsentrasi 40 ng/µL, dan dH₂O sebanyak 9,0 µL, sehingga volume totalnya adalah 25,00 µL.

Tabel 2 . Primer RAPD

No	Primer	Urutan Nukleotida (5'—3')	Referensi
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	Minoo <i>et al.</i> , 2008
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	Minoo <i>et al.</i> , 2008

Selanjutnya premix di amplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Kemudian dilakukan elektroforesis. Selanjutnya di *running* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Visualisasi hasil *running* elektroforesis pada gel dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator dan difoto sebagai dokumentasi.

3. Aktivitas enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Dibuat campuran 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 ml ekstrak enzim dari daun planlet *S. plicata*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂ . Campuran diendapkan dalam suhu kamar dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer (*Beckman DU-65*) diatur dengan panjang gelombang 420 nm dan dibaca dari nol. Pada tahap awal ditambahkan 100 µL 1% H₂O₂ pada kuvet yang sudah terisi campuran sampel dan dibaca selama 5 menit. Aktivitas enzim

dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah aktivitas berubahnya OD 420 nm pada spektrofotometer per menit.

4. Analisis Fenol Total

Analisis senyawa fenol total menggunakan metode Singleton & Rossi (Aberouman & Deokule, 2008). Penyiapan kurva kalibrasi standar senyawa fenol asam galat digunakan sebagai larutan standar. Penyiapan planlet sampel disiapkan menurut metode Ozygi *et al.* (2007). Pengukuran fenol total dilakukan dengan mengambil supernatan sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah 250 μ L reagen *Folin-Ciocalteu*, setelah didiamkan selama 5 menit lalu ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 . Sesudah tercampur rata, dimasukkan ke dalam kuvet dengan volume 5 mL dan diamati nilai serapan pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometer (*Beckman DU-65*), sebagai kontrol digunakan akuades. Berdasarkan nilai serapan kemudian ditentukan kandungan senyawa fenol berdasarkan persamaan regresi asam galat yaitu hubungan antara nilai serapan ekstrak planlet dan seri kepekatan asam galat.

Analisis data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet Cassava selama seleksi dengan AF berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di dukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan ulangan 30 eksplan per perlakuan.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) atau Anova dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda dari Duncan atau DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf kepercayaan 95% (Gomes & Gomes, 1984).

KEMAJUAN STUDI MAHASISWA PASCASARJANA YANG TERLIBAT:

Mahasiswa Pascasarjana Biologi FMIPA Unila yang terlibat ada 2 orang mahasiswa yaitu:

1. Evi Yunita Sari NPM: 1727021002
2. Tika Lidia Sari NPM: 1727024005

Kedua mahasiswa tersebut :

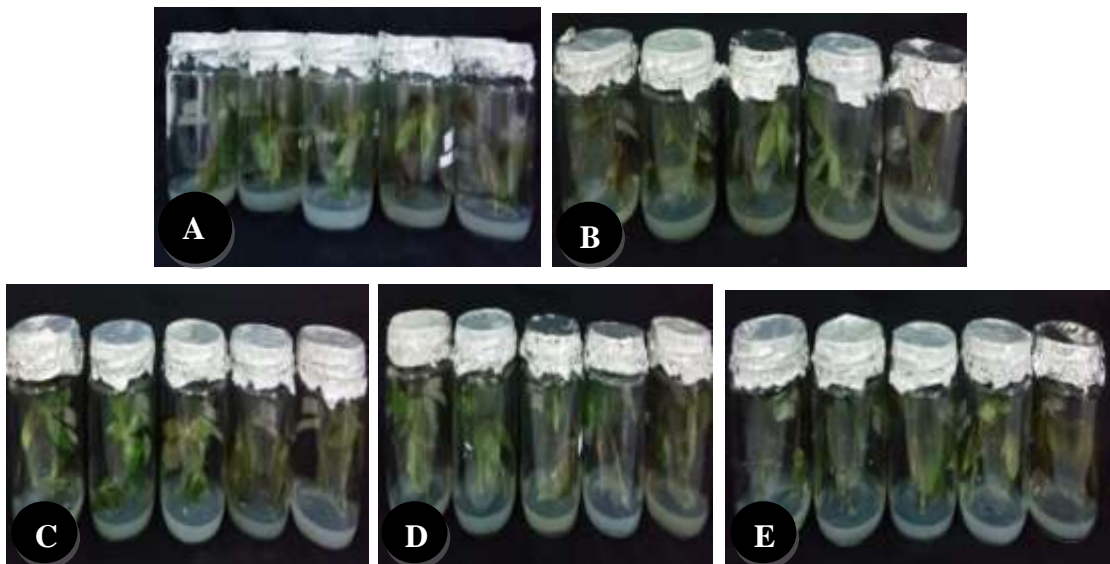
1. Sudah melakukan Pengajuan Tema Penelitian Tesis
2. Mahasiswa aktif Program Studi Magister Biologi
3. Sudah melakukan Penelitian Pendahuluan
4. Sudah melakukan Seminar Usul
5. Seminar Hasil akan dilakukan pada bulan Desember 2018

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian dibagi dalam empat bagian, dimulai dari: 1) hasil seleksi planlet *Cassava* menggunakan asam fusarat (AF), untuk memperoleh kisaran konsentrasi AF toleran pada planlet *Cassava* dengan pertumbuhan optimum; 2) hasil uji ketahanan planlet *Cassava* terhadap *Fusarium oxysporum* (*Fo*), yang meliputi: (a) hasil inokulasi *Fo* pada planlet *Cassava*; 3) hasil karakterisasi planlet *Cassava* akibat pengimbasan AF, meliputi: (a) analisis aktivitas enzim peroksidase; (b) analisis lignin; (c) analisis fenol; (d) analisis klorofil 4) hasil analisis pola DNA RAPD-PCR pada planlet *Cassava* yang diimbas AF dan kontrol; Hasil penelitian dan pembahasannya berturut-turut disajikan sebagai berikut.

A. Seleksi *in vitro* planlet *Spathoglottis plicata* dengan asam fusarat

Seleksi planlet *Cassava* dengan menggunakan asam fusarat (AF) dilakukan dengan menanam planlet pada medium *Murashige dan Skoog* (MS) yang ditambahkan dengan asam fusarat (AF) dengan konsentrasi 20 ppm, 40 ppm, 60 ppm, dan 80 ppm, serta planlet yang tidak ditambahkan dengan AF (0 ppm) sebagai kontrol. Planlet kemudian diinkubasikan dalam waktu 4 minggu. Planlet *Cassava* yang ditanam pada medium MS dengan penambahan AF berbagai konsentrasi disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Planlet *Cassava* yang ditanam pada medium MS dengan penambahan AF berbagai konsentrasi umur empat minggu. A= kontrol (0 ppm), B= konsentrasi AF (20 ppm), C= konsentrasi AF (40 ppm), D= konsentrasi AF (60 ppm), dan E= konsentrasi AF (80 ppm).

Hasil seleksi planlet *Cassava* berdasarkan persentase jumlah planlet hidup dengan berbagai konsentrasi AF disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. menunjukkan bahwa pada minggu I dan II pada konsentrasi 20, 40, 60, 80 ppm, dan kontrol persentase jumlah planlet hidup mencapai 100%. Planlet *Cassava* yang diperlakukan dengan konsentrasi 20 ppm dan kontrol pada minggu IV tidak mengalami kematian, sedangkan pada konsentrasi 4, 60, dan 80 ppm mengalami kematian seperti tertera pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase jumlah planlet hidup hasil seleksi dengan asam fusarat

Konsentrasi Asam fusarat (ppm)	Persentase jumlah planlet hidup pada minggu (%)			
	I	II	III	IV
0	100	100	100	100
20	100	100	100	100
40	100	100	75,6	87,0
60	100	100	83,4	89,5
80	100	100	85,5	96,5

B. Pengujian ketahanan planlet *Cassava* terhadap *F. oxysporum*

Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

Setelah diperoleh planlet-planlet yang tahan terhadap AF pada seleksi dengan AF, selanjutnya diuji ketahanannya terhadap jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*).

Metode inokulasi yang digunakan dalam uji ketahanan planlet *Cassava* dengan menginokulasikan secara langsung suspensi mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan konidium $1,7 \times 10^4$ per ml pada planlet sebanyak 1-2 tetes di dalam botol kultur secara *in vitro*, dengan ulangan setiap perlakuan sebanyak 3 kali, kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 24 jam). Berdasarkan pengamatan dengan menghitung jumlah daun planlet yang dilakukan setiap hari selama 4 minggu, menunjukkan adanya gejala layu pada planlet *Cassava* di dalam botol kultur. Perlakuan inokulasi ini dilakukan secara *in vitro*, sehingga kondisi lingkungan bisa dijaga.

Berdasar pengamatan terhadap planlet *Cassava* hasil pengimbasan yang diuji tampak bahwa pada hari ke-4 setelah inokulasi muncul gejala daun layu pada kontrol. Gejala daun layu juga muncul pada perlakuan 0, 20, 40 dan 60 ppm pada hari ke- 12, 20 dan 28. Gejala tersebut merupakan karakteristik layu *Fusarium* (Hadisutrisno, 2004), sehingga dapat dilakukan perhitungan persentase daun layu atau kuning.

Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala daun layu atau kuning yang muncul maka dapat diketahui persentase intensitas penyakit dan kriteria ketahanan dari masing-masing perlakuan (Tabel 4).

Tabel 4. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan dan tingkat ketahanan planlet *Cassava* pada setiap perlakuan asam fusarat

Perlakuan	Hari pengamatan							
	5		13		21		29	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
Kontrol	70,23	Rentan	96,54	Rentan	93,45	Rentan	100,00	Rentan
20 ppm	60,32	Rentan	89,45	Rentan	91,53	Rentan	100,00	Rentan
40 ppm	29,05	Moderat	34,66	Moderat	39,45	Moderat	49,00	Moderat
60 ppm	31,32	Moderat	39,45	Moderat	49,00	Moderat	49,00	Moderat
80 ppm	00,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan

Keterangan: IP= Intensitas Penyakit

Berdasarkan Tabel 4, dapat diketahui bahwa perlakuan AF 80 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik, dapat menekan intensitas penyakit hingga 25% dan menaikkan kriteria menjadi tahan. Hal ini menunjukkan bahwa AF mampu mengimbas ketahanan planlet *Cassava* terhadap penyakit layu *Fusarium*.

C. Pola DNA planlet *Cassava*

Dalam tahap ini telah berhasil diisolasi total genom DNA daun planlet *Cassava* hasil pengimbasan AF pada konsentrasi 20, 40, 60, 80 ppm dan tidak diimbas dengan AF (kontrol) untuk sejumlah sampel acak, dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511. Analisis DNA pada planlet *Cassava* didahului dengan mengukur kualitas dan kuantitas DNA planlet *Cassava*. Untuk analisis pola DNA, secara acak diambil masing-masing 1 sampel daun *Cassava* yang rentan (20 ppm), moderat (40 ppm dan 60 ppm) dan tahan (80 ppm), serta kontrol sehingga diperoleh 5 sampel.

a. Analisis pita RAPD

Berdasarkan hasil amplifikasi *sequence* DNA dengan menggunakan 2 primer pada 5 sampel planlet *Cassava* kontrol dan diimbas AF (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) menghasilkan total 20 pita DNA. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD dari 5 sampel planlet *Cassava* tersebut disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD pada planlet *Cassava* kontrol dan diimbasi asam fusarat (20, 40, 60, dan 80 ppm)

No	Primer	Urutan Basa Nukleotida (5'-3')	Jumlah Pita RAPD	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Monomorfik	Ukuran Pita RAPD (bp)
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	05	01	04	150 – 1300
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	07	01	06	100 – 1150
Total			12	02	10	100 – 1300

Keterangan:

bp: *base pair*

Pita= *band= fragmen*

Tabel 5 menunjukkan bahwa secara keseluruhan, amplifikasi 2 primer (OPB_14 dan OPB_20) menghasilkan jumlah pita DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 5 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 100 bp sampai 1300 bp.

Hasil penelitian pada planlet kontrol dan yang diimbasi AF, dengan menggunakan 2 primer, menghasilkan jumlah pita DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 5 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 100 bp sampai 1300 bp.

Elektroforesis hasil amplifikasi PCR-RAPD dengan 2 primer tersebut menghasilkan 4 pola pita DNA. Pola pita DNA planlet *cassava* yang tidak diimbasi (kontrol) maupun diimbasi AF (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) pada masing-masing primer disajikan pada Tabel 6 dan 7.

1. Primer OPB_14

Primer OPB_14 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji pada Tabel 6.

Pada Tabel 6 menunjukkan bahwa pita DNA ukuran 150, 250, 400, dan 750 bp terbentuk pada semua sampel, baik pada planlet *Cassava* kontrol maupun yang diimbasi AF. Pada planlet *Cassava* yang diimbasi AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1400 bp.

Tabel 6. Pola pita DNA planlet *Cassava* kontrol dan diimbas asam fusarat (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) dengan primer OPB_14

Pola pita DNA-1		Pola pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
S_0U_3	150	$S_1U_1, S_2U_2, S_3U_3, S_4U_2$	150
	250		250
	400		400
	750		750
			1300*

Keterangan: Pola pita DNA-1: S_0U_3 (kontrol) menghasilkan 4 pita yang identik; Pola pita DNA-2: $S_1U_1, S_2U_2, S_3U_3, S_4U_2$ menghasilkan 5 pita yang identik, dan 4 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

2. Primer OPB_20

Primer OPB_20 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji dalam Tabel 7.

Tabel 7. Pola pita DNA planlet *Cassava* kontrol dan diimbas asam fusarat (konsentrasi 20, 40, 60, dan 80 ppm) dengan primer OPB_20

Pola Pita DNA-1		Pola Pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
S_0U_3	100	$S_1U_1, S_2U_2, S_3U_3, S_4U_2$	100
	150		150
	250		250
	300		300
	500		500
	800		800
			1150*

Keterangan: Pola pita DNA-1: S_0U_3 (kontrol) menghasilkan 6 pita yang identik; Pola pita DNA-2: $S_1U_1, S_2U_2, S_3U_3, S_4U_2$ menghasilkan 7 pita yang identik, dan 6 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

Pada Tabel 7 menunjukkan pita DNA ukuran 100, 150, 250, 300, dan 500, dan 800 bp terbentuk pada semua sampel baik pada kontrol maupun yang diimbas AF. Pada planlet *Cassava* yang diimbas AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1250 bp..

Hasil amplifikasi DNA planlet *Cassava* dengan menggunakan primer OPB_14 dan OPB_20, menunjukkan bahwa pola pita DNA planlet *Cassava* yang kontrol berbeda dengan pola pita DNA planlet *Cassava* yang diimbas AF. Planlet *Cassava* yang diimbas AF baik konsentrasi 20, 40, 60 maupun 80 ppm menghasilkan 1 pita DNA yang berbeda ukurannya dengan planlet *Cassava* kontrol, yaitu pita DNA berukuran 1300 bp (OPB_14) dan 1250 bp

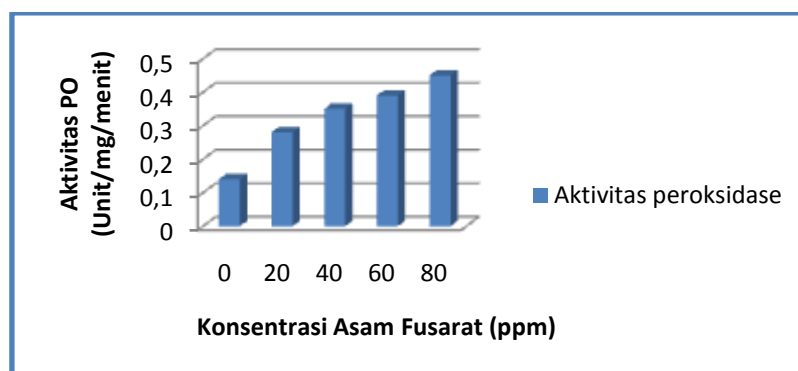
(OPB_20), sehingga pita DNA ini dapat dijadikan sebagai pembeda antara planlet *Cassava* kontrol dan planlet *Cassava* yang diimbasi AF. Pita DNA ini dinamakan sebagai **penanda RAPD OPB_14₁₃₀₀ dan RAPD OPB_20₁₁₅₀**.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Esmail *et al.* (2012), mengemukakan bahwa penanda RAPD dapat digunakan untuk membedakan planlet *Carnation (Dianthus caryophyllus L.)* yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* dan planlet yang sensitif terhadap jamur tersebut secara *in vitro*. Soliman (2012) dan Parida *et al.* (2010) menggunakan RAPD untuk mengevaluasi kestabilan genetik planlet *Apricot (Prunus armeniaca L.)* dan *Kaempferia galanga*, hasil mikropropagasi secara *in vitro* dibandingkan dengan induknya. Karun *et al.* (2008), telah dapat membedakan planlet pinang (*Areca catechu L.*) yang tahan terhadap penyakit *Yellow Leaf Disease (YLD)* dengan planlet yang sensitif secara *in vitro*.

Berdasarkan uraian di atas, dapat dinyatakan bahwa planlet *Cassava* kontrol (rentan) secara genetik berbeda dengan planlet *Cassava* yang diimbasi AF pada konsentrasi 20, 40, 60 dan 80 ppm (moderat dan tahan) terhadap *Fusarium oxysporum*, penyebab penyakit layu fusarium.

D. Aktivitas enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Hasil analisis aktivitas enzim peroksidase planlet *Cassava* yang di tanam pada medium VW dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan dalam suatu histogram pada Gambar 4.



Gambar 4. Histogram hubungan antara aktivitas enzim peroksidase planlet *Cassava* yang tidak diimbasi (kontrol) dan diimbasi asam fusarat (20, 40, 60, dan 80 ppm)

Gambar 4 menunjukkan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase yang signifikan dari empat konsentrasi AF yang berbeda. Pada kontrol (0 ppm) menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,14 U/mg/min. Konsentrasi AF 20 ppm mengakibatkan aktivitas enzim peroksidase meningkat sebesar 0,28 U/mg/min, konsentrasi AF 40 ppm menyebabkan aktivitas enzim peroksidase menjadi 0,35 U/mg/min, konsentrasi AF 60 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase 0,39 U/mg/min, dan pada konsentrasi AF 80 ppm menghasilkan aktivitas enzim peroksidase sebesar 0,45 U/mg/min. Peningkatan aktivitas enzim peroksidase sejalan dengan meningkatnya cekaman AF. Fakta ini didukung oleh penelitian Alkahtani *et al.* (2011), yang meneliti berbagai perlakuan cekaman abiotik terhadap mentimun dapat meningkatkan aktivitas enzim peroksidase. Selanjutnya Sprecher *et al.* (1993) meneliti aktivitas enzim peroksidase pada *Myriophyllum spicatum* L. dan *Hydrilla verticillata*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas enzim peroksidase meningkat 2-3 kali dibanding kontrol setelah diinduksi oleh cekaman herbisida.

G. Analisis Fenol Total

Penyiapan kurva kalibrasi standar senyawa fenol asam galat digunakan sebagai larutan standar. Penambahan kandungan fenol total pada planlet *Cassava* hasil pengimbasan AF yang di inokulasikan *F. oxysporum* juga merupakan salah satu indikator adanya mekanisme ketahanan secara *in vitro*. Pengukuran kadar fenol total pada planlet *Cassava* menggunakan metode Aberouman and Deokule (2008). Kadar fenol total (%) planlet *Cassava* hasil pengimbasan asam fusarat disajikan pada Tabel 7

Tabel 8. Kadar fenol total (%) planlet *Cassava* hasil pengimbasan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Kandungan Fenol Total (%)
0	5,41
20	6,35
40	6,54
60	6,88
80	6,92

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Pada Tabel 8 di atas terlihat peningkatan fenol total sejalan dengan semakin meningkatnya konsentrasi AF. Hasil penelitian ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Khan *et al.* (2005) pada tanaman *Chickpea* yang diinfeksi dengan *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa terjadi peningkatan fenol total sekitar 16-17%. Peningkatan senyawa fenol total pada planlet Cassava yang diimbas AF, merupakan bukti yang lain dari peningkatan ketahanan tanaman dalam menahan laju infeksi *Fo*.

BAB VI. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang telah diuraikan di muka dapat diambil kesimpulan dan saran sebagai berikut.

1. Kisaran konsentrasi Asam Fusarat toleran untuk seleksi planlet *Cassava* adalah 20-80 ppm
2. Secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 80 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 20, 40 dan 60 ppm, konsentrasi AF 80 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ke tahan
3. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase, kandungan fenol total pada planlet *Cassava* tahan *Fo*.
4. Pita DNA spesifik mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1300 bp (OPB_14) dan 1150 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *Cassava* terhadap *Fusarium oxysporum*.

REFERENSI

- Alkahtani M, Omer SA, El-Naggar MA, Abdel-Kareem EM, & Mahmoud MA. 2011. Pathogenesis-related Protein and Phytoalexin Induction Against Cucumber Powdery Mildew by Elicitors. *International Journal of Plant Pathology* 2(2): 63-71.
- Azrai M. 2005. Pemanfaatan Markah Molekular dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman. *Agro Biogen* 1 (1): 26-37.
- Bardakci F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J Biol.* 25: 185-196
- Bouizgarne, B, Bouteau HEM, Frankart C, Reboutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadrami EI. 2006. Early Physiological Responses of *Arabidopsis thaliana* Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.

- Boras O, Santos R, Matos A, Cabral P, & Arzola RS. 2001. A First Attempt to Use A *Fusarium subglutinans* Culture Filtrate For The Selection of Pineapple Cultivar to Fusariose Disease. *Plant Breeding* 120(5): 345-438.
- Daryono BS & Natsuaki KT. 2002. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Detection of Resistance Cultivars of Melon (*Cucumis melo* L.) Against Cucurbit Viruses. *Acta Horticultural* 588: 321-329.
- Edreva A. 2005. Pathogenesis-Related Protein: Research Progress in The Last 15 Years. *Gen. Appl. Plant Physiology* 31(1-2): 105-124.
- Djatnika I. 2012. Seleksi Bakteri Antagonis untuk Mengendalikan Layu *Fusarium* pada Tanaman *Phalaenopsis*. *J.Hort.* 22(3):276-284.
- Guida V, Criscuolo G, Tamburino R, Malorni L, Parente1 A, & Di Maro A. 2010. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB Reports*. <http://bmbreports.org>. Diakses 25 januari 2013.
- Hadisutrisno B. 2004. *Taktik dan Strategi Perlindungan Tanaman Menghadapi Gangguan Penyakit Layu Fusarium*. Makalah Simposium Nasional I di Purwokerto, 2-3 Maret.
- He CY, Hsiang T, & Wolyn DJ. 2002. Induction of Systemic Disease Resistance and Pathogen Defence Responses in *Asparagus officinalis* Inoculated with Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51: 225-230.
- Jang IC, Park SY, Kim KY, Kwon SY, Kim JG, & Kwak SS. 2004. Differential Expression of 10 Sweetpotato Peroxidase Genes in Response to Bacterial Pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 451-455.
- Djaenuddin N, 2003. Bioekologi dan Pengelolaan Penyakit Layu *Fusarium*: *Fusarium oxysporum*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros. pp. 67-71.
- Khan IA, Alam SS, Haq A, & Jabbar A. 2005. Biochemistry of Resistance in *Chicpea* Against Wilt Disease Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Pak. J. Bot.* 37: 97-104.
- Landa BB, Cachinero-Diaz JM, Lemanceu P, Jimenez-Diaz RM, & Alabouvette C, 2002. Effect of Fusaric Acid and Phytoanticipins on Growth of Rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
- Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, & Phongpaichit S. 2006. Purification, Characterization and Synergistic Activity of β -1,3-glucanase and Antibiotic Extract From an Antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 Against Rice Blast and Sheath Blight. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 990-997.
- Luhova L, Lebeda A, Hedererova D, & Pec P. 2003. Activities of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum sativum* L. Under Different Light Conditions. *Plant Soil Environ* 49: 151-157.
- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, & Teixeira JB. 1995. Race 1 *Fusarium* Wilt tolerance on banana plants selected by Fusaric Acid. *Euphytica* 84: 67-71.
- Mei C, Wassom JJ, & Widholm JM. 2004. Expression Specificity of The Globulin-1 Promoter Driven Transgene (Chitinase) in Maize Seed Tissue. *Maydica* 49: 255-265.

- Morpurgo R, Lopato SV, Afza R, & Novak FJ. 1994. Selection parameters for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and 4 on Diploid Banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* 75: 121-129.
- Nurcahyani E**, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. Terakreditasi SK No. 110/DIKTI/Kep/2009. ISSN: 1411-7525. Vol. 12 /No. 1: 12-22
- Nurcahyani E**. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Disertasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 201 p. Tidak Dipublikasikan.
- Nurcahyani, E.**, Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Nurcahyani E.**, R. Agustrina, & T.T. Handayani. 2016a. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Science* 4(5): 102-105.
- Nurcahyani E.**, Rochmah Agustrina, Erdi Suroso, & Gardis Andari. 2016b. Analysis of Peroxidase Enzyme and Total Phenol from Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Bl) as Result of the *In Vitro* Fusaric Acid Selection Toward To *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Applied Agricultural Science* 2(6): 79-82.
- Nurcahyani E.**, Sumardi I., Hadisutrisno B., & Suharyanto E., 2017. DNA Pattern Analysis of *Vanilla planifolia* Andrews Plantlet which Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *WJPLS* 3(4): 27-34.
- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, & Paek KH. 2004. Molecular Characterization of Pepper Germin-Like Protein as The Novel PR-16 Family of Pathogenesis-Related Proteins Isolated During The resistance response to Viral and Bacterial Infection. *Planta* 219(5):797-806.
- Patel VK, Yadav RSS, & Yadav KDS. 2007. Enzymatic Characteristics of Lignin Peroxidases of Indigenous Lignolytic Fungal Strains-Part I. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 553-556.
- Popa G, Brezeanu A, Cornea CP, & Boe JP. 2009. Peroxidase Activity in *Eustoma grandiflorum* Plants Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Rom. J. Biol.–Plant Biol* 54:41-46.
- Remotti PC, Löffler HJM & Loten-Doting LV. 1997. Selection of Cell Lines and Regeneration of Plants Resistance to Fusaric Acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pear'. *Euphytica* 96: 237 – 245.
- Ruzin SE. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press. New York. 307 p.
- Saravanan T, Bhaskaran R, & Muthusamy M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* Wilt Disease. *Plant Pathology Journal* 3: 72-80.
- Semangun H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.

- Semagn K, Bjornstad A, & Ndjiondjop MN. 2006. An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 2540-2568.
- Stein BDK, Klomparens K, & Hammerschmidt. 1993. Histochemistry and Ultrastructure of The Induced Resistance response of Cucumber Plants to *Colletotrichum lagenarium*. *Journal of Phytopathology* 137: 177-188.
- Welsh J & McClelland M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 7213-7218.
- Wedge DE & Elmer WH. 2008. Fusarium wilt of orchids. *ICOGO Bull.* Vol. 2. No.3. pp. 161-168.
- Wibowo A. 2002. Pengendalian Penyakit Layu Fusarium pada Pisang dengan Menggunakan Isolat Nonpatogenik *Fusarium* sp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 6: 65-70.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, & Tingey SV. 1990. DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.
- Ye XY & Ng TB. 2002. Isolation of a Novel Peroxidase from *French bean* legumes and First Demonstration of Antifungal Activity of A Non-Milk Peroxidase. *Life Sciences* 71: 1667-1680.
- Yun DJ, Bressan RA, & Hasegawa PM. 1997. Plant Antifungal Proteins. *Plant Breeding Reviews* 14: 39-50.



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
Gedung Rektorat Lantai 5, Jalan Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung 35145
Telepon (0721) 705173, Fax. (0721) 773798, e-mail : lppm@kpa.unila.ac.id
www.lppm.unila.ac.id

**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PASCASARJANA**

NOMOR : 1571 /UN26.21/PN/2018
TANGGAL : 9 Juli 2018

ANTARA

PEJABAT PEMBUAT KOMITMEN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS LAMPUNG

DAN
Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (Ketua)
PENANGGUNGJAWAB KEGIATAN PENELITIAN DENGAN JUDUL Analisis
Pola Dna Dan Karakterisasi Cassava (Manihot Esculenta Crantz.) Hasil
Induced Resistance Terhadap Fusarium Oxysporum
FAKULTAS FMIPA
UNIVERSITAS LAMPUNG

BANDAR LAMPUNG
2018



**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PASCASARJANA
UNIVERSITAS LAMPUNG**

NOMOR : 1571 /UN26.21/PN/2018
TANGGAL : 9 Juli 2018

Pada hari ini **Senin** tanggal **Sembilan** bulan **Juli** tahun **Dua Ribu Delapan Belas**, kami yang bertanda tangan di bawah ini :

1. Nama : Warsono, Ph. D
Jabatan : Pejabat Pembuat Komitmen LPPM Universitas Lampung
Alamat : Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung

Selanjutnya dalam perjanjian ini disebut **PIHAK PERTAMA**

2. Nama : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
Jabatan : Penanggungjawab Pelaksanaan Kegiatan Penelitian dengan Judul
**"Analisis Pola Dna Dan Karakterisasi Cassava (Manihot
Esculenta Crantz.) Hasil Induced Resistance Terhadap
Fusarium Oxysporum"**
Alamat : Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung

Selanjutnya dalam perjanjian ini disebut **PIHAK KEDUA**

PIHAK PERTAMA DAN KEDUA berdasarkan :

1. Peraturan Presiden nomor 54 tahun 2010; tentang pengadaan barang/jasa pemerintah
2. Undang-undang RI nomor 17 tahun 2003 tentang Keuangan Negara;
3. Undang-undang nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional;
4. Undang-undang nomor 15 tahun 2004 tentang Pemeriksaan Pengelolaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
5. Keppres Nomor 42 tahun 2002 jo nomor 72 tahun 2004 tentang Pelaksanaan Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara;
6. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 606/KMK.66/2004 tentang Pedoman Pembayaran Pelaksanaan Anggaran;
7. DIPA Universitas Lampung Nomor DIPA-042.01.2.400954/2018, tanggal 05 Desember 2017

Dengan ini menyatakan setuju dan sepakat untuk mengikat diri dalam suatu perjanjian pelaksanaan pekerjaan , dengan ketentuan dan syarat-syarat tercantum dalam pasal-pasal ini :

PASAL 1 LINGKUP PEKERJAAN

PIHAK PERTAMA memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk melaksanakan dan mengkoordinir kegiatan Penelitian dengan Judul *"Analisis Pola Dna Dan Karakterisasi Cassava (Manihot Esculenta Crantz.) Hasil Induced Resistance Terhadap Fusarium Oxysporum"*.

PASAL 2 BIAYA PENELITIAN

Untuk melaksanakan kegiatan Penelitian oleh Dosen FMIPA Unila seperti dalam pasal 1 di atas, dibiayai dari Anggaran DIPA BLU Unila TA 2018 sebesar Rp. 40000000,- (*Empat Puluh Juta Rupiah*). Mata Anggaran Kegiatan (MAK) 042.002.001.053.C.525119 Tahun Anggaran 2018. Sudah termasuk biaya Seminar, Penerbitan Publikasi Universitas.

PASAL 3 CARA PEMBAYARAN

Pembayaran tersebut pada pasal 2 di atas dilakukan dalam 2 tahap :

1. Tahap pertama sebesar 70% dari nilai kontrak atau sebesar 70% x Rp. 40000000,- = Rp 28000000,- (*Dua Puluh Delapan Juta Rupiah*) setelah penandatanganan kontrak oleh kedua belah pihak dan menyerahkan proposal yang disahkan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian masyarakat Universitas Lampung.
2. Tahap kedua (terakhir) sebesar 30% dari nilai kontrak atau sebesar 30% x Rp. 40000000,- = Rp. 12000000,- (*Dua Belas Juta Rupiah*) setelah pekerjaan dinyatakan selesai dan dinyatakan dalam berita acara penyerahan pekerjaan dan menyerahkan laporan hasil kegiatan Penelitian dan Publikasi.

Pembayaran dilakukan melalui kas Badan Layanan Umum (BLU) Universitas Lampung pada pihak kedua ke nomor rekening : 0070747211 Bank BNI Tanjung Karang atas nama : **Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.** Penanggungjawab kegiatan penelitian oleh Dosen FMIPA Unila

PASAL 4 JANGKA WAKTU PELAKSANAAN

1. Jangka waktu pelaksanaan kegiatan Penelitian dengan Judul dan Penelitian Universitas Lampung oleh Dosen FMIPA Universitas Lampung tersebut dalam pasal 1 adalah 136 (seratus tiga puluh enam) terhitung sejak ditandatanganinya perjanjian ini. Laporan ini harus diserahkan **PIHAK KEDUA** selambat-lambatnya tanggal 21 November 2018 sebanyak (3) Tiga Eksemplar.
2. Apabila laporan Penelitian tidak diselesaikan tepat pada waktunya, **PIHAK KEDUA** dapat mengajukan Adendum sebanyak 1 kali saja, dan apabila **PIHAK KEDUA** berhenti/diberhentikan dari jabatan atau dipindahkan ke instansi lain, **PIHAK KEDUA** wajib mempertanggungjawabkan penggunaan dana penelitian yang telah diterima dari **PIHAK PERTAMA**, selanjutnya **PIHAK PERTAMA** berhak menunjuk orang lain untuk melaksanakan pekerjaan tersebut.

PASAL 5 SANKSI

1. Jika **PIHAK KEDUA** tidak dapat melaksanakan pekerjaan sesuai dengan batas Waktu pelaksanaan yang tercantum dalam pasal 4 dalam perjanjian ini maka untuk tiap hari keterlambatan **PIHAK KEDUA** wajib membayar denda keterlambatan sebesar 1/1000 (satu permil) dari nilai kontrak.
2. **PIHAK KEDUA** bertanggung jawab penuh apabila dalam pelaksanaan pekerjaan ini tidak sesuai dengan ketentuan yang berlaku, atau terdapat hal – hal atau temuan pemeriksaan yang mengakibatkan kerugian negara.

PASAL 6 PENYELESAIAN PERSELISIHAN

1. Jika terjadi perselisihan antara kedua belah pihak, pada dasarnya akan diselesaikan secara musyawarah.
2. Jika perselisihan itu tidak dapat diselesaikan secara musyawarah, maka akan diselesaikan oleh "panitia pendamai" yang berfungsi sebagai juri/wasit yang dibentuk dan diangkat oleh kedua belah pihak yang terdiri dari:
 - Seorang wakil dan **PIHAK PERTAMA** sebagai anggota
 - Seorang wakil dari **PIHAK KEDUA** sebagai anggota
 - Seorang pihak ketiga yang ahli sebagai Ketua, yang telah disetujui oleh **PIHAK KEDUA**
3. Keputusan panitia pendamai ini mengikat kedua belah pihak, dan biaya penyelesaian perselisihan yang dikeluarkan akan ditanggung secara bersama.
4. Jika keputusan ini sebagaimana dimaksud ayat 3 pasal ini tidak dapat diterima oleh salah satu pihak, maka penyelesaian perselisihan akan diteruskan melalui pengadilan Negeri.

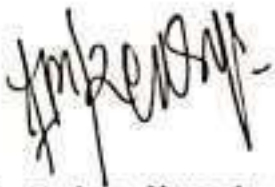
PASAL 7 LAIN-LAIN

1. Segala sesuatu yang belum diatur dalam surat perjanjian ini yang dipandang perlu oleh kedua belah pihak akan diatur lebih lanjut dalam surat perjanjian tambahan (*Addendum*) dan merupakan perjanjian yang tidak dapat terpisahkan dari perjanjian ini.
2. Surat perjanjian ini dibuat rangkap 4 (empat) untuk Pihak Pertama dan Pihak Kedua, selebihnya diberikan kepada pihak-pihak yang berkepentingan dan ada hubungannya dengan pekerjaan.

**PASAL 8
PENUTUP**

1. Surat perjanjian ini dibuat dan ditandatangani oleh kedua belah pihak di atas materai Rp.6000.- (enam ribu rupiah) pada lembar ke satu dan lembar kedua yang mempunyai kekuatan hukum sama.
2. Perjanjian ini berlaku mulai tanggal ditandatangani oleh kedua belah pihak.

PIHAK KEDUA
Penanggungjawab Kegiatan



Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
NIP. 196510311992032003

PIHAK PERTAMA
Pejabat Pembuat Komitmen,
LPPM Universitas Lampung



Warsono, Ph. D
NIP. 196302161987031003 *ff*

**LAPORAN AKHIR
PENELITIAN PASCASARJANA
UNIVERSITAS LAMPUNG**



JUDUL PENELITIAN

**Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan
[*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.] Hasil Pengimbasan Ketahanan
Terhadap *Fusarium oxysporum* dan Cekaman Kekeringan**

TIM PENELITI

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (Ketua)

NIDN: 0031106503 SINTA ID: 6115457

Dr. Sumardi, M.Si. (Anggota)

NIDN: 0025036505 SINTA ID: 6008224

Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S. (Anggota)

NIDN: 0003026102 SINTA ID: 6039340

KATEGORI: Penelitian Dasar

Berdasarkan Surat penugasan Penelitian PASCASARJANA Nomor Kontrak:
1921/UN26.21/PN/2019 Tanggal 26 Juni 2019

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
OKTOBER
2019**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**

Judul Penelitian : Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap *Fusarium oxysporum* dan Cekaman Kekeringan

Manfaat Sosial Ekonomi : Penelitian ini diharapkan menghasilkan bibit (varietas) anggrek bulan tahan kekeringan dan layu *Fusarium* sehingga produksi anggrek bulan meningkat dan dapat memajukan perekonomian para petani anggrek

Jenis penelitian : Penelitian Dasar

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
b. NIDN : 0031106503
c. SINTA ID : 6115457
d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
e. Program Studi : Magister Biologi
f. Nomor HP : 085228255200
g. Alamat surel (e-mail) : endang.nurcahyani@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti (1)

a. Nama Lengkap : Dr. Sumardi, M.Si.
b. NIDN : 0025036505
c. SINTA ID : 6008224
d. Program Studi : Magister Biologi

Anggota Peneliti (2)

a. Nama Lengkap : Dr. Hardoko Insan Qudus, M. Si.
b. NIDN : 0003026102
c. SINTA ID : 6039340
d. Program Studi : Magister Kimia

Jumlah mahasiswa yang terlibat : 2 (dua) orang

Lokasi kegiatan : Laboratorium Botani Ruang Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM.

Lama kegiatan : 8 bulan

Biaya Penelitian : Rp.40.000.000,-

Sumber dana : BLU-Unila-2019

Bandar Lampung, 23 Oktober 2019
Ketua Peneliti,

Mengetahui,
Ketua Program Pascasarjana Unila

Prof. Dr. Mustofa, MA, Ph. D.
NIP. 195701011984031020

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
NIP. 196510311992032003

Menyetujui,
Ketua LPPM Unila
Prof. Dr. Ir. Hamim Sudarsono, M.Sc.
NIP. 196001191984031003

**IDENTITAS DAN URAIAN UMUM
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**

1. **Judul Penelitian** : Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap *Fusarium oxysporum* dan Cekaman Kekeringan

2. **Tim Peneliti**

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Program Studi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.	Ketua	Molekular Bioteknologi Tumbuhan	Magister Biologi	10
2.	Dr. Sumardi, M.Si.	Anggota 1	Mikrobiologi	Magister Biologi	8
3.	Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.	Anggota 2	Kimia Analitik	Magister Kimia	8

3. **Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):**

Planlet anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.), Asam fusarat, *Polyethylene Glycol* (PEG), *Fusarium oxysporum* (**Jenis material yang akan diteliti**); Analisis molekular: Pola DNA, Aktivitas Peroksidase, Kandungan Karbohidrat, Klorofil, dan Prolin anggrek bulan *Phalaenopsis amabilis* hasil Pengimbasan Ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum* dan cekaman kekeringan (**Segi penelitian**).

4. **Masa Pelaksanaan**

Mulai : Bulan Maret Tahun 2019
Berakhir : Bulan Oktober Tahun 2019

5. **Usulan Biaya** : Rp. 40.000.000,- (Empat puluh juta rupiah)

6. **Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan)**

Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM.

7. **Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)**

Universitas Gadjah Mada, terutama Pusat Studi Bioteknologi, Laboratorium Rekayasa Genetika. Kontribusi dari instansi tersebut berperan dalam membantu menganalisis bidang molekular yaitu Analisis DNA planlet anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.). Kerjasama ini akan diwujudkan dengan melibatkan seorang staf teknisi pada instansi tersebut.

8. Temuan yang ditargetkan lulusan S-2

- a. Mahasiswa dapat melaksanakan penelitian dan lulus dengan tepat waktu sesuai yang ditargetkan (1,5 tahun).
- b. Mahasiswa dapat melaksanakan presentasi di seminar berskala nasional atau internasional dan menulis temuannya pada jurnal internasional.

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek)

Teori mekanisme Pengimbasan Ketahanan (*Induce Resistance*) planlet *Phalaenopsis amabilis* terhadap *Fusarium oxysporum* dan PEG berdasarkan pola DNA dan karakterisasi spesifiknya, secara ilmiah **memberikan kontribusi bidang analisis molekular**; dengan diketahuinya pola DNA nya, membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan *P. amabilis* tahan terhadap *Fusarium oxysporum* dan cekaman kekeringan.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran untuk setiap penerima Hibah Penelitian Pascasarjana (Nasional/ Internasional)

IOSR **Journal of Agricultural and Veterinary Science** (IOSR-JAVS); url: www.iosrjournals.org/iosr-javs.html;

Tahun rencana publikasi : 2020

Judul rencana publikasi : **“Analysis of Chlorophyll *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Results of the Resistance to *Fusarium Oxysporum* and Drought Stress”**

11. Seminar yang diikuti

Seminar International: The International Conference on Biological Science (ICBS). Fakultas Biologi-Universitas Gadjah Mada-Yogyakarta. <https://icbs.biologi.ugm.ac.id>
Waktu penyelenggaraan: 10-11 Oktober 2019.

Judul yang telah diseminarkan : **“In Vitro Selection *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Plantlets Result of Induced Resistance with Fusaric Acid.”**

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	iii
DAFTAR ISI	v
RINGKASAN	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. METODE PENELITIAN	9
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	10
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	14
REFERENSI	15
LAMPIRAN-LAMPIRAN	19
1. a. NASKAH PRESENTASI Seminar Nasional “PBI 2019”	21
b. NASKAH PRESENTASI Seminar Internasional “ICBS 2019”	22
2. a. P.Pt. Seminar “PBI 2019”	22
b. P.Pt. Seminar Internasional “ICBS 2019”	23
3. SERTIFIKAT “PBI 2019”	23
4. SERTIFIKAT “ICBS 2019”	24
5. MANUSKRIP JURNAL INTERNASIONAL “IOSR 2019”	24
6. BUKTI SUBMIT KE JURNAL INTERNASIONAL “IOSR 2019”	25
7. FOTO KEGIATAN SEMINAR NASIONAL “PBI 2019”	26
8. FOTO KEGIATAN SEMINAR INTERNASIONAL “ICBS 2019”	27

RINGKASAN

Anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) merupakan anggrek asli dari Indonesia dan salah satu bunga nasional Indonesia, dikenal sebagai **Puspa Pesona**, serta masuk ke dalam daftar spesies yang terancam kepunahannya. Anggrek bulan juga merupakan salah satu tanaman anggrek yang banyak diminati oleh berbagai kalangan karena keindahan bentuk dan warna bunganya, tetapi produksi anggrek bulan di Indonesia masih tertinggal jauh dibandingkan dengan negara-negara lain seperti Thailand, Taiwan, Singapura dan Australia.

Penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan masih merupakan kendala produksi dalam budidaya anggrek bulan [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.]. Penyakit layu *Fusarium* disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif. Selain penyakit, ketersediaan air yang tidak memadai menjadi permasalahan bagi para petani anggrek. Kekeringan hampir terjadi di setiap tahun, sehingga mampu menjadi pembatas utama pertumbuhan tanaman yang diakibatkan oleh tingkat kekeringan. Penggunaan **bibit (varietas)** anggrek bulan *P. amabilis* yang tahan penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit dan cekaman kekeringan yang penting.

Penelitian pendahuluan pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*) anggrek *P. amabilis* dengan asam fusarat (AF) dan *Polyethylene Glycol* (PEG) telah dimulai, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF dan PEG toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang tahan atau resisten. Untuk memperoleh gambaran mekanisme terbentuknya ketahanan tanaman terimbas, maka perlu dilakukan kajian lebih mendalam tentang pola DNA dan karakter spesifik dari *P. amabilis* yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* (*Fo*) dan cekaman kekeringan.

Tujuan jangka panjang dalam penelitian ini adalah memperoleh bibit (varietas) *P. amabilis* yang tahan terhadap *Fo* dan cekaman kekeringan. **Target khusus** yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah (1) Teori baru tentang mekanisme ketahanan *P. amabilis* terhadap *Fo* dan kekeringan (2) Karakter spesifik *P. amabilis* yang tahan *Fo* dan kekeringan, dan (3) Pola DNA *P. amabilis* tahan *Fo* dan kekeringan. Teori baru hasil penelitian ini diharapkan akan menjadi acuan metode ketahanan terimbas pada tanaman anggrek, khususnya *P. amabilis*, di Indonesia terhadap penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan.

Tahapan kegiatan yang akan dilakukan meliputi: (1) Pengujian ketahanan *P. amabilis* terhadap *Fo* dan PEG secara *in vitro*, diharapkan akan diperoleh planlet *P. amabilis* yang bersifat tahan penyakit layu *Fusarium* dan kekeringan, (2) Analisis prolin, diharapkan akan terbentuk ketahanan planlet *P. amabilis* terhadap cekaman kekeringan, (3) Analisis enzim peroksidase (*Pathogenesis-Related protein/PR-protein*), yang diduga akan mendegradasi epidermis *Fo*, dan (4) Analisis pola DNA *P. amabilis*, dengan metode RAPD, diharapkan dapat diketahui pola dari gen ketahanan *P. amabilis* yang tahan *Fo* dan cekaman kekeringan.

Hasil penelitian pada ketahanan layu fusarium menunjukkan bahwa: 1). Konsentrasi asam fusarat toleran untuk seleksi planlet *P. amabilis* adalah 40 ppm. 2). Terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase, kandungan klorofil total, klorofil a, klorofil b, serta kandungan karbohidrat terlarut total I pada planlet *P. amabilis* seiring meningkatnya konsentrasi Asam Fusarat, serta hasil penelitian pada ketahanan cekaman kekeringan adalah 1). Konsentrasi PEG 6000 10% dan atonik 0 mL/L yang optimum untuk pertumbuhan planlet *P. Amabilis*. 2). Kandungan klorofil a, b, total rendah, indeks stomata menurun, karbohidrat total dan prolin tinggi. 3). Tidak ada interaksi antara larutan atonik dan PEG 6000. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1300 bp (OPB_20) dan 1500 bp (OPB_14) dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *P. amabilis* terhadap *Fusarium oxysporum*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *P. amabilis* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF.

Kata kunci: cekaman kekeringan, *Fusarium oxysporum*, Pengimbasan Ketahanan, *Phalaenopsis amabilis*; Pola DNA,

PRAKATA

Puji syukur dipanjatkan pada Allah S.W.T. atas limpahan Rahmat yang diberikan kepada penyusun, sehingga penyusunan **Laporan Penelitian** yang berjudul “Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap *Fusarium oxysporum* dan Cekaman Kekeringan” dapat diselesaikan.

Penelitian ini dibiayai oleh **Dana DIPA BLU Universitas Lampung Tahun Anggaran 2019**, sesuai dengan **Surat Perjanjian Penugasan Penelitian PASCASARJANA Nomor: 1921/UN26.21/PN/2019 Tanggal 26 Juni 2019**, untuk itu penyusun mengucapkan terima kasih atas kesempatan tersebut.

Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Rektor Universitas Lampung; Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat Universitas Lampung; Dekan Fakultas MIPA Universitas Lampung atas bantuan fasilitas yang diberikan, serta semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian dan penyusunan Laporan Akhir ini. Penyusun berharap semoga hasil laporan ini bermanfaat bagi yang memerlukan.

Bandar Lampung, 29 Oktober 2019

Penyusun

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Anggrek merupakan tanaman berbunga yang mempunyai nilai ekonomi cukup tinggi dan harganya relatif stabil, memiliki bentuk, warna, dan ukuran bunga yang beragam, sehingga tanaman ini sangat indah untuk dipandang dan menciptakan daya tarik tersendiri bagi para pecinta anggrek (Ramadiana *et al.*, 2008; Mattjik, 2010; Djatnika, 2012). Anggrek bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.) merupakan anggrek asli dari Indonesia dan masuk ke dalam daftar spesies yang terancam kepunahannya. Anggrek bulan juga merupakan **salah satu bunga nasional Indonesia** yang ditetapkan melalui Keputusan Presiden Nomor 4/1993, sebagai **Puspa Pesona**, selain bunga melati (*Jasminum sambac* L.) sebagai puspa bangsa, dan bunga padma raksasa (*Rafflesia arnoldii* R. Br.) sebagai puspa langka (Puspitaningtyas dan Mursidawati, 2010), walaupun demikian produksi anggrek bulan di Indonesia masih tertinggal jauh dibandingkan dengan negara-negara lain seperti Thailand, Taiwan, Singapura dan Australia (Purwati, 2012).

Salah satu kendala yang dihadapi dalam budidaya anggrek adalah adanya jamur patogen yang dapat menyerang beberapa bagian tanaman antara lain batang, daun, atau akar (Djatnika, 2012). Salah satu jamur patogen yang sering menyerang akar anggrek antara lain *Fusarium oxysporum* yang sering disebut juga sebagai patogen tular tanah (Anonymous, 2008), merupakan penyakit penting dan menjadi salah satu kendala dalam kualitas dan produksi tanaman anggrek, termasuk di dalamnya anggrek bulan (*P. Amabilis*). Gejala penyakit tersebut muncul sejak tanaman anggrek dipindah dari medium kultur jaringan (Palmer, 2011). Di Amerika Serikat, penyakit tersebut dapat menyebabkan kematian tanaman dan kehilangan hasil lebih dari 50% dan sulit dikendalikan dengan hanya menggunakan fungisida (Wedge & Elmer, 2008).

Selain penyakit, ketersediaan air yang tidak memadai menjadi permasalahan bagi para petani anggrek. Kekeringan hampir terjadi di setiap tahun, sehingga mampu menjadi pembatas utama pertumbuhan tanaman yang diakibatkan oleh tingkat kekeringan. Cekaman kekeringan pada tanaman dapat mengakibatkan lambatnya pertumbuhan luas daun dan berpengaruh pada stomata ataupun fotosintesis pada daun dan pada tingkat ringan sampai menengah mampu menurunkan produktivitas tanaman (Nio *et al.*, 2006).

Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang efisien, efektif dan aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan **varietas yang resisten**. Penggunaan varietas unggul yang tahan terhadap *Fo* dan kekeringan dengan daya hasil tinggi merupakan salah satu alternatif

pengendalian penyakit dan cekaman kekeringan yang penting dan tidak menimbulkan dampak negatif (Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b; Nurcahyani *et al.*, 2017; Azhari *et al.*, 2018; Rosyalina *et al.*, 2018; Nurcahyani *et al.*, 2019).

Pengembangan varietas planlet tahan *Fo* dapat dilakukan antara lain dengan metode seleksi *in vitro* yaitu mengkulturkan eksplan berupa jaringan atau organ pada medium yang mengandung asam fusarat konsentrasi selektif (Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b; Nurcahyani *et al.*, 2014; Nurcahyani *et al.*, 2017; Nurcahyani *et al.*, 2019), sedangkan penelitian pengembangan planlet tahan cekaman kekeringan dilakukan dengan menginduksi *Polyethylene Glycol* (PEG) dengan berat molekul lebih dari 4000 pada medium seleksi *in vitro* (Azhari *et al.*, 2018; Rosyalina *et al.*, 2018).

Polyethylene Glycol merupakan suatu senyawa kimia yang mengandung aktivitas matriks sub unit etilen oksida yang mampu menurunkan potensial osmotik dengan mengikat molekul air menggunakan ikatan hidrogen. Pemberian PEG pada planlet bertujuan untuk menghasilkan kondisi cekaman kekeringan karena ketersediaan air pada tanaman menjadi berkurang (Rahayu *et al.*, 2005). Seleksi *in vitro* telah diteliti dalam menghasilkan tanaman tahan terhadap cekaman kekeringan diantaranya tanaman padi hibrida menggunakan konsentersasi PEG 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% (Afa *et al.*, 2012); kacang tanah pada konsentrasi PEG 10% (Adisyahputra *et al.*, 2004); tomat dengan konsentersasi PEG 5%, 10%, 15% 20% (Harahap *et al.*, 2013); Planlet Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco var. *crenatifolia*) pada kombinasi atonik 1mL/L, PEG 3% (Azhari *et al.*, 2018) dan Planlet Jeruk Siam Pontianak (*Citrus Nobilis* Lour. var. *microcarpa* Hassk.) pada kombinasi atonik 3 mL/L dan PEG 4% (Rosyalina *et al.*, 2018) secara *In Vitro*.

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Asam ini dapat bersifat toksin (konsentrasi lebih dari 10^{-5} M) sehingga menghambat pertumbuhan dan regenerasi biakan (Landa *et al.*, 2002; Bouizgarne *et al.*, 2006), tetapi pada konsentrasi yang non toksik (di bawah 10^{-6} M) justru membantu mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk respon tanaman untuk menghambat aktivitas patogen (Bouizgarne *et al.*, 2006). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi

tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Arai dan Takeuchi, 1993). Identifikasi mutan yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), nanas (Borras *et al.*, 2001), *Sphatoglottis plicata* (Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b), vanili (Nurcahyani *et al.*, 2012; Nurcahyani, 2013; Nurcahyani *et al.*, 2014; Nurcahyani *et al.*, 2017) dan Cassava (Nurcahyani *et al.*, 2019). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa sel* yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Keragaman genetik pada planlet *P. amabilis* akibat perlakuan dengan AF, dapat dideteksi dengan penanda molekular, salah satunya adalah *Random Amplified Polymorphic Deoxyribo Nucleic Acid* [DNA(RAPD)]. Metode RAPD adalah penanda berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dengan menggunakan 10 basa primer acak (Welsh & Mc Clelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Penggunaan AF dan PEG dalam konsentrasi yang toleran sejauh ini belum pernah dilaporkan secara pasti dan tepat dalam pengimbasan ketahanan (*Induced Resistance*) planlet *P. amabilis* terhadap *Fo* dan cekaman kekeringan. Oleh karena itu, penelitian tentang peranan AF dan PEG sebagai pengimbas ketahanan secara *in vitro* perlu dilakukan. Pengendalian penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan pada *P. amabilis* dengan AF dan PEG sepanjang pengetahuan penulis belum pernah dilakukan dan belum diketahui: (1) Mekanisme ketahanan *P. amabilis* terimbas terhadap *F. oxysporum* dan cekaman kekeringan (2) Karakter ekspresi spesifik *P. Amabilis* yang tahan terhadap *F. oxysporum* dan cekaman kekeringan, dan (3) Pola DNA *P.amabilis* tahan *F. oxysporum* dan cekaman kekeringan.

B. Tujuan Khusus

Beberapa masalah didalam penanggulangan penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *F.oxysporum* dan cekaman kekeringan pada *P. amabilis* selama ini belum terpecahkan, oleh karena itu penelitian ini bertujuan:

1. Mengetahui konsentrasi AF dan PEG 6000 toleran untuk seleksi planlet *P. Amabilis* dengan pertumbuhan optimum.
2. Mengkarakterisasi ekspresi planlet *P. Amabilis* hasil pengimbasan AS dan PEG 6000.
3. Mengetahui pengaruh interaksi antara larutan atonik dengan PEG 6000 pada setiap ekspresi karakter planlet *P. Amabilis*.

C. Urgensi Penelitian

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam budidaya tanaman anggrek termasuk anggrek bulan [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.] di Indonesia adalah penyakit layu *Fusarium* dan juga cekaman kekeringan. Penyakit layu *Fusarium* disebabkan oleh jamur *F.oxysporum* (*Fo*) dan bersifat tular medium (Palmer, 2011). Salah satu cara pengendalian penyakit yang aman terhadap lingkungan dan cekaman kekeringan, yaitu menggunakan varietas yang tahan (resisten) dengan mekanisme ketahanan terimbas atau *induced resistance* (Agrios, 2005; Nurcahyani, 2012; Nurcahyani *et al.*, 2016a; Nurcahyani *et al.*, 2016b; Nurcahyani *et al.*, 2017; Azhari *et al.*, 2018; Rosyalina *et al.*, 2018; Nurcahyani *et al.*, 2019).

Pengimbasan ketahanan oleh AF pada *P. amabilis* diduga akan menyebabkan: (1) terbentuknya lignin (lignifikasi), dan prolin sehingga tanaman *P. amabilis* akan terlindung secara struktural dari penetrasi hifa *F. oxysporum* dan cekaman kekeringan, (2) Pembentukan protein peroksidase yang diduga akan mendegradasi epidermis *F. oxysporum*, (3) terjadinya perubahan pola DNA pada tanaman *P. amabilis* yang bersifat tahan penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan, sehingga akan dapat diketahui gen ketahanannya; oleh karena itu perlu dilakukan kajian lebih mendalam tentang berbagai hal tersebut sebagai teori baru mekanisme ketahanan *P. amabilis* terhadap jamur *F. oxysporum* dan cekaman kekeringan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat dalam menanggulangi penyakit tersebut sehingga nantinya akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual anggrek *P. amabilis* serta pendapatan petani anggrek, di Lampung khususnya dan di Indonesia pada umumnya.

Temuan dan luaran inovasi yang ditargetkan serta kontribusinya pada pengembangan keilmuan:

1. Ditemukannya mekanisme ketahanan *P. amabilis* terhadap penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan dengan teknik *Induced Resistance* (Ketahanan Terimbas) secara *in vitro*; dengan diketahuinya pengetahuan dasar tersebut, nantinya bagi petani anggrek di Lampung khususnya dan di Indonesia umumnya, dapat mempraktekkan sendiri metode tersebut secara lebih sederhana.
2. Dalam jangka panjang akan diperoleh bibit (varietas) *P. amabilis* tahan penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan; dengan tersedianya bibit *P. amabilis* tahan penyakit dan cekaman kekeringan tersebut, nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual *P. amabilis* serta pendapatan petani anggrek *P. amabilis* di Lampung khususnya dan Indonesia pada umumnya.

Rencana Target Capaian pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rencana Target Capaian dalam penelitian

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian TS ¹⁾
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	
1	Artikel ilmiah dimuat di Jurnal	Internasional	ada	tidak ada	<i>published</i>
		Nasional SINTA 4 (DOI)	tidak ada	tidak ada	tidak ada
2	Diseminarkan	Internasional	ada	Tidak ada	dilaksanakan
		Nasional	tidak ada	ada	dilaksanakan
		Universitas	tidak ada	tidak ada	tidak ada
3	Laporan penelitian		ada	tidak ada	ada
4	Laporan penggunaan anggaran (keuangan)		ada	tidak ada	ada
4	Draft Tesis disetujui pembimbing		ada	tidak ada	ada
5	Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT)				2

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Anggrek Bulan [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.]

Anggrek bulan adalah salah satu jenis anggrek alam yang memiliki pesona sangat indah dan banyak diminati di Indonesia dan termasuk ke dalam Familia Orchidaceae. Penyebarannya banyak ditemukan di Pulau Jawa dan Sumatera, dimanfaatkan sebagai bunga potong atau tanaman pot untuk hiasan rumah dan taman. Kekhasan anggrek bulan yaitu bentuk bunganya yang lebih besar dengan warna yang bervariasi dan waktu mekar bunga yang lebih lama dibandingkan jenis anggrek lain (Fauziah dkk., 2014). Morfologi bunga anggrek bulan disajikan pada **Gambar 1**.



Gambar 1. Bunga *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.
(Foto Nurcahyani, diambil di Liwa, Lampung Barat, 2019)

P. amabilis memiliki tingkat kerentanan penyakit lebih tinggi di banding dengan jenis anggrek lainnya. Sebagaimana tanaman bunga lainnya, tanaman anggrek dalam proses budidayanya sering kali mengalami gangguan berupa penyakit yang dapat membuat tanaman

rusak dan mati. Beberapa jamur patogen yang sering menyerang daun anggrek adalah *Fusarium* sp. (Soelistijono, 2015). Beberapa penyakit jamur *Phalaenopsis* telah dilaporkan di Taiwan, termasuk penyakit yang disebabkan oleh *Fusarium oxysporum* (*Fo*) , *F. solani*, dan *F. proliferatum* (Chung *et.al.*, 2011), *Fo* menyebabkan penyakit layu fusarium yang mengganggu pertumbuhan tanaman anggrek (Djatnika, 2012).

B. Cekaman Kekeringan

Cekaman kekeringan merupakan faktor utama penyebab kematian dalam budidaya anggrek. Kekeringan pada tanaman anggrek dapat disebabkan karena kelembapan yang rendah dan ketersediaan air yang kurang (Hendaryono, 2000). Berkurangnya suplai air pada tanaman akan menyebabkan penurunan turgor pada sel daun yang menyebabkan menurunnya luas daun hingga menutupnya stomata sehingga proses fotosintesis akan menurun (Karti, 2004).

Respons tanaman yang mengalami kekurangan air dapat merupakan perubahan di tingkat selular dan molekular yang ditunjukkan dengan penurunan laju pertumbuhan, berkurangnya luas daun dan peningkatan rasio akar : tajuk. Tingkat kerugian tanaman akibat kekurangan air dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain intensitas kekeringan yang dialami, lamanya kekeringan dan tahap pertumbuhan saat tanaman mengalami kekeringan (Purwanto dan Agustono, 2010).

C. Ketahanan terimbas (*induced resistance*).

Mekanisme ketahanan terimbas merupakan mekanisme yang sangat kompleks, meliputi pengenalan tanaman terhadap patogen (*recognition*), produksi fitoaleksin (salah satu turunan senyawa fenol), PR-protein (*Pathogenesis-Related protein*), dan lignifikasi (Agrawal *et al.*, 1999).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Vidhyasekaran, 1999). Infeksi tanaman oleh berbagai patogen seperti jamur, bakteri, dan virus dapat menyebabkan terbentuknya PR-protein (Park *et al.*, 2004; Edreva, 2005). Sintesis dan akumulasi PR-protein ini sangat berperan penting dalam pertahanan tanaman terhadap patogen. Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani, 2012; Nurcahyani, 2013; Nurcahyani, 2014; Nurcahyani, 2017); dan anggrek tanah *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani, 2016a; Nurcahyani, 2016b).

D. Penyakit Layu *Fusarium*

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu Fusarium**, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati. Selain itu, *F. oxysporum* tidak diskriminatif, mereka dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting. *F. oxysporum* terbukti sangat sulit diberantas karena spora *F. oxysporum* juga dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama, sehingga rotasi tanaman bukan merupakan metode kontrol yang tepat (Djaenuddin, 2003).

E. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002). Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, anggrek tanah, anyelir, dan vanili. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi pathogen (Nurcahyani *et al.*, 2017; Nurcahyani *et al.*, 2018; Nurcahyani *et al.*, 2019).

F. Polyethylene glycol (PEG)

Polyethylene glycol (PEG) yang dikenal sebagai *macrogols* pada industri farmasi di Eropa yang diproduksi oleh polimerasi *ethylene oxide*. Struktur molekul dari PEG adalah $\text{HO}[\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}]_n\text{-H}$. Dimana "n" adalah jumlah dari *ethylene oxide* (Anonymous, 2002). *Polyethylene glycol* memiliki dua sifat yakni pertama bersifat memacu adhesi antarprotoplas dan kedua bersifat mengganggu lapisan-lapisan rangkap phospholipid. Kadar optimal penggunaan PEG pada tanaman perlu diperhatikan dosisnya tergantung dari beberapa faktor yakni berat molekulnya, macam tanaman, kondisi ruang yang digunakan untuk inkubasi, temperatur, cahaya, besar kadar PEG yang dipakai dan lain-lain. Berdasarkan berat molekul pemakaian PEG 6000 bisa lebih efektif digunakan jika kadar keencerannya ditingkatkan. (Gunawan dan Azhari, 2010). *Polyethylene glycol* digunakan pada medium budidaya jaringan dalam mencapai *salt tolerance*. Penggunaan 20 % PEG pada budidaya sel tomat dan budidaya sel tembakau untuk men-

subkultur sel-sel hidup sampai 15-20 generasi. Hal ini sebagai upaya untuk mendapatkan lini sel yang toleran terhadap garam NaCl. Pada tanaman yang hidup di atas tanah dengan kadar garam yang tinggi yang masuk kedalam tanaman halofit, yang mampu hidup pada tanah dengan fisiologis kering dan telah mencapai toleransi terhadap garam-garam atau toleransi terhadap kekeringan. Adaptasi sel atau tanaman yang berhasil pada garam tinggi tumbuhnya akan mundur bahkan akan mati. Toleransi sel-sel terhadap kadar air yang rendah dapat menyesuaikan diri terhadap tekanan osmotik sebesar 40 bar untuk PEG. Pada kadar 15% PEG mempunyai *Lethal Dose* (LD) 50 dengan klon-klon yang *Low-water tolerance* sedangkan LD-50 pada kadar 5% PEG Klon klon tidak *Low-water tolerance* (Suryowinoto, 1996; Azhari *et al.*, 2018; Rosyalina *et al.*, 2018).

G. Deteksi mutan *P. amabilis* dengan PCR

Penampilan suatu individu merupakan hasil kerja dari suatu *trait* atau sifat. *Trait* ini dikendalikan atau ditentukan oleh molekul yang di dalamnya terdapat gen. Seiring dengan semakin berkembangnya teknologi yang berbasis marka DNA, maka saat ini telah ditemukan tiga tipe marka DNA dengan segala kelebihan dan kekurangan masing-masing (Semagn *et al.*, 2006). Ke tiga tipe marka DNA adalah: (1) marka yang berdasarkan pada hibridisasi DNA (RFLP); (2) marka yang berdasarkan pada reaksi rantai polimerase RAPD dan AFLP; dan (3) marka yang berdasarkan pada PCR dengan menggunakan primer yang menggabungkan sekuen komplementer spesifik dalam DNA sasaran. (Azrai, 2005; Semagn *et al.*, 2006).

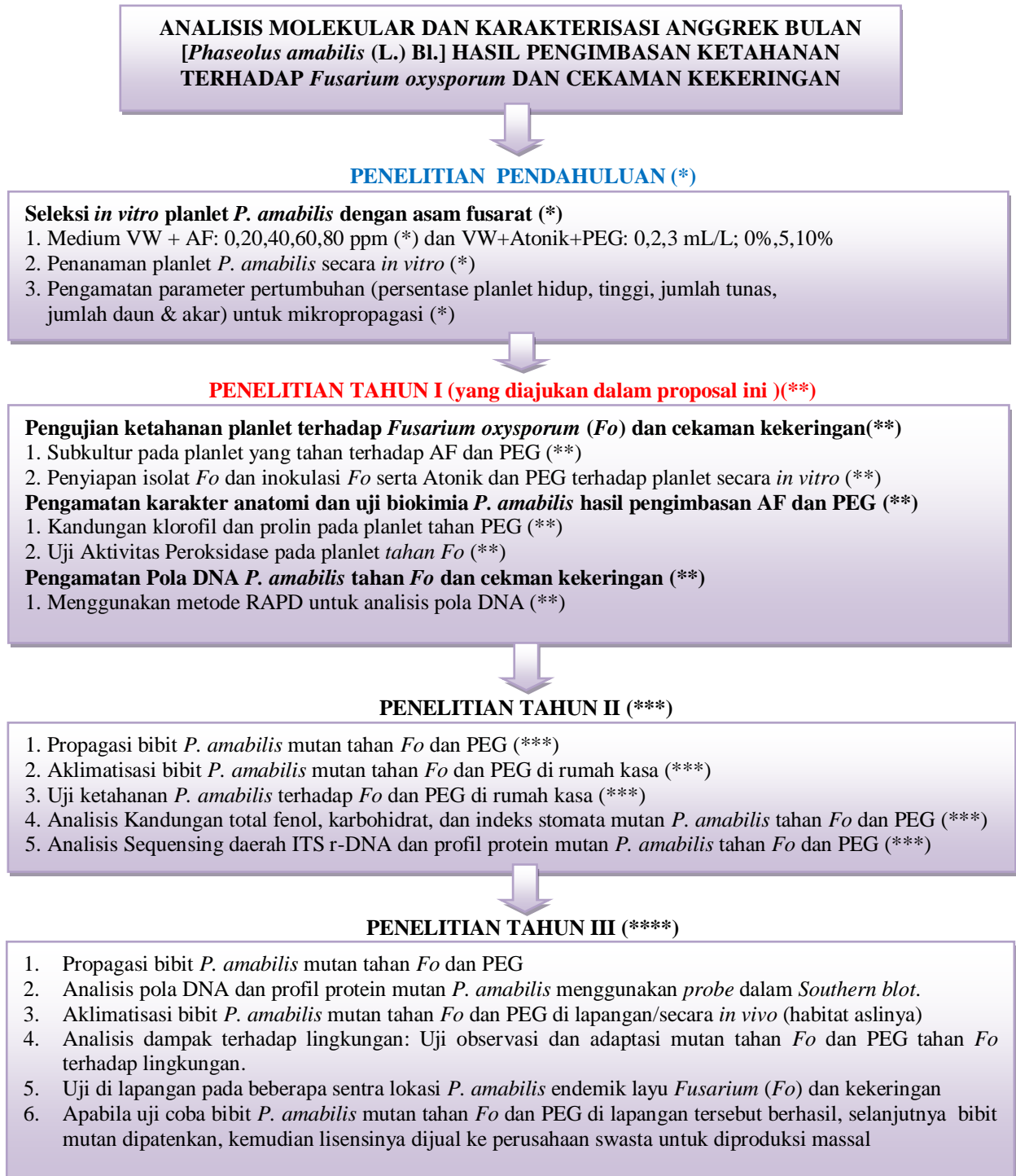
Marka molekular yang dapat dimanfaatkan dalam mengkaji ketahanan planlet *P.amabilis* terhadap *F. oxysporum* antara lain: RAPD. Prinsip kerja marka RAPD adalah berdasarkan perbedaan amplifikasi PCR pada sampel DNA dari sekuen oligonukleotida pendek yang secara genetik merupakan kelompok marka dominan (Williams *et al.* 1990; Welsh & McClelland, 1990). Keunggulan dari teknik analisis menggunakan marka RAPD antara lain adalah (1) kuantitas DNA yang dibutuhkan sedikit, (2) hemat biaya, (3) mudah dipelajari, dan (4) primer yang diperlukan sudah banyak dikomersialisasikan sehingga mudah diperoleh (Bardakci, 2001; Semagn *et al.*, 2006).

BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini akan dilakukan mulai bulan **Maret 2019** sampai dengan bulan **Oktober 2019** di Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM; UPT Laboratoium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung. Bahan penelitian berupa planlet angrek

bulan [*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.] yang dimbas asam fusarat. Roadmap riset disajikan pada Gambar 2.

A. Roadmap riset



Gambar 4. Roadmap Riset

Keterangan:

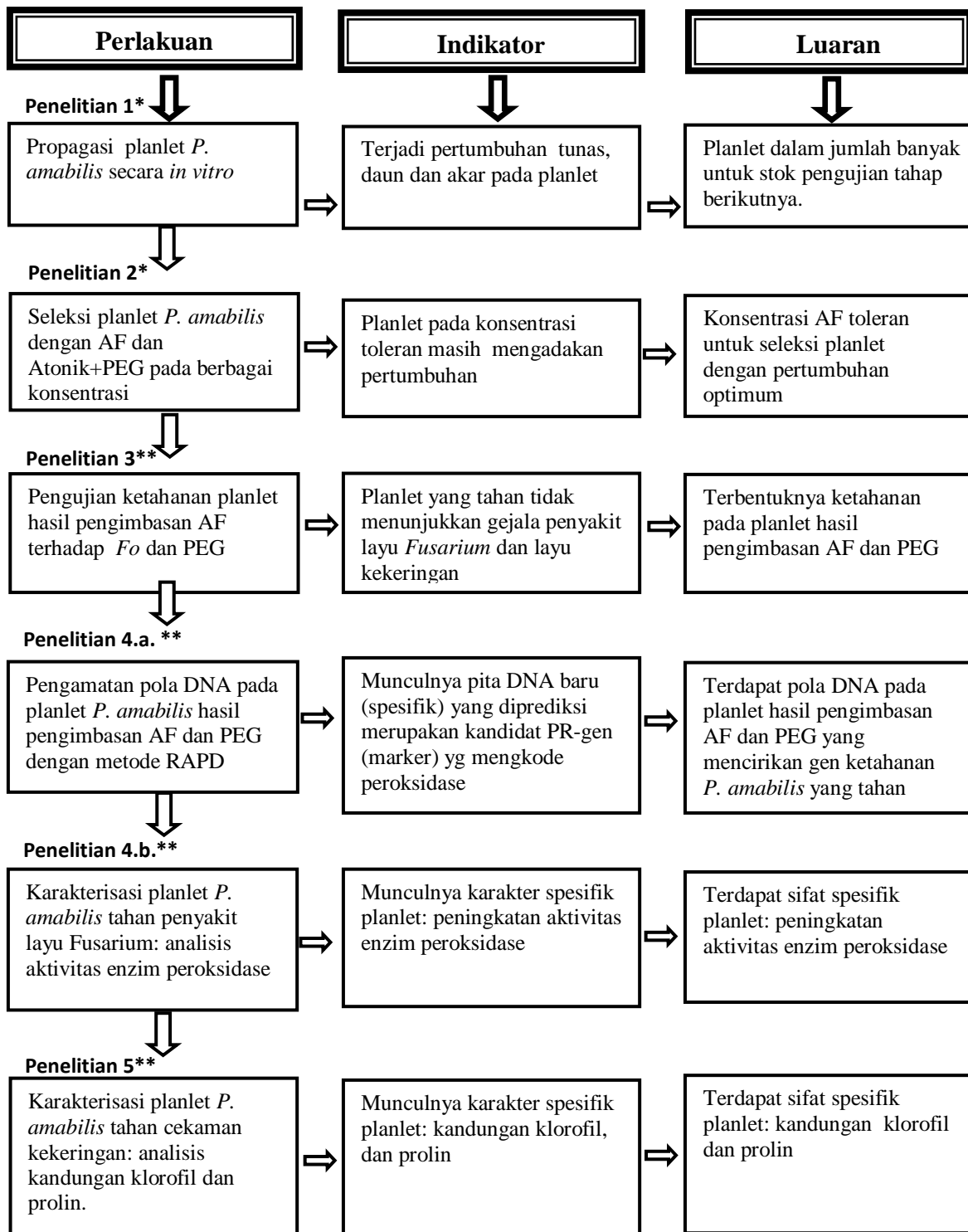
(*) : Penelitian Pendahuluan yang sudah dilakukan

(**) : Penelitian Tahun I (akan dilakukan dalam Proposal PPS 2019)

(***) : Penelitian Tahun II

(****) : Penelitian Tahun III

Tahapan penelitian pada **proposal penelitian ini** (Tahun I) disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam **Gambar 3**.



Gambar 3. Bagan alir tahapan penelitian *P. amabilis* tahan penyakit layu *Fusarium* dan cekaman kekeringan

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari **tahap kegiatan yang diusulkan dalam proposal ini** (Tahun I).

1. Pengujian ketahanan planlet *P. amabilis* terhadap *F. oxysporum*

Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fo* dilakukan secara langsung pada planlet dalam botol kultur. Mikrokonidium jamur *Fo* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL ditetaskan pada planlet 1-2 tetes. Kemudian diinkubasikan pada suhu kamar (25 °C) selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

2. Pola DNA planlet *P. amabilis*

Isolasi DNA dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511 (Daryono & Natsuaki, 2002). Untuk analisis PCR, disiapkan DNA *template* yang telah dilarutkan dalam TE, *ice box*, dan primer yang digunakan (**Tabel 1**). Kemudian dibuat premix PCR dengan komposisi: kit KAPPA2G *Fast ReadyMix* sebanyak 12,5 µL, primer 2,5 µL pada konsentrasi 100 µM, DNA *template* 1,0 µL pada konsentrasi 40 ng/µL, dan dH₂O sebanyak 9,0 µL, sehingga volume totalnya adalah 25,00 µL.

Tabel 1 . Primer RAPD

No	Primer	Urutan Nukleotida (5'—3')	Referensi
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	Nurchayani <i>et al.</i> , 2016a, 2016b
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	Nurchayani <i>et al.</i> , 2016a, 2016b

Selanjutnya premix di amplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Kemudian dilakukan elektroforesis. Selanjutnya di *running* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Visualisasi hasil *running* elektroforesis pada gel dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator dan difoto sebagai dokumentasi.

3. Aktivitas enzim peroksidase

Aktivitas enzim peroksidase dianalisis dengan metode dari Saravanan *et al.* (2004). Dibuat campuran 1,5 mL 0,05 M pirogalol, 0,5 ml ekstrak enzim dari daun planlet *P. amabilis*, dan 0,5 mL 1% H₂O₂ . Campuran diendapkan dalam suhu kamar dan dimasukkan ke dalam kuvet berukuran 0,5 mL. Spektrofotometer (*Beckman DU-65*) diatur dengan panjang gelombang 420 nm dan dibaca dari nol. Pada tahap awal ditambahkan 100 µL 1% H₂O₂ pada kuvet yang sudah terisi campuran sampel dan dibaca. Aktivitas enzim dihitung dalam U/mg/min. Satu unit adalah

aktivitas berubahnya OD 420 nm pada spektrofotometer per menit.

4. Analisis Prolin

Kadar prolin dihitung dengan cara membuat larutan standar prolin terlebih dahulu yaitu 0,003 gram prolin standar dilarutkan dalam 10 ml asam sulfosalisilat 3 % dan diencerkan. Pengenceran dimaksudkan untuk mendapatkan variasi konsentrasi prolin. Selanjutnya larutan direaksikan dengan asam ninhydrin dan asam asetat glasial, kemudian OD larutan dibaca pada panjang gelombang 520 nm.

Hasil absorbansi larutan standar dibuat persamaan regresi linier sehingga diperoleh persamaan: $Y = ax + b$. Nilai absorbansi sample selanjutnya dimasukkan sebagai nilai Y sehingga didapatkan nilai x (μ /mol).

$$\begin{aligned} \text{Kadar prolin} &= (\mu/\text{mol prolin/ ml toluene})/ 115,13 \mu/\text{mol} \\ &\quad \frac{\text{gram sample/5)}{\text{gram sample/5)}} \\ &= \mu \text{ mol prolin/ gram berat segar sample} \end{aligned}$$

(Bates, 1973 dalam Azhari *et al*, 2017).

5. Analisis Klorofil

Bahan untuk analisis klorofil menggunakan daun planlet *P. amabilis* yang sudah diimbas dengan PEG 6000. Analisis klorofil dengan menggunakan metode Harbourne (1987) dengan spektrofotometer. Larutan sampel dan larutan standar (aseton 80%) di ambil sebanyak 1 mL, kemudian dimasukkan dalam kuvet. Setelah itu dilakukan pembacaan serapan dengan spektrofotometer UV pada panjang gelombang (λ) 646 nm dan 663 nm, dengan ulangan tiap sampel sebanyak 3 kali. Kadar klorofil dihitung dengan menggunakan rumus: Klorofil total = $17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663}$ mg/L; Klorofil a= $12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646}$ mg/L; Klorofil b= $20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663}$ mg/L.

Analisis data

Data yang diperoleh dari pertumbuhan planlet *P. amabilis* selama seleksi dengan AF dan PEG berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan di dukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan ulangan 5 eksplan per perlakuan.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) pada taraf kepercayaan 95% (Gomes & Gomes, 1984).

KEMAJUAN STUDI MAHASISWA PASCASARJANA YANG TERLIBAT:

Mahasiswa Pascasarjana Biologi FMIPA Unila yang terlibat ada 2 orang mahasiswa yaitu:

1. Asma Palupi NPM: 1727021011; Masuk Smt Genap 2017/2018
2. Sholekhah NPM: 1827021002; Masuk Smt Ganjil 2018/2019

Kedua mahasiswa tersebut :

1. Sudah melakukan **Pengajuan Tema** Penelitian Tesis (**Lampiran 7**)
2. Sudah melaksanakan **Sidang Komisi Usul Penelitian** Tesis (**Lampiran 8**)
3. Sudah melakukan **Seminar Usul** Penelitian Tesis (**Lampiran 9**)
4. **Mahasiswa aktif** Program Studi Magister Biologi (**Lampiran 10**)
5. Sudah melakukan **Penelitian Pendahuluan (selesai)** dan dilanjutkan dengan **penelitian bulan pertama** (Maret 2019) yaitu Propagasi kandidat planlet *P. amabilis* tahan *Fo* dan PEG (Halaman 9 dan 10 dari proposal Penelitian Pascasarjana 2019 ini).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Penelitian Menggunakan Asam Fusarat

1. Seleksi Planlet *P. amabilis* dengan Asam Fusarat

Layu Fusarium adalah penyakit yang sangat penting dan secara ekonomi merugikan karena sampai saat ini belum ada pengendalian kimiawi yang efektif (Borrero *et al.*, 2004). Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Sacc.). Jamur ini merupakan pathogen tular tanah yang dapat bertahan pada waktu yang lama dalam bentuk klamidiospora meskipun tidak ada tanaman inang (Semangun, 2001). Oleh karena itu, penyakit layu Fusarium sulit untuk dikendalikan, sehingga pengendalian secara hayati sangat efisien dalam mengendalikan penyakit ini. Pengimbasan dengan menggunakan asam fusarat merupakan salah satu cara pengendalian hayati yang dilakukan untuk mengendalikan penyakit layu Fusarium.

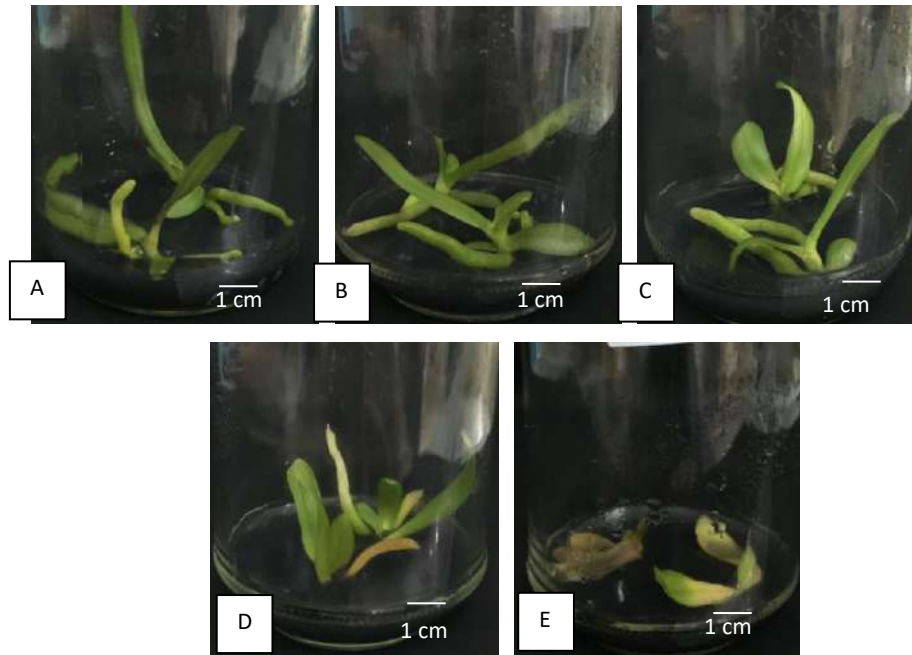
Pengamatan seleksi planlet *P. amabilis* yang ditanam pada medium VW dengan perlakuan AF pada lima taraf konsentrasi yaitu 0 ppm (kontrol), 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40

ppm disajikan pada Tabel 1. Hasil seleksi menunjukkan bahwa planlet masih mampu bertahan hidup hingga konsentrasi 30 ppm, namun pada minggu ke-4 dengan perlakuan asam fusarat 40 ppm terdapat 2 planlet yang mati.

Tabel 2. Persentase Jumlah Planlet Hidup Hasil Seleksi dengan Asam Fusarat

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm)	Persentase dan Jumlah Planlet Hidup pada Minggu Ke- (%)			
	I	II	III	IV
0 (kontrol)	100	100	100	100
10	100	100	100	100
20	100	100	100	100
30	100	100	100	100
40	100	100	100	60

Tabel 1 menunjukkan bahwa pengamatan minggu ke-1 hingga 3 pada seluruh perlakuan AF, persentase jumlah planlet *P.amabilis* hidup mencapai 100%. Planlet *P.amabilis* pada minggu ke-4 yang diberi perlakuan AF 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan kontrol tidak mengalami kematian, akan tetapi pada konsentrasi 40 ppm mengalami kematian 40% yang ditandai dengan bagian akar dan daun berwarna cokelat. Hasil seleksi planlet *P.amabilis* yang telah diimbasi dengan berbagai taraf konsentrasi AF selama 4 minggu disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Perkembangan planlet *P.amabilis* setelah 4 minggu pada berbagai konsentrasi asam fusrat. A= 0 ppm (kontrol), B= 10 ppm, C= 20 ppm, D= 30 ppm, dan E= 40 ppm.

Hasil pengamatan pada planlet *P.amabilis* terlihat adanya pengaruh dari pemberian AF yang ditanam pada medium seleksi *in vitro*. Hasil penelitian ini didukung oleh Nurcahyani (2012) menyatakan bahwa terjadi perubahan warna menjadi coklat pada planlet yang diberi konsentrasi AF tinggi, sedangkan persentase planlet hidup paling tinggi ditunjukkan pada planlet dengan konsentrasi yang lebih rendah.

Karakter morfologi planlet terlihat mengalami perubahan pada masing-masing perlakuan setelah 4 minggu pemberian AF. Perubahan pada planlet terjadi dari berwarna hijau menjadi hijau coklat dan coklat. Penelitian Lerch (1981) menjelaskan bahwa perubahan warna menjadi coklat terjadi karena aktivitas enzim oksidase yang mengandung tembaga seperti polifenol oksidase dan tirosinase, Tabiyeh *et al.* (2006) juga menyatakan bahwa perubahan warna menjadi coklat pada planlet *P.amabilis* disebabkan oleh peningkatan senyawa fenolat yang diikuti oksidasi oleh aktivitas enzim oksidase (PPO).

2. Analisis Aktivitas Enzim Peroksidase

Enzim peroksidase merupakan salah satu enzim yang berhubungan dengan proses ketahanan tanaman. Terbentuknya ketahanan akibat aktivitas enzim peroksidase ditentukan oleh kepekaan tanaman terhadap suatu penyakit. Tanaman yang terinfeksi patogen akan terjadi

perubahan fisiologi pada tanaman, dan enzim ketahanan tanaman umumnya akan aktif bereaksi (Resti *et al.*, 2016). Aktivitas enzim peroksidase sebagai mekanisme ketahanan pada planlet *P.amabilis* terhadap infeksi jamur *F. oxysporum* telah diukur dengan menggunakan metode Saravanan *et al.*, (2004). Aktivitas enzim peroksidase hasil pengimbasan asam fusarat pada planlet *P.amabilis* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Aktivitas Enzim Peroksidase Planlet *P.amabilis* Hasil Pengimbasan dengan Asam Fusarat

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm)	Aktivitas Enzim Peroksidase (u/mg/menit)
0 (kontrol)	0,061 ± 0,006566 ^c
10	0,072 ± 0,012991 ^{bc}
20	0,111 ± 0,041834 ^{bc}
30	0,147 ± 0,022659 ^{ab}
40	0,209 ± 0,025534 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95

Hasil uji BNT pada taraf 5% menunjukkan bahwa aktivitas enzim peroksidase daun planlet *P.amabilis* pada konsentrasi AF 30 ppm dan 40 ppm berbeda nyata terhadap kontrol. Aktivitas enzim peroksidase tertinggi diperoleh pada planlet *P.amabilis* dengan perlakuan AF pada konsentrasi 40 ppm. Hasil ini sejalan dengan penelitian Nurcahyani *et al.* (2012); Nurcahyani *et al.* (2014); Nurcahyani *et al.* (2017) menyatakan bahwa terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase pada planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews.) yang terimbas asam fusarat.

Aktivitas enzim peroksidase merupakan indikator respon pertahanan tanaman terhadap infeksi virus. Aktivitas enzim peroksidase memiliki nilai korelasi yang positif antara aktivitas enzim peroksidase dengan tingkat kerusakan yang di sebabkan oleh *F. oxysporum*. Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian Muslimah *et al.* (2008) menyatakan bahwa pengimbasan asam salisilat terhadap planlet pisang ketan memberikan pengaruh positif terhadap aktivitas enzim peroksidase. Aktivitas enzim peroksidase mengalami peningkatan secara optimum pada konsentrasi asam salisilat 50 ppm.

Tanaman yang terinfeksi patogen akan terjadi perubahan fisiologis pada tanaman, dan enzim pertahanan tanaman umumnya akan aktif bereaksi. Enzim peroksidase merupakan salah satu enzim yang berhubungan dengan proses ketahanan tanaman. Terbentuknya ketahanan akibat aktivitas enzim peroksidase ditentukan oleh kepekaan tanaman terhadap suatu penyakit. Ketahanan konstitutif tanaman secara struktur termasuk adanya penghambat seperti dinding sel, juga senyawa penghambat seperti senyawa fenol (Nurnberger *et al.*, 2004).

3. Analisis Kandungan Klorofil

Pengimbasan asam fusarat terhadap planlet cassava berpengaruh terhadap kandungan klorofil. Oleh karena itu, kandungan klorofil dari planlet *P.amabilis* yang telah diimbas dengan menggunakan asam fusarat diuji dengan membandingkan antara planlet tanpa perlakuan (kontrol) dan planlet yang telah diberikan perlakuan asam fusarat dengan berbagai konsentrasi, yaitu 0 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40 ppm. Metode analisis kandungan klorofil yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode Harboune (1987) dengan spektrofotometer. Adapun hasil dari uji kandungan klorofil pada planlet *P.amabilis* yang telah diberi perlakuan dengan asam fusarat dengan berbagai konsentrasi disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kandungan Klorofil Daun Planlet *P.amabilis* Hasil Pengimbasan dengan Asam Fusarat

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm)	Kandungan Klorofil a (mg/g jaringan)	Kandungan Klorofil b (mg/g jaringan)	Kandungan Klorofil Total (mg/g jaringan)
0 (kontrol)	0,075 ± 0,020995 ^c	0,094 ± 0,017052 ^c	0,169 ± 0,024664 ^c
10	0,247 ± 0,010088 ^b	0,110 ± 0,013317 ^{bc}	0,357 ± 0,019368 ^b
20	0,273 ± 0,040126 ^{ab}	0,144 ± 0,009000 ^{ab}	0,417 ± 0,048147 ^{ab}
30	0,311 ± 0,011921 ^{ab}	0,143 ± 0,013043 ^{ab}	0,453 ± 0,024009 ^a
40	0,333 ± 0,018083 ^a	0,170 ± 0,002404 ^a	0,503 ± 0,019667 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%

Hasil uji BNT pada taraf 5% menunjukkan bahwa kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total daun planlet *P. amabilis* pada konsentrasi AF 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm, dan 40

ppm berbeda nyata terhadap kontrol. Hasil analisis kandungan klorofil pada penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Andari dan Nurcahyani (2018) dan Isharnani, *et al.* (2015) menunjukkan terjadinya peningkatan kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total planlet *Spathoglottis plicata* seiring peningkatan konsentrasi asam fusarat.

Secara teori tanaman yang sehat akan terus memproduksi klorofil seiring bertambahnya umur tanaman, namun dikarenakan beberapa faktor keberadaan klorofil akan menurun. Ketika semua faktor lingkungan berada di kondisi yang sesuai maka keberadaan klorofil akan sangat tinggi pada suatu tanaman. Ketika keberadaan klorofil pada suatu tanaman rendah, maka dapat dijelaskan bahwa keberadaan patogen atau organisme pengganggu tanaman yang mengganggu fisiologi tanaman. Kenaikan atau penurunan nilai kandungan klorofil dapat menunjukkan tingkat ketahanan suatu varietas dari penyakit bulai pada jagung (Agustamia *et al.*, 2016).

B. Analisis Planlet *P. amabilis* dalam keadaan cekaman kekeringan

a. Jumlah planlet hidup dan visualisasi planlet *P. Amabilis*

Visualisasi planlet *P. amabilis* yang telah diinduksi larutan atonik dengan masing-masing konsentrasi 0 mL/L, 2 mL/L, 3 mL/L, kemudian ditanam pada medium *Vacin and Went* (VW) yang telah diberi PEG 6000 dengan berbagai konsentrasi yang berbeda, yaitu 0%, 5% dan 10%, menunjukkan adanya perubahan warna pada planlet. Visualisasi planlet *P. amabilis* diamati mulai dari minggu pertama hingga minggu ketiga. Hasil persentase visualisasi planlet *P. amabilis* disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Jumlah planlet hidup hasil seleksi pada kombinasi perlakuan konsentrasi atonik dan PEG 6000

No	Kombinasi perlakuan		Persentase jumlah planlet hidup pada minggu (%)		
	Konsentrasi PEG %	Konsentrasi atonik (mL/L)	I	II	III
1	0	0	100	100	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
2	5	0	100	100	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
3	10	0	100	100	80
		2	100	100	100
		3	100	100	100

Tabel 5. Menunjukkan bahwa pada minggu ketiga terjadi penurunan persentase jumlah planlet yang hidup pada kombinasi perlakuan larutan atonik 0 mL/L dan PEG 6000 dengan konsentrasi 10%, hal ini menunjukkan bahwa kombinasi perlakuan tersebut lebih selektif dibanding dengan kombinasi perlakuan lainnya. Persentase visualisasi planlet *P. amabilis* hasil seleksi dengan larutan atonik dan PEG 6000 pada beberapa konsentrasi disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Persentase dan visualisasi planlet hasil seleksi pada kombinasi perlakuan konsentrasi PEG dan atonik

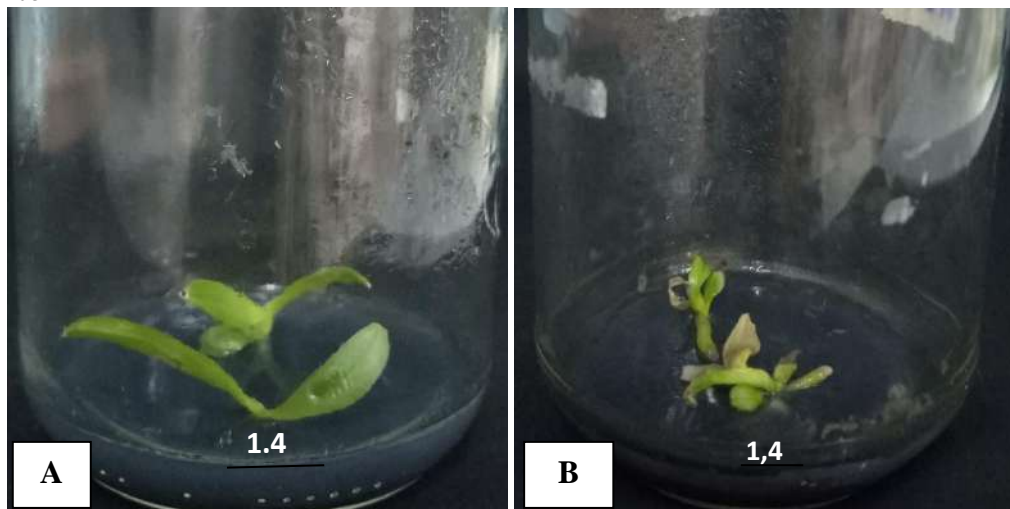
Kombinasi Perlakuan		Persentase jumlah planlet pada minggu (%)		
Konsentrasi PEG %	Konsentrasi Atonik (mL/L)	I	II	III
0	0	H : 100	H : 100	H : 80 HC : 20
	2	H : 100	H : 100	H : 60 HC : 40
	3	H : 100	H : 70 HC : 30	H : 60 HC : 40
5	0	H : 100	H : 80 HC : 20	H : 30 HC : 70
	2	H : 100	H : 50 HC : 50	H : 40 HC : 60
	3	H : 100	H : 100	H : 30 HC : 70
10	0	H : 100	H : 50 HC : 50	H : 40 HC : 40 C : 20
	2	H : 100	H : 70 HC : 30	H : 20 HC : 80
	3	H : 100	H : 70 HC : 30	H : 50 HC : 50

Keterangan: H = Hijau ; HC = Hijau Cokelat ; C = Cokelat

Tabel 2. Pada minggu ke-2 sampai minggu ke-3 terlihat adanya penurunan persentase visualisasi planlet *P. amabilis* yang terjadi pada beberapa kombinasi konsentrasi. Pada kombinasi perlakuan larutan atonik 0 mL/L dan PEG 6000 dengan konsentrasi 10% terlihat visualisasi planlet berwarna kecoklatan sebesar 20%. Kekurangan air akan mengganggu banyak fungsi seluler dalam tanaman dan berdampak negatif terhadap pertumbuhan dan reproduksi tanaman (Bray, 2001). Dampak yang ditimbulkan oleh

kekeringan adalah berkurangnya perakaran, perubahan sifat daun (bentuk, lapisan epikutikula, warna), dan umur tanaman lebih panjang (Blum, 2002). Tanaman padi kultivar Serayu dan IR 64 mulai mengalami kekurangan air pada larutan PEG dengan PA -0,5 MPa dengan ciri-ciri daun yang kering, menggulung dan batang yang berwarna kecokelatan (Banyo dkk., 2013). Visualisasi planlet anggrek bulan disajikan pada **Gambar 1**.

Gambar 5. Visualisasi Planlet Hasil Seleksi Kombinasi Perlakuan Konsentrasi PEG dan Larutan Atonik



A: Visualisasi planlet anggrek bulan tanpa larutan atonik dan PEG

B: Visualisasi planlet anggrek bulan, larutan atonik 0 mL/L dan PEG 10%

a. Klorofil

Analisis ini dilakukan untuk mengetahui kandungan klorofil yang terdapat pada planlet *P. amabilis* hasil seleksi larutan atonik dalam keadaan cekaman kekeringan menggunakan PEG 6000 dengan berbagai konsentrasi. Metode analisis kandungan klorofil yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode Miazek (2002) dengan spektrofotometer. Hasil dari uji kandungan klorofil pada planlet *P. amabilis* hasil seleksi larutan atonik dalam medium yang mengandung PEG 6000 dengan berbagai konsentrasi disajikan pada Tabel 7, 8 dan 9.

1. Klorofil a

Tabel 7. Rata-rata Kandungan Klorofil a Daun Planlet *P. amabilis* (mg/g Jaringan)

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	6,181 ± 0,20512 ^a	5,334 ± 0,36148 ^{ab}	5,562 ± 0,24888 ^{ab}
5%	5,006 ± 0,46501 ^{ab}	5,489 ± 0,87814 ^{ab}	4,685 ± 0,55200 ^{ab}
10%	4,00 ± 1,43558 ^b	4,439 ± 0,34437 ^{ab}	4,768 ± 0,76498 ^{ab}

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

2. Klorofil b

Kandungan klorofil b planlet *P. amabilis* dalam keadaan cekaman kekeringan disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Rata-rata Kandungan Klorofil b Daun Planlet *P. amabilis* (mg/g Jaringan)

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	5,173 ± 0,26273 ^a	4,884 ± 0,357524 ^a	5,525 ± 0,233789 ^a
5%	5,384 ± 0,366691 ^a	4,980 ± 0,563812 ^a	5,990 ± 0,165426 ^a
10%	4,48 ± 1,645668 ^a	5,057 ± 0,407227 ^a	5,411 ± 0,722909 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

3. Klorofil total

Kandungan klorofil total planlet *P. amabilis* dalam keadaan cekaman kekeringan disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Rata-rata Kandungan Klorofil Total Daun Planlet *P. amabilis* (mg/g Jaringan)

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	4,240 ± 0,214989 ^a	4,008 ± 0,295311 ^a	4,537 ± 0,192001 ^a
5%	4,420 ± 0,300966 ^a	3,67 ± 1,348972 ^a	4,920 ± 0,136074 ^a
10%	4,087 ± 0,465012 ^a	4,151 ± 0,335278 ^a	4,443 ± 0,595402 ^a

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

Klorofil merupakan zat hijau daun yang diperlukan dalam proses fotosintesis. Fotosintesis merupakan proses metabolisme mendasar tanaman untuk dapat

beradaptasi pada kondisi tercekam (Liu *et al.*, 2007). Berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 7, 8, dan 9. dapat diketahui bahwa terdapat penurunan kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total dari planlet *P. amabilis* bahwa pada kombinasi konsentrasi larutan atonik 0 mL/L pada medium PEG 6000 dengan konsentrasi 10% yang digunakan, kandungan klorofil a, klorofil b, dan klorofil total lebih rendah dibandingkan dengan kombinasi perlakuan lainnya. Kandungan klorofil yang lebih rendah sebagai respon tumbuhan untuk mempertahankan hidupnya dalam kondisi cekaman kekeringan. Penurunan kandungan klorofil disebabkan karena pertumbuhan pada tanaman dipengaruhi oleh air. Kekurangan air dapat menyebabkan respon fisiologis yaitu penurunan konsentrasi klorofil daun yang disebabkan oleh terhambatnya pembentukan klorofil, dan penyerapan unsur hara yang terhambat terutama nitrogen dan magnesium yang berperan penting dalam sintesis klorofil (Song, 2011). Salah satu respons fisiologis tanaman terhadap kekurangan air adalah penurunan konsentrasi klorofil daun yang dapat disebabkan oleh pembentukan klorofil dihambat, penurunan enzim rubisco, dan terhambatnya penyerapan unsur hara, terutama nitrogen dan magnesium yang berperan penting dalam sintesis klorofil (Ai dan Banyo, 2011). Penelitian sebelumnya bahwa kekeringan selama 7 hari menurunkan kandungan klorofil total daun jahe (Ai dan Banyo 2011). Hal ini membuktikan cekaman kekeringan dari tingkat paling ringan sampai paling berat mempengaruhi proses-proses biokimia yang berlangsung dalam sel. Salah satu aspek fotosintesis yang sangat sensitif terhadap cekaman kekeringan, termasuk cekaman tingkat ringan, ialah biosintesis klorofil (Fitter dan Hay, 1994).

b. Analisis Karbohidrat

Kandungan karbohidrat terlarut membantu tumbuhan dalam mempertahankan kehidupan pada kondisi cekaman sehingga karbohidrat digunakan sebagai salah satu parameter untuk menunjukkan ketahanan planlet anggrek bulan dalam kondisi cekaman kekeringan. Kandungan karbohidrat terlarut total pada planlet *P. amabilis* yang telah diberikan perlakuan dengan menggunakan PEG 6000 pada medium VW, dengan 3 taraf konsentrasi, yaitu 0%, 5%, dan 10% disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Rata-rata Kandungan Karbohidrat Terlarut Total Planlet *P. amabilis* (mg/g Jaringan)

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	0,023 ± 0,00012 ^b	0,023 ± 0,00012 ^b	0,024 ± 0,00017 ^b
5%	0,023 ± 0,00036 ^b	0,023 ± 0,00017 ^b	0,024 ± 0,00047 ^b
10%	0,026 ± 0,00009 ^a	0,023 ± 0,00018 ^b	0,024 ± 0,00049 ^b

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

Kandungan karbohidrat terlarut total tertinggi pada kombinasi perlakuan larutan atonik 0 mL/L dan PEG 6000 dengan konsentrasi 10%. Karbohidrat merupakan senyawa yang dapat dijadikan sebagai indikator tanaman tahan terhadap cekaman kekeringan. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Oktafani dkk. (2017) menunjukkan bahwa garut adalah tanaman tahan-kering sebesar 25%, menghasilkan pertumbuhan dan hasil yang baik ditunjukkan dengan bobot umbi (551,67g).

c. Prolin

Peningkatan kandungan prolin merupakan salah satu upaya ketahanan terhadap cekaman kekeringan. Kandungan prolin pada planlet anggrek bulan dalam kondisi cekaman kekeringan disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Rata-rata Kandungan Prolin Planlet *P. amabilis* (mg/g Jaringan)

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	0,470 ± 0,0039227 ^{ab}	0,320 ± 0,029512 ^b	0,347 ± 0,032585 ^{ab}
5%	0,335 ± 0,013327 ^b	0,370 ± 0,055258 ^{ab}	0,418 ± 0,108744 ^{ab}
10%	0,851 ± 0,456677 ^a	0,802 ± 0,080758 ^{ab}	0,656 ± 0,161662 ^{ab}

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa kandungan prolin tertinggi pada kombinasi perlakuan larutan atonik 0 mL/L dan PEG 6000 dengan konsentrasi 10%. Kandungan prolin yang tinggi sebagai indikator tanaman dalam beradaptasi terhadap kondisi

cekaman kekeringan. Penelitian sebelumnya bahwa akumulasi kadar prolin pada tanaman nilam yang disiram dalam interval waktu 9 hari sekali memiliki kadar prolin yang tinggi dibandingkan dengan tanaman nilam yang disiram dalam interval waktu 1, 3, dan 6 hari sekali (Setiawan *et al.*, 2013). Peningkatkan akumulasi prolin di daun untuk menjaga keseimbangan potensial osmotik pada tanaman. Hal ini merupakan respon fisiologi yang cukup penting pada tanaman untuk mempertahankan tekanan turgor dengan menurunkan potensial osmotik sebagai mekanisme toleransi terhadap cekaman kekeringan (Hamim *et al.*, 1996).

d. Indeks stomata

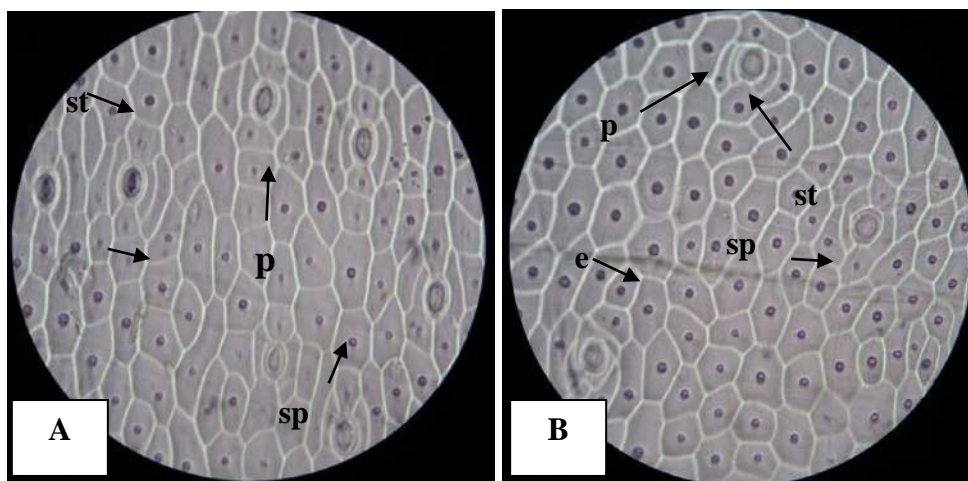
Stomata merupakan lubang kecil yang berbentuk lonjong. Stomata terdiri atas sel penjaga dan sel penutup yang dikelilingi oleh beberapa sel tetangga (Fahn, 1991). Indeks stomata daun planlet anggrek bulan dalam kondisi cekaman kekeringan disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Rata-rata Indeks Stomata Planlet *P. amabilis*

PEG	ATONIK		
	0 mL/L	2 mL/L	3 mL/L
0%	6,416± 0,182693 ^a	4,20± 1,32480 ^{bc}	4,089±0,120712 ^{bc}
5%	4,503±0,620136 ^{ab}	3,989±0,541377 ^{bc}	4,572±0,572001 ^{ab}
10%	2,305± 0,373405 ^c	2,881±0,947935 ^{bc}	2,717±0,430421 ^{bc}

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang sama, tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95%.

Air memiliki peran yang besar dalam menentukan membuka dan menutupnya stomata pada daun, sehingga tingkat ketersediaan air yang cukup akan sangat mempengaruhi jumlah asimilat atau fotosintat (Jafar *et al.*, 2013). Tanaman merespon kekurangan air dengan mengurangi laju transpirasi untuk penghematan air.



A: Permukaan bawah daun planlet *P.amabilis* tanpa PEG 6000 dan larutan atonik
 B: Permukaan bawah daun planlet *P.amabilis* pada PEG 6000 10% dan larutan atonik 0 mL/L
 Gambar 2. e = epidermis, st = sel tetangga, p = porus, dan sp = sel penutup

C. Pola DNA planlet *P. amabilis*

Dalam tahap ini telah berhasil diisolasi total genom DNA daun planlet *P. amabilis* hasil pengimbasan AF pada konsentrasi 10, 20, 30, 40 ppm dan tidak diimbas dengan AF (kontrol) untuk sejumlah sampel acak, dengan menggunakan kit *Nucleon Phytopure* RPN-8511. Analisis DNA pada planlet *P. amabilis* didahului dengan mengukur kualitas dan kuantitas DNA planlet *P. amabilis*.

a. Analisis pita RAPD

Berdasarkan hasil amplifikasi *sequence* DNA dengan menggunakan 2 primer pada 5 sampel planlet *P. amabilis* kontrol dan diimbas AF (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) menghasilkan total 16 pita DNA. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD dari 5 sampel planlet *P. amabilis* tersebut disajikan pada Tabel 13.

Tabel 13. Jumlah pita hasil amplifikasi PCR-RAPD pada planlet *P. amabilis* kontrol dan diimbas asam fusarat (10, 20, 30, dan 40 ppm)

No	Primer	Urutan Basa Nukleotida (5'-3')	Jumlah Pita RAPD	Jumlah Pita Polimorfik	Jumlah Pita Monomorfik	Ukuran Pita RAPD (bp)
1	OPB_14	TCC GCT CTG G	03	01	02	200 – 1500
2	OPB_20	GGA CCC TTA C	05	01	04	150 – 1300
Total			08	02	06	150 – 1500

Keterangan: bp: base pair, Pita= band= fragmen

Tabel 13 menunjukkan bahwa secara keseluruhan, amplifikasi 2 primer (OPB_14 dan OPB_20) menghasilkan jumlah pita DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 10 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 150 bp sampai 1300 bp.

Hasil penelitian pada planlet kontrol dan yang diimbasi AF, dengan menggunakan 2 primer, menghasilkan jumlah pita DNA sebesar 7 (OPB_20), dan 10 (OPB_14) per primer pada ukuran pita DNA antara 150 bp sampai 1300 bp.

Elektroforesis hasil amplifikasi PCR-RAPD dengan 2 primer tersebut menghasilkan 4 pola pita DNA. Pola pita DNA planlet *P. amabilis* yang tidak diimbasi (kontrol) maupun diimbasi AF (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) pada masing-masing primer disajikan pada Tabel 14 dan 15.

1. Primer OPB_14

Primer OPB_14 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji pada Tabel 6. Pada Tabel 6 menunjukkan bahwa pita DNA ukuran 200, 300, 400, dan 900 bp terbentuk pada semua sampel, baik pada planlet *P. amabilis* kontrol maupun yang diimbasi AF. Pada planlet *P. amabilis* yang diimbasi AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1500 bp.

Tabel 14. Pola pita DNA planlet *P. amabilis* kontrol dan diimbasi asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_14

Pola pita DNA-1		Pola pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
S₀U₃	200	S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃, S₄U₂	200
	300		300
	400		400
	900		900
			1500*

Keterangan: Pola pita DNA-1: **S₀U₃** (kontrol) menghasilkan 4 pita yang identik; Pola pita DNA-2: **S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃, S₄U₂** menghasilkan 5 pita yang identik, dan 4 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

2. Primer OPB_20

Primer OPB_20 menghasilkan dua pola pita DNA seperti tersaji dalam Tabel 15.

Tabel 15. Pola pita DNA planlet *P. amabilis* kontrol dan diimbab asam fusarat (konsentrasi 10, 20, 30, dan 40 ppm) dengan primer OPB_20

Pola Pita DNA-1		Pola Pita DNA-2	
Sampel	Ukuran DNA (bp)	Sampel	Ukuran DNA (bp)
	150		150
	250	S₁U₁	250
S₀U₃	350	S₂U₂	350
	400	S₃U₃	400
	500	S₄U₂	500
	900		900
			1300*

Keterangan: Pola pita DNA-1: **S₀U₃** (kontrol) menghasilkan 6 pita yang identik; Pola pita DNA-2: **S₁U₁, S₂U₂, S₃U₃, S₄U₂** menghasilkan 7 pita yang identik, dan 6 diantaranya sama dengan kontrol, serta 1 pita baru/spesifik (*)

Pada Tabel 7 menunjukkan pita DNA ukuran 150, 250, 350, 400, 500, dan 900 bp terbentuk pada semua sampel baik pada kontrol maupun yang diimbab AF. Pada planlet *P. amabilis* yang diimbab AF terdapat pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 1300 bp..

Hasil amplifikasi DNA planlet *P. amabilis* dengan menggunakan primer OPB_14 dan OPB_20, menunjukkan bahwa pola pita DNA planlet *P. amabilis* yang kontrol berbeda dengan pola pita DNA planlet *P. amabilis* yang diimbab AF. Planlet *P. amabilis* yang diimbab AF baik konsentrasi 10, 20, 30 maupun 40 ppm menghasilkan 1 pita DNA yang berbeda ukurannya dengan planlet *P. amabilis* kontrol, yaitu pita DNA berukuran 1500 bp (OPB_14) dan 1300 bp (OPB_20), sehingga pita DNA ini dapat dijadikan sebagai pembeda antara planlet *P. amabilis* kontrol dan planlet *P. amabilis* yang diimbab AF. Pita DNA ini dinamakan sebagai **penanda RAPD OPB_14₁₅₀₀ dan RAPD OPB_20₁₃₀₀**.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian Esmail *et al.* (2012), mengemukakan bahwa penanda RAPD dapat digunakan untuk membedakan planlet Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) yang tahan terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* dan planlet yang sensitif terhadap jamur tersebut secara *in vitro*. Karun *et al.* (2008), telah dapat membedakan planlet pinang (*Areca catechu* L.) yang tahan terhadap penyakit *Yellow Leaf Disease* (YLD) dengan planlet yang sensitif secara *in vitro*. Soliman (2012) dan Parida *et al.* (2010) menggunakan RAPD untuk mengevaluasi kestabilan genetik planlet Apricot (*Prunus armeniaca* L.) dan *Kaempferia galanga*, hasil mikropropagasi secara *in vitro* dibandingkan dengan induknya.

Berdasarkan uraian di atas, dapat dinyatakan bahwa planlet *P. amabilis* kontrol (rentan) secara genetik berbeda dengan planlet *P. amabilis* yang diimbasi AF pada konsentrasi 10, 20, 30 dan 40 ppm terhadap *Fusarium oxysporum*.

BAB 5. KESIMPULAN

1. Konsentrasi asam fusarat toleran untuk seleksi planlet *P. amabilis* adalah 40 ppm dan konsentrasi PEG 6000 yang optimum untuk pertumbuhan planlet *P. Amabilis* yaitu 10% dan atonik 0 mL/L
2. Terjadi peningkatan aktivitas enzim peroksidase, kandungan klorofil total, klorofil a, klorofil b, serta kandungan karbohidrat terlarut total I pada planlet *P. amabilis* seiring meningkatnya konsentrasi Asam Fusarat, serta hasil penelitian pada ketahanan cekaman kekeringan menunjukkan bahwa kandungan klorofil a, b, total rendah, indeks stomata menurun, karbohidrat total dan prolin tinggi.
3. Tidak ada interaksi antara larutan atonik dan PEG 6000
4. Pita DNA spesifik mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 1500 bp (OPB_14) dan 1300 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *P. amabilis* terhadap *Fusarium oxysporum*.

REFERENSI

- Adisyahputra, Reni I dan Eldina D. 2004. Karakterisasi Sifat Toleransi terhadap Cekaman Keringan Kacang Tanah (*Archis hypogea* L.) Varietas Nasional pada Tahap Perkecambahan. *Jurnal Matematika Sains Teknologi* Vol 5 No 1
- Agrawal AA, Tuzun S, & Bent E. 1999. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores, Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 390 p.
- Agustamia, C., Ani, W., dan Christanti, S. 2016. Pengaruh Stomata dan Klorofil pada Ketahanan Beberapa Varietas Jagung terhadap Penyakit Bulai. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 20(2). 89–94.
- Afa LD, Bambang S, Ahmad J, Oteng H, dan Iswari S. 2012. Pendugaan Toleransi Padi Hibrida terhadap Kekeringan dengan Polyetilene Glycol (PEG) 6000. *Jurnal Agrivigor* 11(2) :292-299 ISSN 1412-2286
- Ai, N.S. dan Banyo, Y. 2011. Konsentrasi Klorofil Daun Sebagai Indikator Kekurangan Air Pada Tanaman. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 11(2).
- Andari, G., dan Nurcahyani, E. 2018. Analisis Kandungan Klorofil Hasil Ketahanan Terimbas Fusarium Oxysporum terhadap *Spathoglottis plicata* secara In Vitro. *Musamus Journal Of Animal Livestock Science*. 1(1).
- Anonymous. 2002. Poly-Ethylene Glycols (PEGs) and the Pharmaceutical industry. [http://www.clariant.com /Polyethylene_glycols_\(PEGs\) and the_pharmaceutical_industry](http://www.clariant.com/Polyethylene_glycols_(PEGs)_and_the_pharmaceutical_industry). Diakses 30 Oktober 2014 pukul 19.00 WIB
- Azhari A, Nurcahyani E, Qudus HI, dan Zulkifli. 2018. Analisis Kandungan Prolin Planlet Jeruk Keprok Batu 55 (*Citrus reticulata* Blanco var. *crenatifolia*) Setelah Diinduksi Larutan Atonik Dalam Kondisi Cekaman Kekeringan Secara In Vitro. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry*, 3 (01). ISSN E-ISSN 2540-8267. pp. 69-78.
- Azrai M. 2005. Pemanfaatan Markah Molekular dalam Proses Seleksi Pemuliaan Tanaman. *Agro Biogen* 1 (1): 26-37.
- Banyo, Y.E., Ai, N.S., Siahaan, P., dan Tangopo, A.M. 2013. Konsentrasi Klorofil Daun Padi Pada Saat Kekurangan Air Yang Diinduksi Dengan Polietilen Glikol. *Jurnal Ilmiah Sains* Vol. 13(1).
- Bardakci F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J Biol.* 25: 185-196.
- Blum, A. 2002. Drought tolerance. Field screening for drought in crop plants with emphasis on rice. Proceeding of an International Workshop on Field Screening for Drought Tolerance in Rice. ICRISAT. India.
- Bouizgarne, B, Bouteau HEM, Frankart C, Rebutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadrami EI. 2006. Early Physiological Responses of *Arabidopsis thaliana* Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.
- Bray, E.A. 2001. Plant response to water-deficit stress. *Encyclopedia of Life Sciences*.

- Boras O, Santos R, Matos A, Cabral P, & Arzola RS. 2001. A First Attempt to Use A *Fusarium* subglutinans Culture Filtrate For The Selection of Pineapple Cultivar to Fusariose Disease. *Plant Breeding* 120(5): 345-438.
- Borrero, C., Trillas, M.I., Ordovás, J., Tello, J.C. and Avilés, M. 2004. Predictive Factors for the Suppression of *Fusarium* Wilt of Tomato in Plant Growth Medium. *Phytopathology*. 94 (10):1094-1101.
- Chung, W. C., L. W. Chen, J. H. Huang, H. C. Huang and W. H. Chung. 2011. A New 'Forma Specialis' of *Fusarium solani* Causing Leaf Yellowing of *Phalaenopsis*. *Plant Pathology*. 60: 244–252.
- Daryono BS & Natsuaki KT. 2002. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Markers for Detection of Resistance Cultivars of Melon (*Cucumis melo* L.) Against Cucurbit Viruses. *Acta Horticultural* 588: 321-329.
- Djatnika I. 2012. Seleksi Bakteri Antagonis untuk Mengendalikan Layu *Fusarium* pada Tanaman *Phalaenopsis*. *J.Hort*. 22(3):276-284
- Djaenuddin N, 2003. Bioekologi dan Pengelolaan Penyakit Layu *Fusarium*: *Fusarium oxysporum*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros. pp. 67-71.
- Fahn, A. 1991. Anatomi Tumbuhan. Edisi ke-3. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 943 p.
- Fauziah, N., Azis A.S. dan Sukma D. 2014. Karakterisasi Morfologi Anggrek *Phalaenopsis* sp. Spesies Asli Indonesia. *Agronomi Holtikultura*. 2(1): 86-94.
- Fitter, A.H. dan R.K.M. Hay. 1994. *Fisiologi Lingkungan Tanaman*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Edreva A. 2005. Pathogenesis-Related Protein: Research Progress in The Last 15 Years. *Gen. Appl. Plant Physiology* 31(1-2): 105-124.
- Gomes KA & Gomes AA. 1984. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*, Edisi ke-2. Terjemahan dari: Statistical procedures for Agricultural Researchs. Syamsudin E & Baharsyah JS. UI Press. Jakarta.
- Gunawan B dan Azhari CD. 2010. Karakterisasi Spektrofotometri dan *Scanning Electron Microcopy* (SEM) Sensor Gas dari Bahan Polimer *Poly-Etilene Glycol* (PEG). *Jurnal ISSN* :1979-6870
- Hadisutrisno B. 1995. Kajian Pengendalian Hayati Penyakit Busuk Batang Vanili dengan Isolat Lemah *Fusarium batatatis* Tucker. *Buletin Ilmiah Azolla* 21: 27-35.
- Hamim, Sopandie D, Jusuf M. 1996. Beberapa karakteristik morfologi dan fisiologi kedelai toleran dan peka terhadap cekaman kekeringan. *Hayati*.
- Harbourne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia*. Terjemahan: Padmawinata K dan Sudiro I. Penerbit ITB Bandung. pp : 259-261.
- Harahap RI, Siregar AM dan Bayu ES. 2013. Pertumbuhan Akar Pada Perkecambah Beberapa Varietas Tomat dengan Pemberian *Polyetilene Glycol* (PEG) secara *In vitro*. *Jurnal Online Agroteknologi* Vol 1 No 3.

- He CY, Hsiang T, & Wolyn DJ. 2002. Induction of Systemic Disease Resistance and Pathogen Defence Responses in *Asparagus officinalis* Inoculated with Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology* 51: 225-230.
- Hendaryono, D.P.S. 2000. *Budidaya Aggrek Dalam Botol*. Kanisius Yogyakarta.
- Isharnani, E. C., Nurcahyani, E., and Lande, M.L. 2015. Chlorophyll Content of Leaves of Planlet Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Blume.) Result of Induced Resistance of the In Vitro Fusaric Acid, *Prosiding Seminar Nasional Swasembada Pangan. Politeknik Negeri Lampung*, ISBN 978-602-70530-21, 86-92.
- Jafar, S., A. Thomas, J.I. Kalangi dan M. T. Lasut. 2013. Pengaruh Frekuensi Pemberian Air Terhadap Pertumbuhan Bibit Jabon Merah (*Anthocephalus macrophyllus* (Roxb.)). *Jurnal Agronomi*. 2(2): 1-13.
- Karti, P.D.M.H. 2004. Pengaruh Pemberian Cendawan Mikoriza Arbuskula Terhadap Pertumbuhan Dan Produksi Rumput *Setaria splendida* Stapf. Yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *ISSN 0126-0472*. Vol. 27 NO. 2 hlm. 63-68.
- Landa BB, Cachinero-Diaz JM, Lemanceu P, Jimenez-Diaz RM, & Alabouvette C, 2002. Effect of Fusaric Acid and Phytoanticipins on Growth of Rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
- Lea P. & Leegood RC. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. 364 p.
- Lerch, K. 1981. Tyrosinase Kinetics: A Semi-quantitative Model of The Mechanism of Oxidation of Monohydric and Dyhydric Phenolic Substrates. In Sigel, H. (Ed). *Metal Ions in Biology System*. 13 MerceL Dekker Inc., New York, Based. p. 143-186.
- Liu, H.Y., J.Y. Li, Y. Zhao, and K.K. Huang. 2007. *Influence of drought stress on gas exchange and water use efficiency of salix psammophila growing in five places*. *Arid. Zone. Res.* 24:815-820.
- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, & Teixeira JB. 1995. Race 1 Fusarium Wilt tolerance on banana plants selected by Fusaric Acid. *Euphytica* 84: 67-71.
- Miazek, Mgr Inz. 2002. Krystian Chlorophyll Extraction From Harvested Plant Material. Supervisor. Prof. Dr. Ha. Inz Stanislaw Ledakowicz.
- Morpurgo R, Lopato SV, Afza R, & Novak FJ. 1994. Selection parameters for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and 4 on Diploid Banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* 75: 121-129.
- Muslimah, I., Nurcahyani, E. dan Zulkifli. 2008. Aktivitas Enzim Peroksidase Daun Planlet Pisang Ketan (*Musa paradisiaca* L.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap Asam Salisilat Secara *In Vitro*. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, ISSN 1410-5020. 17(2):105-108.
- Nio SA, Tondais SM dan Butarbutar R. 2006. Evaluasi Indikator Toleransi Cekaman Kekeringan pada Fase Perkecambahan Padi (*Oryza sativa* L.). *Jurnal Ilmiah Sains* Vol 11 No 2

- Nurcahyani E**, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. Terakreditasi SK No. 110/DIKTI/Kep/2009. ISSN: 1411-7525. Vol. 12 /No. 1: 12-22
- Nurcahyani E**. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Disertasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 201 p. Tidak Dipublikasikan.
- Nurcahyani, E.**, Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Nurcahyani E.**, R. Agustrina, & T.T. Handayani. 2016a. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Science* 4(5): 102-105.
- Nurcahyani E.**, Rochmah Agustrina, Erdi Suroso, & Gardis Andari. 2016b. Analysis of Peroxidase Enzyme and Total Phenol from Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Bl) as Result of the *In Vitro* Fusaric Acid Selection Toward To *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Applied Agricultural Science* 2(6): 79-82.
- Nurcahyani E.**, Sumardi I., Hadisutrisno B., & Suharyanto E., 2017. DNA Pattern Analysis of *Vanilla planifolia* Andrews Plantlet which Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *WJPLS* 3(4): 27-34.
- Nurcahyani E, Sumardi**, Irawan B, Sari EY, Sari TL. 2019. In Vitro Study: Induced Resistance Of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Plantlet Against *Fusarium oxysporum* Based on Analysis of Phenol Content. *WJPLS*, Vol. 5, Issue 2, 195-198.
- Numberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Plater. 2004. Innate Immunity in Plant and Animal: Striking Similarities and Obvious Differences. *Inmunol.Rev.* 198: 249-266.
- Oktafani, M.B., Supriyono, Budiastuti, M.S. 2017. Hasil Garut (*Marantha Arundinaceae*) Pada Kekeringan. *Agrotech Res J.* Vol 1(2).
- Palmer GD. 2011. *The control of orchids*. Accessed 20 January 2012. http://www.ebow.com/info_8525784_control-fusarium-wilt-orchids.html.
- Park CJ, An JM, Shin YC, Kim KJ, Lee BJ, & Paek KH. 2004. Molecular Characterization of Pepper Germin-Like Protein as The Novel PR-16 Family of Pathogenesis-Related Proteins Isolated During The resistance response to Viral and Bacterial Infection. *Planta* 219(5):797-806.
- Purwanto dan Agustono T. 2010. Kajian Fisiologi Tanaman Kedelai pada Cekaman Kekeringan dan Berbagai Kepadatan Gulma Teki. *Agrobisnis* 12 (1):24-28
- Purwati, P. 2012. *Pengaruh Macam Media Dalam Keberhasilan Aklimatisasi Anggrek Phalaenopsis amabilis (Anggrek Bulan)*. Program Studi Hortikultura Jurusan Budidaya Tanaman Pangan Politeknik Negeri Lampung.

- Puspitaningtyas, D.M. dan Mursidawati.2010. *Koleksi Anggrek Kebun Raya Bogor*. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya-LIPI. Bogor.1(2).
- Rahayu ES, Edi G, Satriyas I dan Sudarsono. 2005. Poly Etilene Glikol (PEG) dalam Media *In Vitro* Menyebabkan Kondisi Cekaman yang Menghambat Tunas Kacang Tanah (*Arachis hypogea* L.). *Berk Penel Hayati* : 11 (39-48)
- Ramadiana, S., A.P. Sari, Yusnita dan D. Hapsoro. 2008. *Hibridisasi, Pengaruh Dua Jenis Media Dasar dan Pepton Terhadap Perkecambahan Biji dan Pertumbuhan Protokorm Anggrek Dendrobium Hibrida secara In Vitro*. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II Universitas Lampung.17-18 Agustus.
- Remotti PC, Löffler HJM & Loten-Doting LV. 1997. Selection of Cell Lines and Regeneration of Plants Resistance to Fusaric Acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pear'. *Euphytica* 96: 237 – 245.
- Resti, Z., Trimurti, H., Deddi, P.P. dan Nasrun. 2016. Aktivitas Enzim Peroksidase Bawang Merah yang Diintroduksi dengan Bakteri Endofit dan Tahan Terhadap Penyakit Hawar Daun Bakteri (*Xanthomonas axonopodis* Pv. *Allii*). *J. Hpt Tropika*. ISSN1411-7525 16(2): 131-137.
- Rosyalina N, **Nurcahyani E**, **Qudus HI**, Zulkifli. 2018. Pengaruh Larutan Atonik Terhadap Kandungan Karbohidrat Terlarut Total Planlet Jeruk Siam Pontianak (*Citrus Nobilis* Lour. var. *Microcarpa* Hassk.) Secara *In Vitro*. *Analit: Analytical and Environmental Chemistry* 3 (01). pp. 61-68.
- Saravanan T, Bhaskaran R, & Muthusamy M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* Wilt Disease. *Plant Pathology Journal* 3: 72-80.
- Semagn K, Bjornstad A, & Ndjiondjop MN. 2006. An Overview of Molecular Marker Methods for Plants. *African Journal of Biotechnology* 5: 2540-2568.
- Semangun, H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta: UGM Press.
- Setiawan T dan Shiddieq D. 2013. Pengaruh Cekaman Kurang Air Terhadap Beberapa Karakter Fisiologis Tanaman Nilam (*Pogostemon cablin* Benth). *Jurnal Litri* 19 (3) Hlm. 108-116 ISSN 0853-8212.
- Suryowinoto M. 1996. *Pemuliaan Tanaman secara In Vitro*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Hlm.189-190
- Soelistijono, R. 2015. Kajian Efektifitas *Rhizoctonia* SP Mikoriza Dataran Rendah dan Sedang pada Tingkat Keparahan Penyakit (Dsi) Anggrek *Phalaenopsis amabilis* terhadap *Fusarium* sp. *Biosaintifika*. ISSN 2085-191X. 7(2): 113-119.
- Song, N. 2011. Biomassa Dan Kandungan Klorofil Total Daun Jahe (*Zingiber officinale* L.) Yang Mengalami Cekaman Kekeringan. *Jurnal Ilmiah Sains* 11(1): 1-4.
- Tabiyeh, D.T., Bernard, F., and Shacker, H. 2006. Investigation of glutathione, salicylic acid and GA3 effects on browning in *Pistacia vera* shoot tips culture. *ISHS Acta Hort*. 726. 201-204.

- Toyoda H, Hayashi H, & Yamamoto K. 1984. Selection of Resistance Tomato Calli to Fusaric Acid. *Ann. Phytophatol. Soc. Japan.* 50: 538-540.
- Vidhyasekaran P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defense Mechanism.* Marcel Dekker. New York. 553 p.
- Welsh J & McClelland M. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 7213-7218.
- Wedge DE & Elmer WH. 2008. Fusarium wilt of orchids. *ICOGO Bull.* Vol. 2. No.3. pp. 161-168.
- Wibowo A. 2002. Pengendalian Penyakit Layu Fusarium pada Pisang dengan Menggunakan Isolat Nonpatogenik *Fusarium* sp. *Jurnal Fitopatologi Indonesia* 6: 65-70.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, & Tingey SV. 1990. DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers Useful as Genetic Markers. *Nucl. Acids. Res.* 18: 6531-6535.

**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PASCASARJANA**

NOMOR : 1921/UN26.21/PN/2019
TANGGAL : 26 Juni 2019

ANTARA

**PEJABAT PEMBUAT KOMITMEN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS LAMPUNG**

DAN

**Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.(Ketua)
PENANGGUNGJAWAB KEGIATAN PENELITIAN DENGAN JUDUL Analisis
Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (*Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl.)
Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap *Fusarium oxysporum* dan Cekaman
Kekeringan**

**FAKULTAS FMIPA
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2019**



**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PENELITIAN PENELITIAN PASCASARJANA
UNIVERSITAS LAMPUNG**

NOMOR :1921/UN26.21/PN/2019
TANGGAL : 26 Juni 2019

Pada hari ini **Rabu** tanggal **Dua Puluh Enam** bulan **Juni** tahun **Dua Ribu Sembilan Belas**, kami yang bertanda tangan di bawah ini :

1. Nama : Warsono, Ph. D.
Jabatan : Pejabat Pembuat Komitmen LPPM Universitas Lampung
Alamat : Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung

Selanjutnya dalam perjanjian ini disebut **PIHAK PERTAMA**

2. Nama : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
Jabatan : Penanggungjawab Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Institusi dengan Judul "*Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (Phalaenopsis amabilis (L.) Bl.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap Fusarium oxysporum dan Cekaman Kekeringan*".
Alamat : Jl. Prof. Soemantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung

Selanjutnya dalam perjanjian ini disebut **PIHAK KEDUA**

PIHAK PERTAMA DAN KEDUA berdasarkan :

1. Peraturan Presiden nomor 54 tahun 2010; tentang pengadaan barang/jasa pemerintah
2. Undang-undang RI nomor 17 tahun 2003 tentang Keuangan Negara;
3. Undang-undang nomor 20 tahun 2003 tentang Sistem Pendidikan Nasional;
4. Undang-undang nomor 15 tahun 2004 tentang Pemeriksaan Pengelolaan dan Tanggung Jawab Keuangan Negara;
5. Keppres Nomor 42 tahun 2002 jo nomor 72 tahun 2004 tentang Pelaksanaan Anggaran Pendapatan dan Belanja Negara;
6. Peraturan Menteri Keuangan Nomor 606/KMK.66/2004 tentang Pedoman Pembayaran Pelaksanaan Anggaran;
7. DIPA Universitas Lampung Nomor DIPA-042.01.2.400954/2019, tanggal 05 Desember 2018

Dengan ini menyatakan setuju dan sepakat untuk mengikat diri dalam suatu perjanjian pelaksanaan pekerjaan , dengan ketentuan dan syarat-syarat tercantum dalam pasal-pasal ini :

PASAL 1 LINGKUP PEKERJAAN

PIHAK PERTAMA memberi tugas kepada **PIHAK KEDUA** dan **PIHAK KEDUA** menerima tugas tersebut untuk melaksanakan dan mengkoordinir kegiatan Penelitian **PENELITIAN PASCASARJANA** dengan Judul "*Analisis Molekular dan Karakterisasi Anggrek Bulan (Phalaenopsis amabilis (L.) Bl.) Hasil Pengimbasan Ketahanan Terhadap Fusarium oxysporum dan Cekaman Kekeringan*

PASAL 2 BIAYA PENELITIAN

Untuk melaksanakan kegiatan Penelitian **PENELITIAN PASCASARJANA** Unila seperti dalam pasal 1 di atas, dibiayai dari Anggaran DIPA BLU Unila TA 2019 sebesar Rp 40.000.000,- (*Empat Puluh Juta Rupiah*). Mata Anggaran Kegiatan (MAK) 5742.001.002.053 C.525119 Tahun Anggaran 2019. Sudah termasuk biaya Seminar, Penerbitan Publikasi Universitas.

PASAL 3 CARA PEMBAYARAN

Pembayaran tersebut pada pasal 2 di atas dilakukan dalam 2 tahap :

1. Tahap pertama sebesar 70% dari nilai kontrak atau sebesar 70% x Rp 40.000.000,- = Rp 28.000.000,- (*Dua Puluh Delapan Juta Rupiah*) setelah penandatanganan kontrak oleh kedua belah pihak dan menyerahkan proposal yang disahkan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian masyarakat Universitas Lampung.
2. Tahap kedua (terakhir) sebesar 30% dari nilai kontrak atau sebesar 30% x Rp 40.000.000,- = Rp 12.000.000,- (*Dua Belas Juta Rupiah*) setelah pekerjaan dinyatakan selesai dan dinyatakan dalam berita acara penyerahan pekerjaan dan menyerahkan laporan hasil kegiatan Penelitian dan Publikasi.
3. Menyerahkan laporan sebagaimana berikut :
 - a. Laporan Penelitian
 - b. Selesainya mahasiswa program pascasarjana yang terlibat dalam tim hibah penelitian yang dibuktikan dengan selesainya tesis mahasiswa (minimal draft tesis yang sudah disetujui oleh komisi pembimbing)
 - c. Satu artikel ilmiah (minimal disubmit ke jurnal nasional terakreditasi atau jurnal internasional terindeks)
 - d. HKI dan/atau buku ajar.

Pembayaran dilakukan melalui kas Badan Layanan Umum (BLU) Universitas Lampung pada pihak kedua ke nomor rekening : **Bank BNI Tanjung Karang** atas nama : **Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.** Penanggungjawab kegiatan penelitian **PENELITIAN PASCASARJANA** Universitas Lampung.

PASAL 4 JANGKA WAKTU PELAKSANAAN

1. Jangka waktu pelaksanaan kegiatan Penelitian **PENELITIAN PASCASARJANA** Universitas Lampung tersebut dalam pasal 1 adalah 133 (Seratus Tiga Puluh Tiga) terhitung sejak ditandatanganinya perjanjian ini. Laporan ini harus diserahkan **PIHAK**

KEDUA selambat-lambatnya tanggal 4 November 2019 sebanyak (3) Tiga Eksemplar.

2. Apabila laporan Penelitian tidak diselesaikan tepat pada waktunya, PIHAK KEDUA dapat mengajukan Adendum sebanyak 1 kali saja, dan apabila PIHAK KEDUA berhenti/diberhentikan dari jabatan atau dipindahkan ke instansi lain, PIHAK KEDUA wajib mempertanggungjawabkan penggunaan dana penelitian yang telah diterima dari PIHAK PERTAMA, selanjutnya PIHAK PERTAMA berhak menunjuk orang lain untuk melaksanakan pekerjaan tersebut.

PASAL 5 SANKSI

1. Jika PIHAK KEDUA tidak dapat melaksanakan pekerjaan sesuai dengan batas Waktu pelaksanaan yang tercantum dalam pasal 4 dalam perjanjian ini maka untuk tiap hari keterlambatan PIHAK KEDUA wajib membayar denda keterlambatan sebesar 1/1000 (satu permil) dari nilai kontrak.
2. PIHAK KEDUA bertanggung jawab penuh apabila dalam pelaksanaan pekerjaan ini tidak sesuai dengan ketentuan yang berlaku, atau terdapat hal – hal atau temuan pemeriksaan yang mengakibatkan kerugian negara.

PASAL 6 PENYELESAIAN PERSELISIHAN

1. Jika terjadi perselisihan antara kedua belah pihak, pada dasarnya akan diselesaikan secara musyawarah.
2. Jika perselisihan itu tidak dapat diselesaikan secara musyawarah, maka akan diselesaikan oleh "panitia pendamai" yang berfungsi sebagai juri/wasit yang dibentuk dan diangkat oleh kedua belah pihak yang terdiri dari:
 - Seorang wakil dari PIHAK PERTAMA sebagai anggota
 - Seorang wakil dari PIHAK KEDUA sebagai anggota
 - Seorang pihak ketiga yang ahli sebagai Ketua, yang telah disetujui oleh PIHAK KEDUA
3. Keputusan panitia pendamai ini mengikat kedua belah pihak, dan biaya penyelesaian perselisihan yang dikeluarkan akan ditanggung secara bersama.
4. Jika keputusan ini sebagaimana dimaksud ayat 3 pasal ini tidak dapat diterima oleh salah satu pihak, maka penyelesaian perselisihan akan diteruskan melalui pengadilan Negeri.

PASAL 7 LAIN-LAIN

1. Segala sesuatu yang belum diatur dalam surat perjanjian ini yang dipandang perlu oleh kedua belah pihak akan diatur lebih lanjut dalam surat perjanjian tambahan (*Addendum*) dan merupakan perjanjian yang tidak dapat terpisahkan dari perjanjian ini.
2. Surat perjanjian ini dibuat rangkap 2 (dua) untuk Pihak Pertama dan Pihak Kedua, selebihnya diberikan kepada pihak-pihak yang berkepentingan dan ada hubungannya dengan pekerjaan.

**PASAL 8
PENUTUP**

1. Surat perjanjian ini dibuat dan ditandatangani oleh kedua belah pihak di atas materai Rp 6.000,- (enam ribu rupiah) pada lembar ke satu dan lembar kedua yang mempunyai kekuatan hukum sama
2. Perjanjian ini berlaku mulai tanggal ditandatangani oleh kedua belah pihak.

PIHAK KEDUA
Penanggungjawab Kegiatan

METERAI
TEMPEL

DE KEASAMBAHAN
6000



Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
NIP 196510311992032003

PIHAK PERTAMA
Pejabat Pembuat Komitmen,
LPPM Universitas Lampung



Watsono, Ph. D.
NIP: 196302161987031003

**LAPORAN
PENELITIAN PASCASARJANA
UNIVERSITAS LAMPUNG**



JUDUL PENELITIAN

**ANALISIS SEQUENCING ITS r-DNA, PROFIL PROTEIN
DAN KARAKTER SPESIFIK MUTAN CASSAVA
(*Manihot esculenta* Crantz.) RESISTEN
*Fusarium oxysporum***

TIM PENGUSUL

Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si. (Ketua)

NIDN: 0031106503

Dr. HARDOKO INSAN QUDUS, M.S. (Anggota)

NIDN: 0003026102

KATEGORI: Penelitian Dasar

Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian PASCASARJANA Nomor Kontrak:
1510/UN26.21/PN/2020 Tanggal 24 Maret 2020

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
SEPTEMBER
2020**

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**

Judul Penelitian : Analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan Karakter Spesifik Mutan Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Resisten *Fusarium oxysporum*

Manfaat Sosial Ekonomi : Hasil akhir penelitian ini berupa bibit (varietas) Cassava resisten layu *Fusarium*, dengan tersedianya bibit tersebut diharapkan kualitas, produksi, dan daya jual akan meningkat sehingga dapat memajukan perekonomian para petani Cassava

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
b. NIDN : 0031106503
c. SINTA ID : 6115457
d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
e. Program Studi : Magister Biologi
f. Nomor HP : 085228255200
g. Alamat surel (e-mail) : endang.nurcahyani@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti

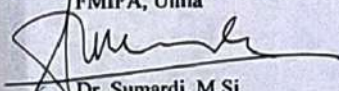
a. Nama Lengkap : Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.
b. NIDN : 0003026102
c. SINTA ID : 6039340
d. Program Studi : Magister Kimia

Jumlah mahasiswa yang terlibat : 1 (satu) orang
Jumlah staf yang terlibat : 1 (satu) orang
Lokasi kegiatan : Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM; UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LT-SIT) Universitas Lampung

Lama kegiatan : 6 bulan
Biaya Penelitian : Rp.40.000.000,-
Sumber dana : BLU-Unila-2020

Bandar Lampung, 24 September 2020

Mengetahui,
Ketua Program Studi Magister Biologi
FMIPA, Unila

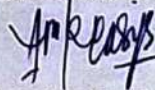


Dr. Sumardi, M.Si.
NIP. 196503251991031003



Prof. Dr. Ir. Abbas Zakaria, M.S.
NIP. 196108261987021001

Ketua Peneliti,



Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.
NIP. 196510311992032003

Menyetujui,



Ketua LPPM Unila



Dr. Lusmellia Afranti, D.E.A.
NIP. 196505101993032008

**IDENTITAS DAN URAIAN UMUM
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG**

1. Judul Penelitian : Analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan Karakter Spesifik Mutan Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Resisten *Fusarium oxysporum*

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Program Studi	Alokasi Waktu (jam/minggu)
1.	Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.	Ketua	Molekular Bioteknologi Tumbuhan	Magister Biologi	10
2.	Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S.	Anggota	Kimia Analitik	Magister Kimia	8

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Planlet Mutan Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), Asam fusarat, *Fusarium oxysporum* (**Jenis material yang akan diteliti**); Analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein, Analisis Fenol Total dan Analisis Gula Reduksi Planlet Mutan Cassava Resisten terhadap Penyakit Layu *Fusarium* (**Segi penelitian**).

4. Masa Pelaksanaan

Mulai : Bulan April Tahun 2020
Berakhir : Bulan September Tahun 2020

5. Usulan Biaya: Rp. 40.000.000,- (Empat puluh juta rupiah)

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan)

Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, Universitas Gadjah Mada (UGM); UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung.

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

Universitas Gadjah Mada (UGM), terutama Pusat Studi Bioteknologi, Laboratorium Rekayasa Genetika. Kontribusi dari instansi tersebut berperan dalam membantu menganalisis bidang molekular yaitu Analisis ITS r-DNA dan Profil Protein planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Kerjasama ini akan diwujudkan dengan melibatkan seorang staf teknis pada instansi tersebut.

8. Temuan yang ditargetkan lulusan S-2

- a. Mahasiswa dapat melaksanakan penelitian dan lulus dengan tepat waktu sesuai yang ditargetkan (1,5 tahun).
- b. Mahasiswa dapat melaksanakan presentasi di seminar berskala Internasional dan menulis temuannya pada Jurnal Internasional Bereputasi.

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek)

Teori mekanisme **Ketahanan Terimbas** planlet *Cassava* terhadap *Fusarium oxysporum* berdasarkan analisis Sequencing ITS r-DNA, profil protein, dan karakter spesifiknya, secara ilmiah **memberikan kontribusi bidang analisis molekular**; dengan diketahuinya urutan basa nitrogen penyusun DNA dan profil proteinnya, membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan cassava tahan terhadap *Fusarium oxysporum*.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran untuk setiap penerima Hibah Penelitian Pascasarjana (Nasional/Internasional) adalah jurnal bereputasi sebagai berikut.

OnLine Journal of Biological Sciences; url: <https://thescipub.com/journals/ojbs>;
<https://thescipub.com/journals/ojbs/indexing>

Tahun Rencana Publikasi: 2021

Judul rencana publikasi : “**Analysis of Sequencing ITS r-DNA and Profil Protein of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Mutant Plantlets Resistant to Fusarium Wilt**”

11. Seminar yang akan diikuti

Seminar International: The 2nd Science and Mathematics International Conference (SMIC) 2020. Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Universitas Negeri Jakarta.
url: <http://fmipa.unj.ac.id/smic/>

Tahun rencana penyelenggaraan: 8-9 August 2020 .

Judul yang akan diseminarkan : “**Analysis of The Reducing Sugar of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Mutant Plantlets Resistant to Fusarium Wilt**”

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL

HALAMAN PENGESAHAN

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

DAFTAR ISI

RINGKASAN

BAB 1. PENDAHULUAN

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

BAB 3. METODE PENELITIAN

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

BAB 5. KESIMPULAN

REFERENSI

LAMPIRAN-LAMPIRAN

- 1. Sertifikat Seminar Internasional SMIC 2020 UNJ Jakarta**
- 2. Sertifikat Seminar Nasional Unila 2020**
- 3. Artikel Seminar Internasional SMIC 2020 UNJ Jakarta**
- 4. Surat Keterangan Rencana Seminar Hasil Mahasiswa S2**
- 5. Draft Artikel Jurnal Internasional Bereputasi**
- 6. Bukti Submit Jurnal International Terindeks (Scopus)**

RINGKASAN

Salah satu **program unggulan** Universitas Lampung (Unila), dalam Renstra Penelitian Unila 2016-2020 yaitu bidang ketahanan pangan. Dalam program tersebut, penelitian benih didorong untuk menghasilkan benih lokal dan unggul. Unila pada saat ini, memberikan perhatian yang serius terhadap kegiatan penelitian yang terkait dengan singkong (Cassava), hal tersebut karena komoditas ini merupakan produk unggulan Provinsi Lampung. Sejalan dengan pencapaian renstra Unila tersebut (Program bidang ketahanan pangan), dalam proposal ini diajukan penelitian pengendalian penyakit Layu *Fusarium* pada Cassava dengan tujuan jangka panjang: memperoleh bibit/varietas mutan unggul Cassava lokal Lampung resisten penyakit layu *Fusarium*, berdasarkan analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan karakter spesifik.

Penyakit layu *Fusarium* masih merupakan kendala produksi dalam budidaya Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif. Penggunaan **bibit/varietas mutan** Cassava yang tahan penyakit layu *Fusarium* dengan hasil tinggi diharapkan merupakan alternatif pengendalian penyakit yang penting.

Penelitian Induced Resistance Cassava dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang resisten. Inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) pada Cassava resisten dilakukan secara *in vitro*, dilanjutkan dengan analisis Pola DNA dibandingkan dengan kontrol. Hasil dari penelitian sebelumnya tersebut, berupa Pita DNA baru (spesifik) yang mempunyai ukuran 550 bp (OPA_1) dan 300 bp (OPA_10), diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan Cassava terhadap *Fo*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam (dalam proposal ini) untuk memastikan apakah pita DNA baru tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan mutan Cassava resisten terhadap *Fo*, yaitu dengan analisis *sequencing* ITS r-DNA dan Profil Protein serta karakter spesifik lain yaitu kandungan Fenol Total dan Gula reduksi.

Tujuan jangka panjang dalam keseluruhan penelitian ini adalah memperoleh bibit mutan Cassava yang resisten terhadap *Fo*. **Target khusus** yang ingin dicapai adalah **1)** Menganalisis urutan basa nukleotida gen mutan Cassava tahan *Fo* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 r-DNA dengan analisis *sequencing*, **2)** Menganalisis Profil Protein mutan Cassava resisten *Fo*, dan **3)** Karakterisasi mutan Cassava yang resisten terhadap *Fo*

Tahapan kegiatan yang dilakukan meliputi: **1)** Analisis *sequencing* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 r-DNA diharapkan akan diperoleh urutan basa nukleotida gen 18 S ITS-1; 5,8 S ITS-2; dan 28 S r-DNA yang mengindikasikan mutan Cassava tersebut resisten *Fo*; **2)** Analisis Profil Protein diharapkan terbentuk pita baru (spesifik) yang diprediksi merupakan protein peroksidase, berperan di dalam ketahanan terhadap *Fo*; **3)** Karakterisasi mutan yaitu kandungan fenol total dan gula reduksi, untuk memperoleh karakter spesifik mutan resisten *Fo*.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi asam fusarat yang menghasilkan LC₅₀ yaitu pada planlet cassava yang memiliki konsentrasi 120 ppm, planlet cassava yang toleran terhadap penyakit layu fusarium menunjukkan adanya karakter ekspresi yang berbeda dengan planlet cassava yang tidak toleran terhadap jamur *Fusarium oxysporum*, yaitu terjadi peningkatan kandungan fenol total, kandungan gula reduksi pada planlet cassava yang toleran terhadap *Fusarium oxysporum*, seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam fusarat yang diberikan, dan terdapat pita protein baru (berat molekul 100 kDa), pita protein hilang (berat molekul 60 kDa), dan protein yang pitaanya konsisten muncul dan tebal (25 kDa).

Kata kunci: *Fusarium oxysporum*; ITS rDNA; Mutan Cassava; Profil Protein; *Sequencing*.

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.), ketela pohon, ubi kayu, atau singkong merupakan tanaman terpenting ketiga di dunia dan sumber makanan pokok serta pendapatan di seluruh daerah tropis. Budidaya Cassava bisa menjadi mata pencaharian bagi lebih dari 500 juta petani (Eleazu *et al.*, 2014; Amponsah *et al.*, 2014). Cassava merupakan komoditas pangan penting di Indonesia, dan ke depan komoditas ini akan semakin strategis peranannya bagi kehidupan masyarakat dan perekonomian negara. Berdasarkan areal panen komoditas pangan, cassava menduduki urutan ke tiga setelah padi dan jagung, yang ketiganya sebagai sumber karbohidrat utama masyarakat (Fauzi dkk., 2015)

Indonesia adalah negara terbesar kedua penghasil Cassava setelah Nigeria dengan rata-rata total penyediaan selama lima tahun sebesar 9,67 juta ton atau sebesar 10,61% dari total penyediaan singkong dunia, diikuti dengan Brazil, India dan United Republik of Tanzania masing-masing berkisar 8,67 – 4,96 juta ton atau sebesar 9,52% – 5,44%, selebihnya menyumbang di bawah 5,30% (Anonymous, 2013).

Badan Pusat Statistik mencatat bahwa sentra lahan Cassava di Indonesia dikuasai oleh provinsi Lampung dengan luas lahan panen 324,100 ha pada tahun 2012. Tahun 2013, produksi singkong di Provinsi Lampung mencapai 8,33 juta ton dan tahun 2015 sebanyak 7,39 juta ton. Keadaan ini menjadikan Lampung sebagai penyuplai sepertiga produksi Cassava nasional dari produksi nasional sebesar 23,92 juta ton (Anonymous, 2015), namun demikian, masih banyak kendala produksi dalam budidaya Cassava, antara lain penyakit layu Fusarium. Penyakit ini disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) yang sampai sekarang masih belum bisa diatasi secara efektif.

Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang efisien, efektif dan aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan **varietas yang resisten**. Penggunaan varietas unggul yang resisten terhadap *Fo* dengan daya hasil tinggi merupakan salah satu alternatif pengendalian penyakit yang penting dan tidak menimbulkan dampak negatif. Pengembangan varietas Cassava resisten *Fo* dapat

dilakukan dengan metode seleksi *in vitro* yaitu mengkulturkan eksplan berupa jaringan atau organ pada medium yang mengandung asam fusarat konsentrasi selektif (Nurcahyani *et al.*, 2019a; Nurcahyani *et al.*, 2019b; Nurcahyani *et al.*, 2020).

Penelitian ketahanan terimbas (*Induced Resistance*) Cassava dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang resisten. Inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) pada Cassava resisten dilakukan secara *in vitro*, dilanjutkan dengan analisis Pola DNA dibandingkan dengan kontrol. Luaran penelitian tersebut, berupa **mutan Cassava** dengan Pita DNA baru (spesifik) berukuran 550 bp (OPA_1) dan 300 bp (OPA_10), diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan Cassava terhadap *Fo*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam (**yang diajukan pada Proposal Penelitian ini**) untuk memastikan apakah pita DNA baru tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan mutan Cassava resisten terhadap *Fo*, yaitu dengan analisis *sequencing* ITS r-DNA dan Profil Protein serta karakter spesifik lain yaitu kandungan Fenol Total dan Gula reduksi.

Berdasarkan latar belakang diatas maka diperlukan penelitian yang lebih mendalam tentang *Induced Resistance* mutan Cassava resisten penyakit layu *Fusarium*, sehingga akhirnya akan diperoleh teori baru untuk mendukung pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK) serta tercapainya **tujuan jangka panjang** dalam keseluruhan penelitian ini yaitu diperolehnya varietas/bibit mutan Cassava yang resisten jamur *Fusarium oxysporum*.

B. Tujuan Khusus

Target dan Tujuan khusus yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Menganalisis urutan basa nukleotida gen mutan Cassava resisten *Fo* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 r-DNA dengan analisis *sequencing*,
2. Menganalisis Profil Protein mutan Cassava resisten *Fo*

3. Mengkarakterisasi mutan Cassava yang resisten terhadap *Fo*, meliputi: kandungan fenol total dan kandungan gula reduksi.

C. Urgensi Penelitian

Salah satu permasalahan yang dihadapi dalam budidaya Cassava di Lampung khususnya dan di Indonesia pada umumnya adalah penyakit layu *Fusarium* yang disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*). Pengendalian penyakit pada Cassava selama ini dilakukan menggunakan pestisida yang sering menimbulkan polusi terhadap lingkungan (Markson *et al.*, 2012). Salah satu cara pengendalian penyakit yang aman terhadap lingkungan, yaitu menggunakan varietas yang tahan (resisten) dengan mekanisme terimbas atau *induced resistance* (Nurcahyani, 2016a; Nurcahyani, 2016b)

Universitas Lampung (Unila) telah menetapkan **tiga program unggulan**, yakni **(1) kearifan lokal, (2) ketahanan pangan** dan **(3) energi** secara khusus dalam Renstra Penelitian Unila 2016-2020. **Program bidang ketahanan pangan**, penelitian benih didorong untuk menghasilkan benih lokal dan unggul. **Unila pada saat ini, dalam bidang ketahanan pangan, memberikan perhatian yang serius terhadap kegiatan penelitian yang terkait dengan singkong (Cassava)**, hal tersebut karena komoditas ini merupakan produk unggulan Provinsi Lampung. Sejalan dengan pencapaian renstra Unila tersebut (Program bidang ketahanan pangan), dalam proposal ini diajukan penelitian tentang pengendalian penyakit Layu *Fusarium* pada Cassava dengan tujuan jangka panjang: untuk memperoleh varietas/bibit unggul Cassava lokal Lampung tahan *Fusarium oxysporum*, berdasarkan analisis molekular: Analisis Sequencing daerah ITS r-DNA, Profil Protein dan karakter ekspresi spesifiknya.

Rencana penelitian yang diajukan dalam proposal ini (Tahun II), merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya (Tahun I) dari **Roadmap Penelitian Cassava**. Penelitian ini sangat penting untuk dilanjutkan dalam rangka mengetahui dan mengkaji lebih mendalam mutan *Cassava* resisten *Fo*. Hasil analisis molekular yang telah dicapai dalam penelitian Tahun I adalah ditemukannya Pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 550 bp (OPA_1) dan 300

bp (OPA_10), diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan Cassava terhadap *Fo*.

Temuan dan luaran inovasi yang ditargetkan serta kontribusinya pada pengembangan keilmuan:

1. **Teori** tentang mekanisme *Induce Resistance* Cassava terhadap *Fo* yang didasarkan atas urutan basa nukleotida gen mutan Cassava dengan analisis sequencing daerah ITS r-DNA dan profil protein. Dengan diketahui urutan basa DNA-nya, maka dapat memperkuat hasil penelitian Tahun I yang membuktikan bahwa adanya pita baru pada Pola DNA Cassava adalah gen yang benar-benar menyebabkan Cassava resisten terhadap *Fo* (mutan Cassava). Teori baru ini secara ilmiah dapat memberikan kontribusi bidang analisis molekular.

2. Dalam jangka panjang akan diperoleh bibit (varietas) Cassava resisten penyakit Layu Fusarium; dengan tersedianya bibit Cassava resisten penyakit tersebut, nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual Cassava serta pendapatan petani Cassava di Lampung khususnya dan Indonesia pada umumnya.

Target Capaian pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Target Capaian dalam penelitian

No	Jenis Luaran				Indikator Capaian
	Kategori	Sub Kategori	Wajib	Tambahan	TS ¹⁾
1	Artikel ilmiah dimuat di Jurnal	Internasional Bereputasi/Scopus	ada	tidak ada	<i>Submitted/Published</i>
		Nasional SINTA 2 (DOI)	tidak ada	tidak ada	tidak ada
2	Diseminarkan	Internasional	tidak ada	ada	dilaksanakan
		Nasional	tidak ada	tidak ada	tidak ada
		LPPM Unila/Universitas	tidak ada	tidak ada	tidak ada
3	Laporan Akhir Penelitian		ada	tidak ada	ada
4	Laporan Penggunaan Anggaran (Keuangan)		ada	tidak ada	ada
5	Mhs melaksanakan Seminar Hasil (Srt. Ket. PPs)		ada	tidak ada	ada

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

Cassava merupakan komoditas pangan penting di Indonesia, dan ke depan komoditas ini akan semakin strategis peranannya bagi kehidupan masyarakat dan perekonomian negara. Berdasarkan areal panen komoditas pangan, cassava menduduki urutan ke tiga setelah padi dan jagung, yang ketiganya sebagai sumber karbohidrat utama masyarakat (Fauzi dkk., 2015; Amponsah *et al.*, 2014). Tanaman *M. esculenta* kaya akan karbohidrat, vitamin dan nutrisi mineral dan karotenoid, profil asam amino esensial nya juga sebanding dengan kacang-kacangan seperti kedelai dan asupan protein referensi yang direkomendasikan. Daun cassava mengandung antioksidan alami, sebagai *terapeutik* (berkaitan dengan terapi) dan melancarkan sistem pencernaan, ekskresi dan mengatur tingkat tekanan darah, juga sebagai sumber protein daun alternatif bagi manusia dan hewan (Jacob *et al.*, 2019).

B. Ketahanan terimbis (*induced resistance*).

Ketahanan terhadap penyakit dapat diperoleh dengan cara pengimbasan ketahanan (*induced resistance*) yaitu perlakuan sebelum infeksi patogen dengan senyawa kimia maupun dengan inokulasi mikroorganisme non patogenik (Sumardiyono dkk., 2015). Ketahanan terimbis berasal dari ketahanan alami yang dimiliki tanaman, dan akan terekspresi jika ada aksi dari agen pengimbas (Soelistijono, 2015). Mekanisme ketahanan tanaman terhadap penyakit dapat berupa ketahanan secara fisik maupun kimia (Corina *et al.*, 2009). Sintesis dan akumulasi PR-protein sangat berperan penting dalam pertahanan tanaman terhadap patogen. Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani, 2012; Nurcahyani, 2013; Nurcahyani, 2014; Nurcahyani, 2017); anggrek tanah *Spathoglottis plicata* (Nurcahyani, 2016a; Nurcahyani, 2016b), Cassava (Nurcahyani *et al.*, 2019a; Nurcahyani *et al.*, 2019b), dan Anggrek Bulan *Phalaenopsis amabilis* (Nurcahyani *et al.*, 2020).

C. Penyakit Layu *Fusarium*

Jamur *Fusarium oxysporum* (*Fo*) terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu Fusarium**, yang mematikan bagi tanaman. *Fusarium oxysporum* dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting; sangat sulit diberantas karena sporanya dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama (Sumardiyono dkk., 2015). Di dalam jaringan tanaman yang terinfeksi akan terbentuk miselium yang berkembang sampai mencapai pembuluh xilem, sehingga menyebabkan terhalangnya transportasi unsur hara dan akhirnya tanaman layu (Putri dkk, 2014). Karakteristik gejala layu muncul karena penyumbatan pembuluh yang dipicu oleh pengumpulan hifa jamur dan kombinasi interaksi host-patogen seperti pelepasan racun dan pembentukan *tyloses* (Srinivas *et al.*, 2019).

D. Asam fusarat (AF)

Asam fusarat (5- n butilpiridin-2 karboksilat) merupakan toksin yang larut dalam air dan merupakan antibiotik. Toksin ini mengganggu permeabilitas membran dan akhirnya mempengaruhi kebutuhan air tanaman. Adanya hambatan pergerakan air dalam tubuh tanaman menyebabkan terjadinya layu patologis (Srinivas *et al.*, 2019). Seleksi tanaman dengan menginduksi ketahanan menggunakan asam fusarat akan lebih efektif dengan memberikan sumber induksi dengan dosis rendah pada konsentrasi AF nontoksik (di bawah 10^{-6} M) sehingga tanaman akan memberikan respon ketahanan dengan memproduksi fitoaleksin untuk menghambat aktivitas patogen. Salah satu senyawa fitoaleksin yang diproduksi oleh tanaman adalah fenol. Induksi AF juga dapat meningkatkan senyawa H_2O_2 pada medium kultur, di mana H_2O_2 bersifat toksik bagi patogen, sebaliknya AF pada konsentrasi toksik akan menyebabkan kematian pada tanaman (Singh and Upadhyay, 2014).

Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten

terhadap infeksi patogen (Nurcahyani *et al.*, 2017; Nurcahyani *et al.*, 2018; Nurcahyani *et al.*, 2019a; Nurcahyani, 2019b).

E. Sequencing daerah ITS r-DNA

Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) nuklear ribosomal DNA (r-DNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S r DNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga (Brinegar, 2009).

Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R). Penelitian tentang identifikasi strain tanaman alga *Porphyra haitanensis* Chang et Sheng (Bangiales, Rhodophyta) melalui penanda molekular ITS-5,8S r-DNA telah dilakukan. Penanda ITS r-DNA dapat mengidentifikasi 10 strain dari *species* alga tersebut (Chen *et al.*, 2009). Penelitian tentang divergensi jamur *Waitea circinata* var. *circinata* pada wilayah distribusi geografi di Amerika pada *annual bluegrass*, dengan penanda sekuen daerah ITS r-DNA telah dilakukan. Berdasarkan penelitian ini diketahui bahwa *W. Circinata* var. *circinata* memiliki divergensi patogen yang tinggi berkaitan dengan adaptasinya terhadap *annual bluegrass* di berbagai habitat di Amerika Serikat (Chen *et al.*, 2009).

F. Deteksi mutan dengan protein

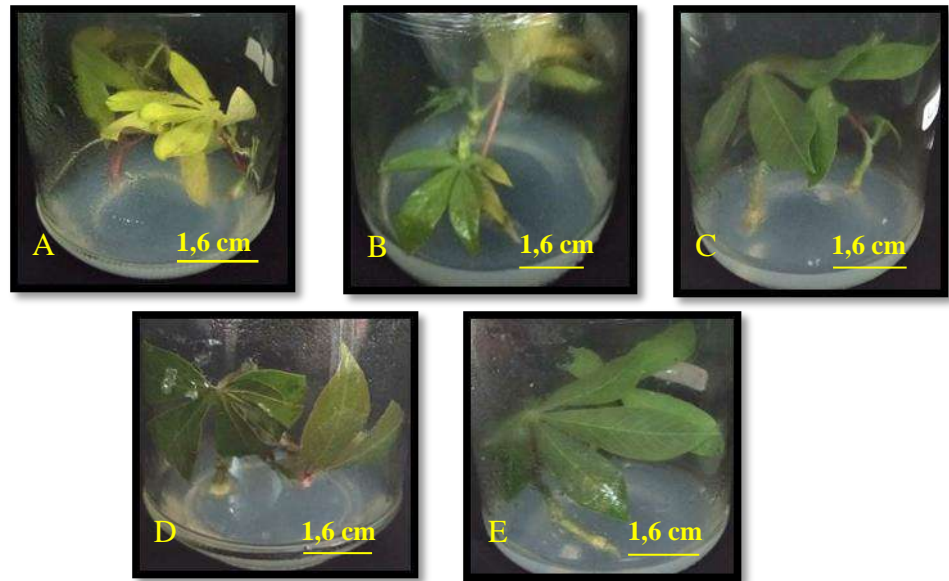
Perbandingan pita protein yang terbentuk melalui pemisahan elektroforesis dapat dilakukan untuk mengidentifikasi produk gen yang dihasilkan selama planlet vanili diseleksi dengan AF. Metode elektroforesis protein dengan *Sodium Dodecyl Sulphate-Polycrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) merupakan salah satu metode untuk menganalisis protein dengan memisahkan pita-pita protein yang ada di dalam sampel berdasarkan berat molekulnya (Nurcahyani, 2016a).

G. Senyawa Fenol dan Gula Reduksi

Pamungkas dkk, (2016) menyatakan bahwa senyawa fenolik merupakan senyawa yang banyak ditemukan pada tumbuhan. Senyawa fenolik memiliki sifat farmakologi yaitu sebagai anti inflamasi, antioksidan, dan antibakteri. Kandungan gula reduksi pada suatu bahan dapat mempengaruhi karakteristik produk. Selama proses pengolahan bahan, adanya gula pereduksi dan asam amino dari protein akan menimbulkan reaksi yang dikenal sebagai reaksi *Maillard* (Widiantara dkk., 2018).

H. Hasil penelitian yang sudah dicapai (Tahun I dari *Roadmap Riset Cassava*)

- A. Diperoleh Pita DNA baru (spesifik) pada **planlet mutan Cassava** dengan ukuran 550 bp (OPA_1) dan 300 bp (OPA_10), diprediksi sebagai marker RAPD untuk ketahanan Cassava terhadap *Fo*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam (**yang diajukan pada Proposal ini, Tahun II dari *Roadmap Riset Cassava***) untuk memastikan apakah pita DNA baru tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan mutan Cassava resisten terhadap *Fo*, yaitu dengan analisis *sequencing* ITS r-DNA (urutan basa nitrogen gen mutan Cassava) dan Profil Protein serta karakter spesifik lain yaitu kandungan Fenol Total dan Gula reduksi.
- B. Hasil penelitian (Tahun I dari *roadmap Riset Cassava*) yaitu Cassava Kontrol (A) dan planlet mutan Cassava yang diperlakukan dengan berbagai konsentrasi asam fusarat: (B) 60 ppm; (C) 80 ppm; (D)100 ppm; dan (E) 120 ppm (**Gambar 1**), serta mahasiswa bimbingan penelitian Tesis S2 Biologi FMIPA Unila yang sedang melakukan **mikropropagasi planlet** mutan Cassava di ruang *In Vitro*, Biologi FMIPA Unila (**Gambar 2**).



Gambar 1. Planlet Cassava Kontrol (A) dan Planlet mutan Cassava yang diperlakukan dengan berbagai konsentrasi asam fusarat: B.60 ppm; C.80 ppm; D. ppm; dan E.120 ppm.



Gambar 2. Mahasiswa bimbingan S2 (Ferina Evlin/Angkatan 2019) sedang melakukan mikropropagasi planlet mutan Cassava di Ruang *In Vitro*, FMIPA Unila.

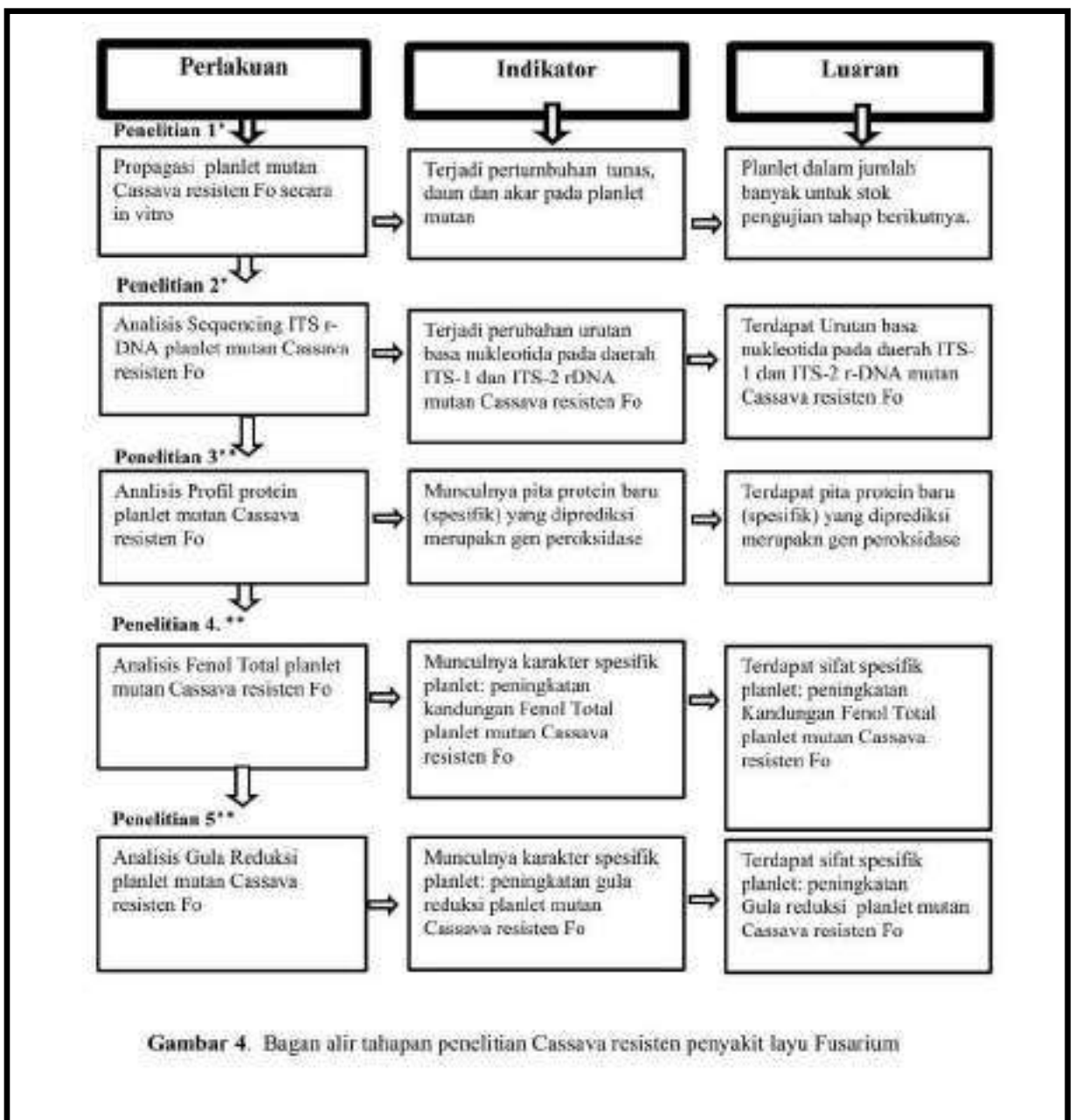
Berikut disajikan Roadmap Riset pada **Gambar 3**.



BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan mulai **April 2020** sampai dengan **September 2020** di Laboratorium Botani ruang *In Vitro*, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, UGM; UPT LT-SIT, Universitas Lampung.

Tahapan penelitian pada **proposal penelitian ini** (Tahun II) disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam **Gambar 4**.



Berikut ini diuraikan metode penelitian dari **tahap kegiatan yang diusulkan dalam proposal ini** (Tahun II dari *Roadmap Riset Cassava*).

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR) daerah ITS r-DNA mutan Cassava resisten Fo*

DNA yang digunakan dalam penelitian ini, adalah hasil dari isolasi DNA Cassava pada penelitian sebelumnya.

- a. Dibuat campuran PCR dengan total 25 µl di dalam tabung 200 µl dengan komposisi seperti Tabel 2.

Tabel 2. Komposisi Premix PCR untuk daerah ITS rDNA

Senyawa	Total 25 µl (µl)	Keterangan
KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>	22,0	Prosedur KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>
Primer forward	1,00	Konsentrasi 100 µM
Primer reverse	1,00	Konsentrasi 100 µM
DNA	1,00	Konsentrasi 10 ng
Jumlah	25,00	

- b. Primer ITS DNA yang digunakan yaitu *primer forward* dengan susunan nukleotida 5-GATCGCGGCGGCGACTTGGGCGGTTC-3 (F1), dan *primer reverse* dengan susunan nukleotida 5-GGTAGTCCCGCCTGACCTGGG-3 (R1) (Ming Li *et al.*, 2011).
- c. Dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan basa nukleotida gen 18 S ITS-1; 5,8S ITS-2 dan 28S rDNA. Sequencing DNA menghasilkan 2 sequence. Analisis menggunakan program *Sequence Scanner version 1.0*. Gabungan kedua *sequence* menggunakan *editSeq* dan *SeqMan* dalam *Software Suite for Sequence Analysis DNASTAR Lasergene DM version 3.0.25*. Pembandingan untuk penanda ITS rDNA adalah *V. planifolia* dari GenBank.

2. Analisis profil protein planlet Cassava (SDS-PAGE)

Ekstraksi protein dilakukan dengan cara menghitung 1 g daun planlet dengan masing-masing ditambahkan 300 µL *Phosphate Buffer Saline (PBS)* (NaCl 8,55 g/L, Na₂HPO₄.2H₂O 1,33 g/L, NaH₂PO₄.H₂O 0,34 g/L) dengan pH 7

sebagai *buffer* ekstraksi dan ditambah inhibitor protease, Konsentrasi protein ditentukan dengan menggunakan metode Bio-rad (*Bio-rad Assay*), selanjutnya dibaca dengan spektrofotometer (*Beckman, DU-65*) pada panjang gelombang (OD 595 nm). Penentuan berat molekul (BM) protein dilakukan melalui metode SDS-PAGE.. Pita protein yang terbentuk dalam gel setelah elektroforesis ditentukan berat molekulnya (kD) (Soelistijono, 2015).

3. Analisis Kandungan Fenol Total

Analisis senyawa fenol total menggunakan metode Singleton & Rossi. Pengukuran fenol total dilakukan dengan mengambil supernatan sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditambah 250 μ L reagen *Folin-Ciocalteu*, setelah didiamkan selama 5 menit lalu ditambahkan 1 mL Na_2CO_3 . Sesudah tercampur rata, diamati nilai serapan pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometer (*Beckman DU-65*), sebagai kontrol digunakan akuades. Berdasarkan nilai serapan kemudian ditentukan kandungan senyawa fenol berdasarkan persamaan regresi asam galat yaitu hubungan antara nilai serapan ekstrak planlet dan seri kepekatan asam galat.

4. Analisis Kandungan Gula Reduksi

a. Pengukuran Panjang Gelombang Maksimum Larutan Glukosa Standar

Ditimbang 20 mg glukosa anhidrat dan dilarutkan dengan akuades sampai volume 100 ml (larutan glukosa 0.2 mg/ml). Dipipet 25 ml larutan lalu diencerkan dengan akuades sampai volume 100 ml (larutan glukosa 0.05 mg/ml). Dipipet 1 ml larutan glukosa 0.05 mg/ml kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml pereaksi Nelson. Kemudian ditutup dengan kapas dan dipanaskan pada waterbath sampai mendidih selama 30 menit lalu didinginkan. Kemudian, ditambahkan 1 ml larutan arsenomolibdat lalu dikocok hingga semua endapan larut. Ditambahkan 7 ml akuades lalu kocok hingga homogen. Diukur serapan panjang gelombang pada 400-800 nm (Pratiwi, 2011 dan Sari, 2012). Maka diperoleh panjang gelombang maksimum yang didapat (761 nm).

b. Persiapan Kurva Standar Glukosa

Disiapkan larutan glukosa standar dengan variasi konsentrasi dari 0.02 - 0.18 mg/ml. Ditambahkan 1 ml larutan Nelson kemudian dipanaskan selama 30 menit dan didinginkan. Ditambahkan 1 ml larutan arsenomolibdat lalu dikocok hingga semua endapan larut. Ditambahkan 7 ml akuades lalu kocok hingga homogen. Diukur serapannya pada panjang gelombang 761 nm. Kemudian dibuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa standard dan absorbansi (Pratiwi, 2011 dan Sari, 2012).

C. Analisa Kadar Gula Reduksi Sampel

Dipipet 1 ml ekstrak daun cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) lalu diencerkan dalam labu ukur 50 ml dan diambil 1 ml untuk dianalisa. Ditambahkan 1 ml larutan Nelson kemudian dipanaskan hingga mendidih selama 30 menit dan didinginkan. Ditambahkan 1 ml larutan arsenomolibdat lalu dikocok. Kemudian ditambahkan 7 ml akuades dan diukur serapannya pada panjang gelombang 761 nm sehingga dapat dihitung kadar gula reduksinya (Pratiwi, 2011 dan Sari, 2012).

Analisis data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap, sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji *Duncan Multiple Range Test* pada taraf kepercayaan 95%.

5.2. Jadwal Penelitian

No	Jenis Kegiatan	Bulan ke- Tahun 2020					
		1 April	2 Mei	3 Juni	4 Juli	5 Agst	6 Sept
1	Propagasi kandidat <i>mutan Cassava</i> tahan <i>Fo</i>						
2	Analisis ITS r-DNA						
3	Analisis Profil Protein						
4	Analisis Kandungan Fenol Total						
5	Analisis Gula Reduksi						
6	Pengolahan data						
7	Penulisan artikel ilmiah/Submit Jurnal International Bereputasi						
8	Penyusunan laporan/Seminar Interntional						
9	Presentasi hasil penelitian						

BAB 4. HASIL PENELITIAN

Fusarium oxysporum merupakan patogen tanaman terbawa tanah (*soilborne*) yang tersebar di seluruh dunia. Jamur ini menyebabkan penyakit layu dan mempunyai kisaran tanaman inang yang luas (Hartati dkk., 2016). Fatmawaty dkk. (2020) menyatakan bahwa jamur fusarium merupakan jamur yang tersebar luas baik pada tanaman maupun dalam tanah. Layu fusarium sangat sulit untuk dikendalikan, adapun cara pengendaliannya biasanya secara hayati atau dengan menggunakan fungisida yang dapat menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan, maka dari itu pada penelitian ini menggunakan asam fusarat sebagai pengendalian secara hayati yang berfungsi untuk mengendalikan penyakit layu Fusarium pada tanaman cassava (*Manihot esculenta* Crantz.).

Hasil penelitian ini terdiri dari hasil uji konsentrasi asam fusarat yang menghasilkan LC₅₀ pada planlet cassava, perbandingan profil protein cassava antara kontrol dan yang diberikan perlakuan asam fusarat, serta hasil perbandingan karakter ekspresi planlet cassava, meliputi uji kandungan fenol total, dan kandungan gula reduksi. Hasil yang diperoleh dari penelitian disajikan pada tabel dibawah ini:

A. Visualisasi dan Persentase Planlet Hidup Cassava

Visualisasi planlet cassava yang ditanam pada medium *Murashige and Skoog* (MS) dan diberikan perlakuan asam fusarat dengan lima taraf konsentrasi yang berbeda, yaitu 0 ppm (kontrol), 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm menunjukkan adanya perubahan warna pada planlet. Visualisasi planlet cassava diamati mulai dari minggu pertama hingga minggu keempat. Hasil persentase visualisasi planlet cassava disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Persentase Visualisasi Planlet Cassava Hasil Seleksi dengan Berbagai Macam Konsentrasi Asam Fusarat (AF)

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm)	Persentase dan Visualisasi Planlet Cassava Pada Minggu Ke- (%)			
	I	II	III	IV
0 (kontrol)	H : 100	H : 100	H : 50 HC : 50	H : 20 HC : 80
60	H : 100	H : 100	H : 70 HC : 30	H : 50 HC : 50
80	H : 100	H : 100	H : 80 HC : 20	H : 70 HC : 30
100	H : 100	H : 100	H : 90 HC : 10	H : 80 HC : 20
120	H : 100	H : 80 HC : 20	H : 60 HC : 40	HC : 50 C : 50

Keterangan: H= Hijau; HC= Hijau Cokelat; C= Cokelat (mati)

Tabel 3. menunjukkan hasil persentase visualisasi planlet cassava pada minggu pertama hingga minggu kedua dari masing-masing perlakuan belum terlihat adanya penurunan persentase visualisasi planlet cassava, kecuali pada konsentrasi 120 ppm sudah terlihat pada minggu kedua yaitu persentase planlet cassava berwarna Hijau (H) sebesar 80% dan berwarna Hijau Cokelat (HC) sebesar 20%. Sedangkan pada saat memasuki minggu ketiga terlihat nyata adanya penurunan persentase visualisasi planlet cassava yang terjadi pada keseluruhan konsentrasi asam fusarat, bahwa semakin tinggi konsentrasi asam fusarat tersebut maka semakin sedikit pula planlet cassava yang berwarna Hijau Cokelat (HC), kecuali pada konsentrasi 120 ppm dimana persentase planlet cassava yang berwarna Hijau Cokelat (HC) justru mengalami peningkatan dari minggu sebelumnya sebesar 20%, pada minggu ketiga ini menjadi 40%. Pada konsentrasi 0 ppm, 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm berturut-turut pada minggu ketiga ini memang mengalami penurunan persentase planlet cassava yang berwarna Hijau Cokelat (HC) yaitu pada kontrol atau konsentrasi 0 ppm terdapat 50% planlet yang menunjukkan daun Hijau (H), dan 50% planlet yang menunjukkan daun berwarna

Hijau Cokelat (HC). Pada konsentrasi asam fusarat 60 ppm, persentase planlet yang berwarna hijau (H) adalah 70% dan Hijau Cokelat (HC) adalah 30%. Konsentrasi asam fusarat 80 ppm, persentase visualisasi planlet cassava yang berwarna Hijau (H) adalah 80% dan Hijau Cokelat (HC) adalah 20%. Sedangkan pada konsentrasi 100 ppm, persentase visualisasi planlet mengalami peningkatan dari konsentrasi-konsetrasi sebelumnya yaitu planlet cassava yang berwarna Hijau (H) adalah 90% dan hanya tersisa 10% saja untuk planlet cassava yang berwarna Hijau Cokelat (HC).

Persentase visualisasi planlet cassava pada minggu keempat yang diberikan perlakuan asam fusarat 0 ppm (kontrol) adalah 20% untuk planlet yang berwarna Hijau (H) dan 80% untuk planlet yang mengalami perubahan warna menjadi Hijau Cokelat (HC). Persentase visualisasi planlet cassava dengan konsentrasi asam fusarat 60 ppm menghasilkan planlet yang berwarna Hijau (H) sebesar 50% dan yang berwarna Hijau Cokelat (HC) juga sebesar 50%. Pada konsentrasi 80 ppm, hasil persentase visualisasi planlet yang berwarna Hijau (H) adalah sebesar 70% dan Hijau Cokelat (HC) sebesar 30%. Pada konsentrasi asam fusarat 100 ppm menghasilkan planlet cassava berwarna Hijau sebesar 80% dan planlet cassava berwarna Hijau Cokelat (HC) sebesar 20%, sedangkan pada konsentrasi asam fusarat 120 ppm, persentase planlet cassava yang berwarna Hijau (H) sudah tidak ada, melainkan adanya perubahan yaitu menjadi warna Hijau Cokelat (HC) sebesar 50% dan yang 50% lagi yaitu berwarna Cokelat (C) mengalami kematian. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pada konsentrasi tertinggi yaitu 120 ppm inilah dihasilkan LC_{50} (*Lethal Concentration*) dimana pada konsentrasi ini dapat mematikan 50% dari keseluruhan planlet yang diuji. Persentase Jumlah Planlet Hidup Cassava Hasil Seleksi dengan berbagai macam konsentrasi Asam Fusarat (AF) disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Persentase Jumlah Planlet Hidup Cassava Hasil Seleksi dengan Berbagai Macam Konsentrasi Asam Fusarat (AF)

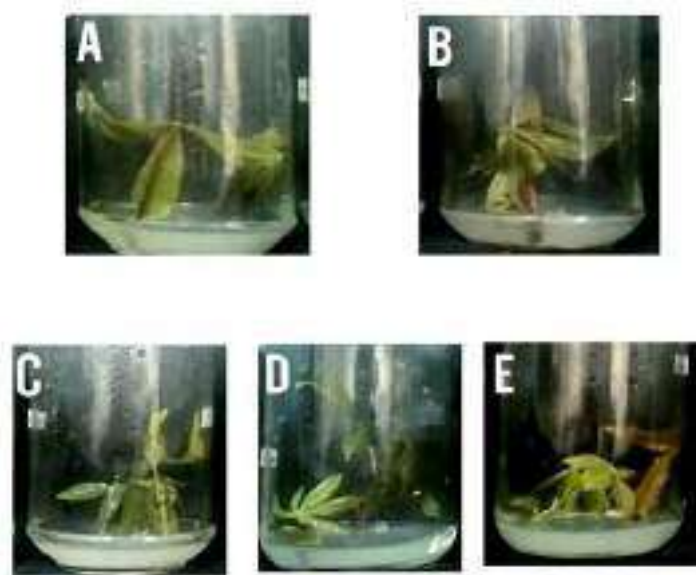
Konsentrasi asam fusarat (ppm)	Persentase dan Jumlah Planlet Hidup pada Minggu Ke- (%)			
	I	II	III	IV
0 (kontrol)	100	100	100	100
60	100	100	100	100
80	100	100	100	100
100	100	100	100	100
120	100	100	100	50

Tabel 4. menunjukkan bahwa pada minggu I hingga minggu IV seluruh planlet cassava 100% hidup, kecuali pada konsentrasi 120 ppm pada minggu IV persentase hidup planlet yaitu hanya 50%. Hal ini menunjukkan bahwa adanya pengaruh dari penggunaan atau pemberian asam fusarat (AF) pada planlet cassava, sehingga planlet tersebut dapat bertahan hidup hingga minggu IV, sedangkan pada konsentrasi 120 ppm menunjukkan tercapainya atau dihasilkannya LC_{50} pada planlet cassava tersebut.

B. Konsentrasi Asam Fusarat Toleran

Asam fusarat adalah toksin yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium oxysporum*, banyak digunakan pada seleksi *in vitro* pada tanaman. Penggunaan asam fusarat pada seleksi *in vitro* disebabkan asam fusarat yang bersifat patogenesis dan general terhadap tumbuhan sehingga bisa diaplikasikan untuk banyak tanaman. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa penambahan asam fusarat pada media sebagai komponen seleksi berkorelasi dengan tingkat ketahanan tanaman terhadap fusarium pada tingkat lapang (Bacon *et al.*, 1996).

Asam fusarat yang digunakan pada penelitian ini terdapat lima taraf konsentrasi yang berbeda, yaitu 0 ppm (kontrol), 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm. Hasil seleksi planlet cassava yang telah diinduksi dengan menggunakan asam fusarat dengan berbagai macam taraf konsentrasi yang berbeda disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Planlet cassava dengan berbagai konsentrasi asam fusarat (A) 0 ppm “kontrol”, (B) 60 ppm, (C) 80 ppm, (D) 100 ppm, (E) 120 ppm

Berdasarkan Gambar 5. menunjukkan bahwa ketahanan planlet Cassava semakin baik seiring dengan bertambahnya konsentrasi asam fusarat yang digunakan, kecuali pada konsentrasi 120 ppm. Semakin tinggi konsentrasi asam fusarat, maka keadaan planlet cassava semakin baik dibandingkan dengan yang kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa, planlet cassava yang diberikan perlakuan asam fusarat dengan berbagai macam konsentrasi lebih baik dibandingkan dengan planlet cassava tanpa perlakuan yaitu kontrol. Terlihat pada gambar A. (planlet tanpa perlakuan asam fusarat) terlihat jelas tanda-tanda bahwa planlet tersebut layu, yang mengindikasikan bahwa planlet tersebut tidak tahan. Berbeda halnya dengan planlet cassava yang diberikan perlakuan asam fusarat dengan berbagai macam konsentrasi, seperti pada gambar 3 bagian (B, C, dan D) terlihat jelas bahwa planlet-planlet tersebut memiliki ketahanan yang lebih baik dengan yang kontrol dimana semakin meningkat konsentrasi asam fusarat maka semakin meningkat pula katahanannya.

Hal ini sejalan dengan penelitian terdahulu yang telah dilakukan oleh Sari (2019) menunjukkan bahwa konsentrasi asam fusarat yang paling baik

dalam pengimbasan ketahanan penyakit layu fusarium pada planlet cassava yaitu pada konsentrasi tertinggi 80 ppm menghasilkan jumlah planlet cassava yang berwarna hijau sebanyak 70% dan berwarna hijau cokelat sebanyak 30% dengan persentase jumlah hidup 100%.

Pada penelitian ini, terjadi sedikit perbedaan dari penelitian-penelitian sebelumnya dimana pada konsentrasi asam fusarat 120 ppm planlet cassava mengalami kematian sebanyak 50% dari jumlah keseluruhan planlet. Dapat dilihat pada gambar E. (perlakuan asam fusarat 120 ppm) bahwa planlet cassava terlihat hijau kecokelatan hingga berwarna cokelat yang menunjukkan bahwa planlet tersebut mengalami kematian. Sehingga pada penelitian ini tercapai LC_{50} (*Lethal Concentration 50%*) yang artinya bahwa perlakuan asam fusarat konsentrasi 120 ppm dapat mematikan 50% dari keseluruhan planlet yang diuji.

C. Karakterisasi Planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.)

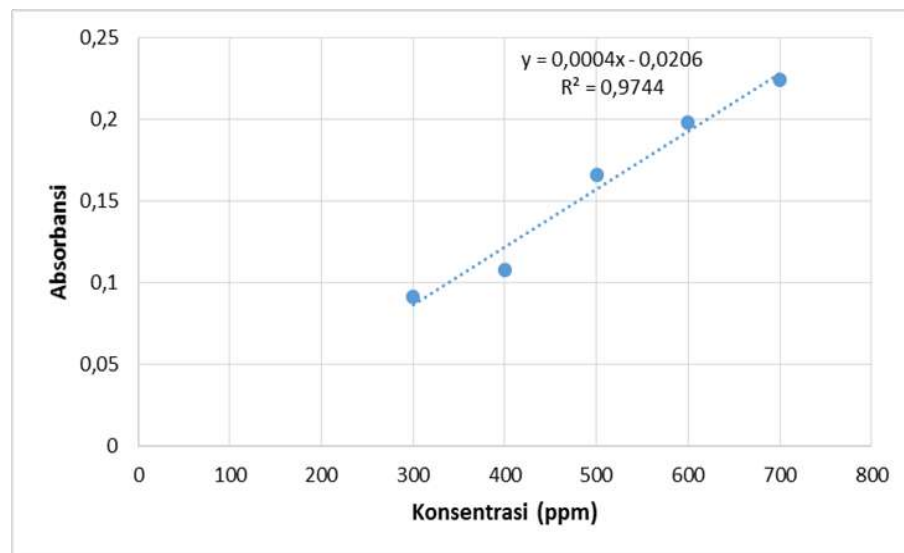
Karakterisasi planlet cassava yang memiliki keterkaitan dengan ketahanan terhadap jamur *Fusarium oxysporum*, dapat dilihat dari kandungan fenol total, kandungan gula reduksi, dan analisis profil protein.

1. Analisis Kandungan Fenol Total

Uji kandungan fenol total dilakukan dengan metode Follin-Ciocalteu. Tujuan dari analisis kandungan fenol total ini adalah untuk mengetahui kadar atau jumlah fenol yang terdapat pada sampel, sampel yang digunakan yaitu daun cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) yang dijadikan ekstrak dengan menggunakan methanol sebagai pelarutnya. Kadar fenol total ditetapkan dengan metode spektrofotometri (Amanah, 2015).

Senyawa fenol adalah hasil dari metabolisme tanaman, yang artinya jika terdapat senyawa tersebut maka itu merupakan bentuk sistem ketahanan kimia yang dapat mencegah pertumbuhan dan perkembangan patogen pada tanaman. Peningkatan senyawa fenol juga merupakan mekanisme ketahanan

dari planet cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) hasil dari pengimbasan dengan menggunakan asam fusarat (AF), sebelum dilakukan analisis kandungan fenol total, maka harus kita tentukan terlebih dahulu pengukuran kurva standar fenol dengan menggunakan asam galat. Penggunaan asam galat sebagai larutan standar karena asam galat memiliki substansi yang stabil dan murni. pengukuran ini dilakukan untuk mengestimasi kuantitas fenol total dengan regresi linear (Aberouman dan Deokule, 2008). Kurva regresi standar asam galat disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Kurva regresi standar asam galat

Pengukuran dari kurva standar ini dihasilkan persamaan garis regresi linear ($y = 0,0004x - 0,0206$) dan memiliki nilai korelasi positif tinggi ($R^2 = 0,9744$). Hal ini menunjukkan bahwa dari hasil keragaman tersebut sifatnya adalah homogen. Persamaan regresi asam galat digunakan untuk menentukan kandungan / kadar fenol total dengan memasukkan absorbansi yang didapatkan dari kurva standar asam galat pada setiap sampel ke y dan akan didapatkan x sebagai $\mu\text{g/mL}$ kadar asam galat. Kadar asam galat ($\mu\text{g/mL}$) inilah yang akan digunakan untuk menghitung kandungan fenol total yaitu banyaknya kadar asam galat ($\mu\text{g/mL}$) per kadar sampel (g/mL) (Pamungkas *et al.*, 2016).

Berdasarkan kurva standar yang telah diperoleh, maka selanjutnya dapat diketahui kandungan fenol total dari masing-masing perlakuan berdasarkan garis regresinya pada Tabel 5.

Tabel 5. Kandungan Fenol Total (%) planlet Cassava (*Manihot esculenta Crantz.*) setelah diinduksi dengan asam fusarat

Perlakuan	Rata-rata Kandungan Fenol Total (%)
0 ppm	17,50 ± 0,03a
60 ppm	28,10 ± 0,02b
80 ppm	41,25 ± 0,01c
100 ppm	48,85 ± 0,03a
120 ppm	62,20 ± 0,02c

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%.

Berdasarkan pada Tabel 3. di atas terlihat peningkatan kandungan fenol total dari sekitar 17,50% pada kontrol (0 ppm), meningkat menjadi 28,10% pada perlakuan asam fusarat 60 ppm, diikuti 41,25% pada perlakuan 80 ppm, 48,85% pada 100 ppm, dan kandungan fenol total tertinggi yaitu 62,20% pada perlakuan asam fusarat 120 ppm.

Hasil penelitian ini juga sejalan dengan hasil penelitian oleh Nurcahyani *et al.* (2012) pada panlet vanili yang diimbasi dengan menggunakan asam fusarat sehingga menghasilkan panlet vanili yang resisten terhadap *F. oxysporum*. Pada panlet vanili tersebut terjadi peningkatan kandungan fenol total seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam fusarat.

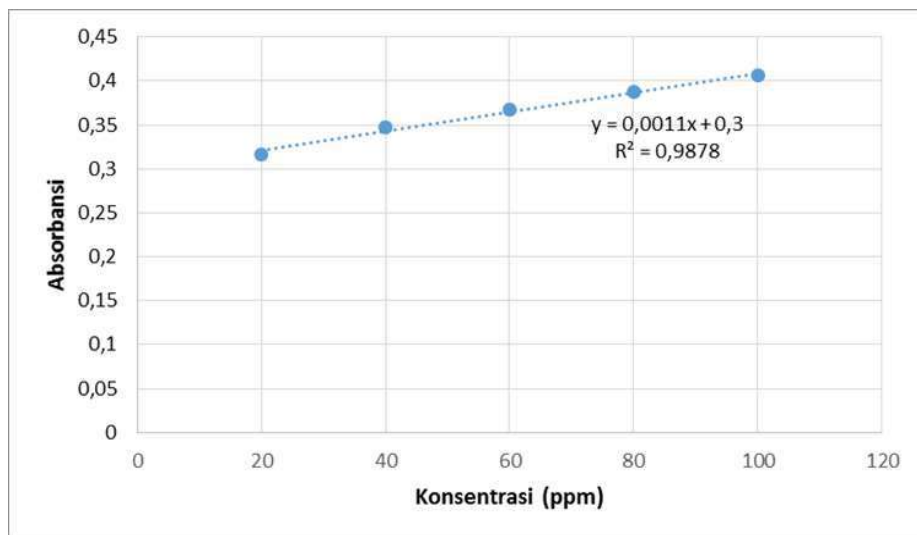
2. Analisis Kandungan Gula Reduksi

Uji kandungan gula reduksi pada penelitian ini dengan menggunakan metode Nelson–Somogyi, dimana metode ini digunakan untuk mengukur kadar gula reduksi dengan menggunakan pereaksi tembaga arsenomolibdat. Cu^{2+} direduksi menjadi Cu^{+} kemudian dilarutkan dengan arsenomolibdat menjadi molibdenum berwarna biru (Pratiwi, 2011). Intensitas warna yang

terbentuk menunjukkan banyaknya gula pereduksi yang terdapat dalam sampel, karena konsentrasi arsenomolibdat yang tereduksi sebanding dengan konsentrasi tembaga (1) oksida (Cu_2O), sedangkan konsentrasi Cu_2O sebanding dengan konsentrasi gula pereduksi (Alkayyis, 2016).

Gula reduksi merupakan golongan karbohidrat yang dapat mereduksi senyawa-senyawa penerima elektron, salah satunya yaitu glukosa, sebelum dilakukan analisis kandungan gula reduksi, maka harus kita tentukan terlebih dahulu pengukuran kurva standar gula reduksi dengan menggunakan larutan glukosa standar.

Kurva regresi standar gula reduksi disajikan pada Gambar 7.



Gambar 7. Kurva regresi standar gula reduksi

Pengukuran dari kurva standar ini dihasilkan persamaan garis regresi linear ($y = 0,0001x + 0,3$) dan memiliki nilai korelasi positif tinggi ($R^2 = 0,9878$). Hal ini menunjukkan bahwa keragaman tersebut bersifat homogen. Persamaan regresi glukosa standar digunakan untuk menentukan kandungan gula reduksi dengan memasukkan absorbansi yang didapatkan dari kurva standar gula reduksi pada setiap sampel ke y dan akan didapatkan x sebagai kadar glukosa standarnya. Berdasarkan kurva standar yang telah diperoleh, maka selanjutnya dapat diketahui kandungan gula reduksi dari masing-

masing perlakuan (berbagai macam konsentrasi, yaitu 0 ppm (kontrol), 60 ppm, 80 ppm, 100 ppm, dan 120 ppm) berdasarkan garis regresinya pada Tabel 6.

Tabel 6. Kandungan gula reduksi (%) planlet cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) setelah diinduksi dengan asam fusarat

Perlakuan	Rata-rata Kandungan Gula Reduksi (%)
0 ppm	63,63 ± 0,03a
60 ppm	78,00 ± 0,01b
80 ppm	80,09 ± 0,02c
100 ppm	88,54 ± 0,01b
120 ppm	98,54 ± 0,02c

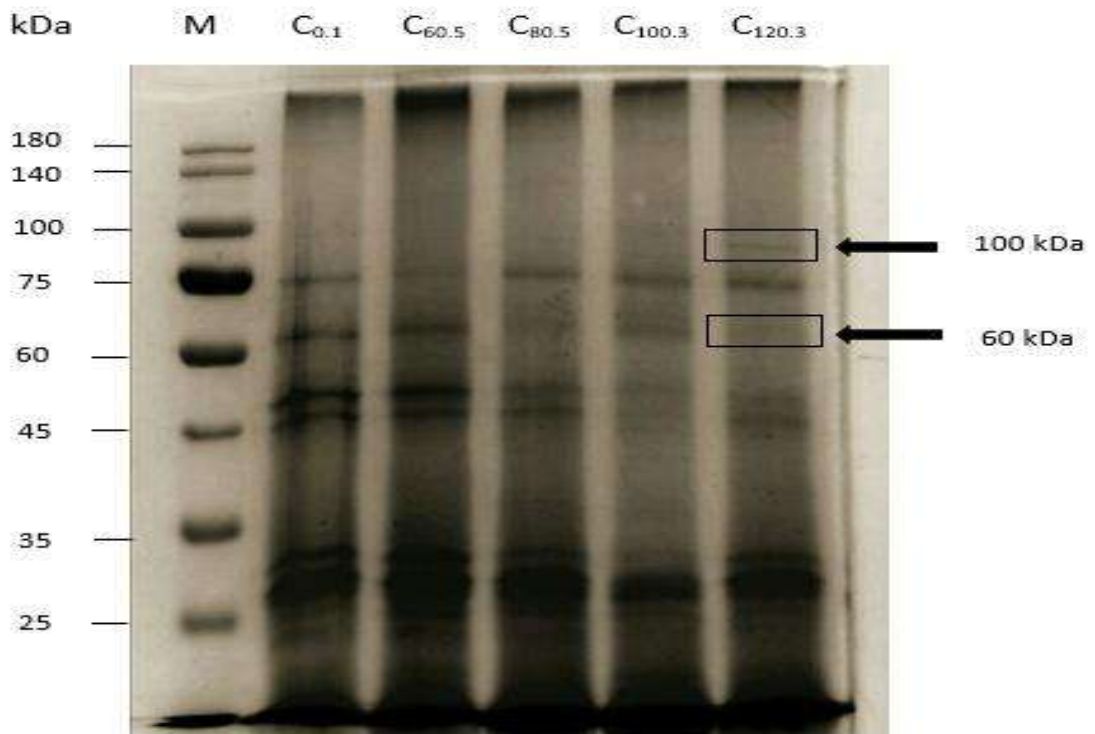
Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada taraf 5%

Berdasarkan pada Tabel 6. menunjukkan bahwa asam fusarat mampu mempengaruhi peningkatan kandungan gula reduksi yang berbeda nyata. Hasil uji menunjukkan angka yang berbeda nyata pada taraf 5%. Perlakuan setelah diinduksi dengan asam fusarat mengalami peningkatan kandungan gula reduksi pada planlet cassava (*Manihot esculenta* Crantz.). Kandungan gula reduksi mengalami peningkatan yang signifikan pada perlakuan dengan konsentrasi 120 ppm yaitu sebesar 98,54%. Dari data tersebut terlihat bahwa semakin tinggi perlakuan konsentrasi asam fusarat, maka semakin tinggi pula kandungan gula reduksi yang ada pada planlet cassava.

C. Analisis Profil Protein planlet cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) dengan metode SDS-PAGE

Protein merupakan makromolekul yang terbentuk dari asam amino yang tersusun dari atom nitrogen, karbon, dan oksigen, beberapa jenis asam amino yang mengandung sulfur (metionin, sistin, dan sistein) yang

dihubungkan oleh ikatan peptida. Dalam makhluk hidup, protein berperan sebagai pembentuk struktur sel dan beberapa jenis protein memiliki peran fisiologis (Bintang, 2010). Analisis profil protein tersebut, dapat dilihat pada Gambar 7 di bawah ini.



Gambar 7. Profil protein daun planlet cassava setelah diinduksi asam fusarat dengan metode SDS-PAGE

Berdasarkan hasil SDS-PAGE profil protein cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) terdapat temuan berupa kehadiran satu pita baru yaitu pita pada berat molekul 100 kDa (perlakuan konsentrasi asam fusarat 120 ppm), dan juga ada pita protein yang hilang yaitu pada berat molekul 60 kDa (perlakuan konsentrasi asam fusarat 120 ppm).

Menurut Gunanti *et al.* (2010), ketebalan pita protein hasil SDS-PAGE menggambarkan tinggi rendahnya konsentrasi dari suatu protein yang terdapat dalam sampel uji. Pada penelitian ini, pita protein yang terlihat paling tebal dan jelas, dan juga konsisten muncul hampir pada setiap individu dari masing-masing kelompok perlakuan yaitu pita dengan berat molekul 25

kDa. Keberadaan dan tebal tipisnya pita protein yang terbentuk tergantung dari jenis, jumlah, dan urutan asam amino. Hal tersebut yang menyebabkan adanya perbedaan dari setiap protein yang terbentuk. Demikian juga pita baru yang terbentuk tersebut merupakan hasil dari reaksi atau proses biokimia yang terbentuk antara tanaman dengan pemberian pupuk baik ekstrak cair maupun pupuk anorganik (Salisbury dan Ross, 1995a), dimana dalam penelitian ini terbentuknya pita baru tersebut merupakan hasil dari reaksi atau proses biokimia yang terbentuk antara cassava dengan pemberian asam fusarat (AF) dengan berbeda-beda perlakuan di dalamnya.

D. *Polymerase Chain Reaction (PCR) daerah ITS r-DNA mutan Cassava resisten Fo*

Sampel Cassava yang digunakan untuk penanda molekular dengan analisis ITS DNA, yaitu yang mewakili pada analisis RAPD. Amplifikasi daerah ITS dilakukan dengan menggunakan pasangan primer F1 (5'-GATCGCG GCGGCGACTTGGGCGGTT-3') sebagai primer *forward* dan R1 (5'-GGTAGTCCCGCCTG ACCTGGG-3') sebagai primer *reverse* (Mueller *et al.*, 2008).

Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Hal tersebut sesuai dengan analisis dengan metoda ITS rDNA, yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu pada tumbuhan berbiji (Baldwin & Markos, 1995; Baldwin *et al.*, 1998; Chase *et al.*, 2005).

Daerah *Internal Transcribed Spacer (ITS)* nuklear ribosomal DNA (r-DNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S rDNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga. (Brinegar, 2009). Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R) (Baldwin *et al.*, 1995; Baldwin & Markos, 1998).

Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S r-DNA. Mutasi terjadi baik pada Cassava yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 60, 80, 100, dan 120 ppm. Adanya mutasi pada cassava perlakuan dapat disebabkan karena semula melalui persilangan alami, kemudian diikuti oleh pemilihan ragam oleh pemulia tanaman, dapat pula terjadi karena pengaruh perbedaan faktor lingkungan di habitat.

BAB 5. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan , maka dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S r-DNA. Mutasi terjadi baik pada *Cassava* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 60, 80, 100, 120 ppm.
2. Terdapat pita protein baru (berat molekul 100 kDa), pita protein hilang (berat molekul 60 kDa), dan protein yang pitanya konsisten muncul dan tebal (25 kDa). Pita protein pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *Cassava* terhadap *Fusarium oxysporum*. Protein dengan berat molekul sekitar 100 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fusarium oxysporum*.
3. Planlet cassava yang toleran terhadap penyakit layu fusarium menunjukkan adanya karakter ekspresi yang berbeda dengan planlet cassava yang tidak toleran terhadap jamur *Fusarium oxysporum*, yaitu terjadi peningkatan kandungan fenol total, kandungan gula reduksi pada planlet cassava yang toleran terhadap *Fusarium oxysporum*, seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam fusarat yang diberikan.

REFERENSI

- Aberouman, A.A. and Deokule, S.S. 2008. Comparison of Phenolic Compounds of Some Edible Plants of Iran and India. *Pakistan Journal of Nutrition*. ISSN. 7(4):582-585.
- Al-kayyis, H. K. dan Susanti, H. 2016. Perbandingan metode Somogyi-Nelson. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. 13 (2) : 81 – 89.
- Amanah, I. 2015. Penentuan Kadar Total Fenol dan Uji Aktivitas Antioksidan Kombinasi Ekstrak Sarang Semut (*Myrmecodia pendens* Merr. & L.M Perry) dan Ekstrak Kencur (*Kaempferia galanga* Linn.) dengan Metode B-Carotene Bleaching. (Tesis) Jurusan Pendidikan Kimia Fmipa Universitas Negeri Yogyakarta.
- Amponsah SK., Bobobee EYH, Agyare WA, Okyere JB, Aveyire J, King SR, and Sarkodie-Addo J. 2014. Mechanical Cassava Harvesting As Influenced by Seedbed Preparation and Cassava Variety. *American Society of Agricultural and Biological Engineers*. ISSN 0883-8542. Vol. 30(3): 391-403.
- Anonymous. 2013. *Statistik Harga Komoditas Pertanian Tahun 2013*. Pusat Data dan Sistem Informasi Pertanian (Pusdatin). Jakarta.
- Anonymous. 2015. *Produksi Ubi Kayu*. Tersedia Online <https://www.bps.go.id/>, Diakses pada 06 Februari 2020.
- Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. and Leslie, J.F.1996. Production of Fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied Env Microbiol*. 62:4039-4043.
- Bintang, M. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta : Erlangga.
- Brinegar C, 2009. Assessing Evolution and Biodiversity in Plants at the Molecular Level. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 5 (2): 149-159.
- Chen CM, de la Cerda KA, Kaminski JE, Douhan GW, & Wong FP. 2009. Geographic Distribution and rDNA ITS Region Sequence Diversity of *Waitea circinata* var. *circinata* Isolated from Annual Bluegrass in the United States. *Plant Disease* (93) 9: 906-911.
- Corina, V. A.,Dempsey, D. A. and Klessig, D. F. 2009. Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annu. Rev. Phythopathol* 47:177-206.
- Damayanti, F. 2010. Peningkatan Ketahanan Pisang Kepok (*Musa Paradisiaca* L) Hasil Kultur Jaringan Terhadap Penyakit Layu *Fusarium* Melalui Seleksi Asam Fusarat. *Jurnal Ilmiah Fakor Exacta*. 3 (4): 310-319.
- Eleazu, OC., Eleazu, KC. and Kolawole S. 2014. Use of indigenous technology for the production of high quality cassava flour with similar food qualities as wheat flour. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*. 13: 249-256.
- Esmail NM, Al-Doss AA, and Barakat MN. 2012. *In vitro* selection for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and detection of genetic polymorphism via RAPD analysis in carnation. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (23): 3997-4004.
- Fatmawaty, A.A., Hermita, N., Nursaprudianti, M., RR, J.E. dan Hastuti, D. 2020.

- Uji Efektivitas Ekstrak Daun Talas Beneng (*Xanthosoma Undipes* K.Koch) Sebagai Pengendali Jamur *Fusarium oxysporum* Pada Tanaman Pisang Secara *In Vitro*. *Jur. Agroekotek*. 12 (1) : 87-98.
- Fauzi, M., Kardhinata, EH. dan Putri, LA. 2015. Identifikasi dan Inventarisasi Genotip Tanaman Ubi kayu (*Manihot esculenta* Crantz.) di Kabupaten Serdang Bedagai Sumatera Utara. *Jurnal Online Agroteknologi*. 3 (3): 1082– 1088. ISSN No. 2337- 6597.
- Gunanti, M., Ulia, F., Sri, D. 2010. Karakterisasi Protein *Larnea cyprinacea* dengan metode elektroforesis SDS-PAGE. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. 2 (1) : 61-66.
- Hartati, S., Rustiani, U.S., Puspasari, L.T. dan Kurniawan, W. 2016. Kompatibilitas Vegetatif *Fusarium oxysporum* dari Beberapa Tanaman Inang. *Jurnal Agrikultura*. 27 (3) : 132-139. ISSN 0853-2885.
- Inayati. 2016. Ketahanan Terimbas Tanaman Kacang-kacangan terhadap Penyakit. *Iptek Tanaman Pangan*.11(2): 175-186.
- Jacob, P. 2019. Proximate analysis and SDS-PAGE protein profile of Cassava Leaves MOJES. 4(1):1–5.
- Nelson, N. 1944. A Photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. *Journal Biol.Chem*. 153 (2) : 375-379.
- Nurcahyani E**, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. Terakreditasi SK No. 110/DIKTI/Kep/2009. ISSN: 1411-7525. Vol. 12 /No. 1: 12-22.
- Nurcahyani E**. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Disertasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 201 p. Tidak Dipublikasikan.
- Nurcahyani, E.**, Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi galur planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Nurcahyani E.**, R. Agustina, & T.T. Handayani. 2016a. The Protein Profile of the Plantlets of *Spathoglottis plicata* Bl. Induced Resistance to *Fusarium oxysporum*. *Journal of Plant Science* 4(5): 102-105.
- Nurcahyani E.**, Rochmah Agustina, Erdi Suroso, & Gardis Andari. 2016b. Analysis of Peroxidase Enzyme and Total Phenol from Ground Orchid (*Spathoglottis plicata* Bl) as Result of the *In Vitro* Fusaric Acid Selection Toward To *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Applied Agricultural Science* 2(6): 79-82.
- Nurcahyani E.**, Sumardi I, Hadisutrisno B., & Suharyanto E., 2017. DNA Pattern Analysis of *Vanilla planifolia* Andrews Plantlet which Resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *WJPLS* 3(4): 27-34.

- Nurcahyani E**, Yulianty, Suharyanto E. 2018. In Vivo Study: Characterization of Mutants *Vanilla planifolia* Andrews Resistant To Fusarium Wilt Disease Based On Analysis of the Lignin and the Phenol Content. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* Volume 11, Issue 3 Ver. I. PP: 15-18.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Irawan B, Sari EY, Sari TL. 2019a. In Vitro Study: Induced Resistance of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Plantlet Against *Fusarium oxysporum* Based on Analysis of Phenol Content. *WJPLS*, Vol. 5, Issue 2, 195-198.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Irawan B, Sari EY, Sari TL. 2019b. Analisis Pola DNA Planlet Cassava (*Manihot Esculenta* Crantz.) Hasil *Induced Resistance* Terhadap *Fusarium oxysporum*. *Journal of Tropical Upland Resources*, Vol. 1, No. 01, 93-102.
- Nurcahyani**, Sumardi, Qudus HI, Palupi A, Sholekhah. 2019c. Analysis of Chlorophyll *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Results of the Resistance to *Fusarium oxysporum* and Drought Stress. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)*. Volume 12, Issue 11 Ser. I.: 41-46.
- Nurcahyani E**, Sumardi, Qudus HI, Wahyuningsih S, Sholekhah, Palupi A. 2020. In Vitro Selection *Phalaenopsis amabilis* (L.) Bl. Plantlets Result of Induced Resistance With Fusaric Acid. *World Journal of Pharmaceutical and Life Sciences. WJPLS*. Vol. 6, Issue 2, 25-28.
- Pamungkas, J.D., Khairul, A. dan Dewi, K. 2016. Penentuan Total Kadar Fenol dari Daun Kersen Segar, Kering dan Rontok (*Muntingia calabura* L.) Serta Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, ISSN: 1410=8917, 19(1).
- Putri, Oktavia S.D., Ika, R.S., dan Syamsudin D. 2014. Pengaruh Metode Inokulasi Jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*(sacc.) Terhadap Kejadian Penyakit Layu *Fusarium* Pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill. *Jurnal HPT* (2) 3 ISSN: 2338-4336.
- Salisbury, Frank B. and Ross, C.W. 1995. Fisiologi Tumbuhan Jilid 2. Bandung : ITB.
- Sari, E.Y. 2019. Analisis Pola DNA dan Karakterisasi Planlet Cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) Hasil Iinduced Resistance Dengan Asam Fusarat Terhadap *Fusarium oxysporum* Secara *In Vitro*. (Tesis) Jurusan Biologi Fmipa Universitas Lampung.
- Singh, V.K., and Upadhyay, R.S. 2014. Fusaric Acid Induced Cell Death and Changes in Oxidative Metabolism of *Solanum lycopersicum* L. *Botanical Studies*. p: 55-66.
- Soelistijono, R. 2015. Kajian Efektifitas *Rhizoctonia* SP Mikoriza Dataran Rendah dan Sedang pada Tingkat Keparahan Penyakit (Dsi) Anggrek *Phalaenopsis amabilis* terhadap *Fusarium* sp. *Biosaintifika*. ISSN 2085-191X. 7(2): 113-119.
- Srinivas, C., Devi, D.N., Murthy, K.N., Mohan, C.D., Lakshmeesha, T.R., Singh, B., Kalagatur, N.K., Niranjana, S.R., Hashem, A., Alqarawi, A.A., Tabassum, B., Abd_Allah, E.F., and Nayaka, S.C. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Causal Agent of Vascular Wilt Disease of Tomato: Biology to Diversity-A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26: 1315-1324.
- Sumardiyono, C., Suharyanto, Suryanti, Rositasari, Chinta. 2015. Deteksi Pengimbasan Ketahanan Pisang Terhadap Penyakit Layu *Fusarium* Dengan Asam Fusarat. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. 19(1): 40-44.

Widiantara, T., Herveily. dan Afiah, D.N. 2018. Pengaruh Perbandingan Gula Merah Dengan Sukrosa Dan Perbandingan Tepung Jagung, Ubi Jalar Dengan Kacang Hijau Terhadap Karakteristik Jenang. *Pasundan Food Technology Journal*. 5(1).



33

**SURAT PERJANJIAN (KONTRAK) PEKERJAAN
PELAKSANAAN KEGIATAN PASCASARJANA**

**NOMOR : 1510/UN26.21/PN/2020
TANGGAL : 24 Maret 2020**

ANTARA

**PEJABAT PEMBUAT KOMITMEN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
UNIVERSITAS LAMPUNG**

DAN

**Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (Ketua)
PENANGGUNGJAWAB KEGIATAN PENELITIAN DENGAN JUDUL Analisis
Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan Karakter Spesifik Mutan Cassava
(Manihot esculenta Crantz.) Resisten Fusarium oxysporum**

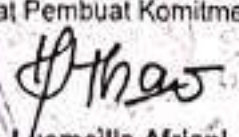
**FAKULTAS FMIPA
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2020**

RINGKASAN KONTRAK

Kegiatan yang dananya berasal dari DIPA BLU Universitas Lampung

1. No /Tgl DIPA : DIPA-023 17.2 677516/2020, 27 Desember 2019
2. Kode Keg /Sub.Keg/MAK : 4257 011 001 053 C.625119 Tahun Anggaran 2020 (Penelitian)
3. No. dan Tanggal SPK : 1510/UN26 21/PN/ 2020 tanggal 23 Maret 2020
4. Nama Penanggungjawab : Dr. Endang Nurcahyani, M.Si /Penanggung Jawab Kegiatan Penelitian Institusi Unila
5. Alamat Penanggungjawab : Jl Prof. Sumantri Brojonegoro No. 1 Bandar Lampung
6. Nomor Pokok Wajib Pajak : 25 821 330 5 542 000
7. Nilai SPK/Surat Perjanjian : Rp 40.000.000,-
8. Uraian dan volume Pekerjaan : Penelitian dengan Judul "Analisis Sequencing ITS r-DNA, Profil Protein dan Karakter Spesifik Mutan Cassava (Manihot esculenta Crantz.) Resisten Fusarium oxysporum".
9. Cara Pembayaran :
 1. Kegiatan penelitian pembayaran angsuran I (satu) sebesar 70% (dari nilai pekerjaan) atau $70\% \times \text{Rp } 40.000.000,-$ yakni sebesar Rp 28.000.000,- (*Dua Puluh Delapan Juta Rupiah*), setelah surat perjanjian pelaksanaan pekerjaan ini ditandatangani oleh kedua belah pihak dan menyerahkan proposal-proposal kegiatan tersebut dari Pihak Kedua kepada Pihak Pertama
 2. Kegiatan penelitian pembayaran angsuran II (dua) sebesar 30% (dari nilai pekerjaan) atau $30\% \times \text{Rp } 20.000.000,-$ yakni sebesar Rp 12.000.000,- (*Dua Belas Juta Rupiah*), setelah pekerjaan selesai 100% dinyatakan dengan Berita Acara Serah Terima pekerjaan dan menyerahkan laporan hasil kegiatan dari Pihak Kedua kepada Pihak Pertama
 3. Pembayaran tersebut di atas dilakukan melalui kas Badan Layanan Umum (BLU) ke Rekening Pihak Kedua pada Bank **BNI Tanjung Karang** dengan nomor rekening 0070747211, a.n. **Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.** sebagai penanggung jawab kegiatan penelitian **PASCASARJANA** Universitas Lampung.
10. Jangka waktu pelaksanaan : 185 (Seratus Delapan Puluh Lima) kalender terhitung tanggal 23 Maret – 24 September 2020
11. Tanggal Penyelesaian Pekerjaan : 24 September 2020
12. Jangka waktu Pemeliharaan : -
Ketentuan Sanksi :
 1. Apabila terjadi ketelambatan pekerjaan tanpa adanya alasan yang diterima oleh pemberi pekerjaan dikenakan sanksi/denda sebesar 1/1000 (satu permil) untuk setiap hari keterlambatan dengan denda maksimal sebesar 5%, (lima persen) dari jumlah harga borongan.
 2. Segala resiko yang timbul akibat keterlambatan pekerjaan tersebut ini sepenuhnya menjadi beban dan tanggung jawab pihak II. Maka kami sebagai pihak I dapat membatalkan SPK secara sepihak dan pihak II tidak berhak menuntut kerugian apapun dari instansi kami.

Bandar Lampung, 24 Maret 2020
Pejabat Pembuat Komitmen LPPM Universitas Lampung.


Dr. Ir. Lusmeilla Afriani, DEA.
NIP 196505101993032008

LAPORAN
PENELITIAN UNGGULAN UNIVERSITAS LAMPUNG



ANALISIS SEQUENSING ITS r-DNA DAN KARAKTER
SPEKIFIK MUTAN *Vanilla planifolia* Andrews TAHAN
Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae

TIM PENELITI:

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si. (NIDN: 0031106503)
Dra. Yulianty, M.Si. (NIDN: 0013076504)

KATEGORI
Penelitian Dasar

Berdasarkan Surat Penugasan Penelitian Unggulan
Tahun Anggaran 2017
Nomor Kontrak: 808/UN26.21/PP/2017

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
November
2017

HALAMAN PENGESAHAN
LAPORAN PENELITIAN UNGGULAN UNIVERSITAS LAMPUNG

Judul Penelitian : Analisis Sequencing ITS r-DNA dan Dampak Terhadap Lingkungan Mutan *Vanilla planifolia* Andrews Tahan *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

Kode>Nama Rumpun Ilmu : 113/Biologi (Bioteknologi)

Ketua Peneliti

a. Nama Lengkap : **Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.**
b. NIDN : 0031106503
c. Jabatan Fungsional : Lektor
d. Program Studi/Jur : Biologi, FMIPA, Universitas Lampung
e. Nomor Hp : 085228255200
f. E-mail : endang.nurcahyani@fmipa.unila.ac.id

Anggota Peneliti

a. Nama Lengkap : **Dra. Yulianty, M.Si.**
b. NIDN : 0013076504
c. Program Studi/Jur : Biologi, FMIPA, Universitas Lampung

Lama Penelitian : 5 bulan

Biaya Penelitian : Rp. 35.000.000,- (Tiga Puluh Lima Juta Rupiah)

Bandar Lampung, 2 November 2017

Mengetahui,
Dekan FMIPA Unila

(Prof. Warsito, S.Si., D.E.A., Ph.D.)
NIP/NIK 197102121995121001

Ketua Peneliti

(Dr. ENDANG NURCAHYANI M.Si.)
NIP/NIK 196510311992032003

Menyetujui,
Ketua LP2M Unila

(Warsono, Ph.D.)
NIP/NIK 196302161987031003

IDENTITAS DAN URAIAN UMUM

1. Judul Penelitian: Analisis Sequensing ITS r-DNA dan Karakter Spesifik Mutan *Vanilla planifolia* Andrews Tahan *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*

2. Tim Peneliti

No	Nama	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)
1	Dr. Endang Nurcahyani, M.Si.	Ketua	Molekular Bioteknologi Tumbuhan	Universitas Lampung (Unila)	10
2	Dra. Yulianty, M.Si.	Anggota	Botani/Mikologi	Universitas Lampung (Unila)	5

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Mutan *Vanilla planifolia* Andrews, Asam fusarat, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (**Jenis material yang akan diteliti**), Penelitian molekular Sequensing ITS r-DNA dan kerapatan stomata serta kandungan klorofil (**Segi penelitian**).

4. Masa Pelaksanaan

Mulai : bulan: Juni, tahun: 2017

Berakhir : bulan: November, tahun: 2017

5. Usulan Biaya: Rp. 35.000.000,-

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan): Laboratorium Kultur Jaringan & Rumah Kasa, Jurusan Biologi, FMIPA Universitas Lampung; Laboratorium Rekayasa Genetika, Pusat Studi Bioteknologi, UGM; Laboratorium Terpadu Biomassa, Universitas Lampung.

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

Universitas Gadjah Mada, terutama Pusat Studi Bioteknologi, Laboratorium Rekayasa Genetika. Kontribusi dari instansi tersebut berperan dalam menganalisis bidang molekular yaitu Sequensing ITS r-DNA mutan *Vanilla planifolia* Andrews. Kerjasama ini akan diwujudkan dengan melibatkan seorang staf teknisi pada instansi tersebut.

8. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang akan mendukung pengembangan iptek)

Teori mekanisme *Induce Resistance* *Vanilla planifolia* terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* berdasarkan urutan basa DNA (analisis sequencing

daerah ITS-1 rDNA dan ITS-2 rDNA), secara ilmiah **memberikan kontribusi bidang analisis molekular**. Dengan diketahuinya urutan basa DNA nya, membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan vanili tahan terhadap *Fov*.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala ilmiah dan tahun rencana publikasi)

Publikasi direncanakan akan disebarluaskan melalui media Jurnal/Seminar International sebagai berikut:

a) **Word Journal of Pharmacheutical and Life Science (WJPLS)**, Terindeks Google Scholar, Copernicus etc. SJIF Impact Factor 4.223 (2017); ICV: 51.31; url: www.wjpls.org

Tahun rencana publikasi: 2018

Judul rencana publikasi: “*Characterization of Mutants Vanilla planifolia Andrews Resistant to Fusarium oxysporum based on ITS rDNA Sequences*”

b) **The International Conference on Biological Science (ICBS)**. Fakultas Biologi-Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Tahun rencana penyelenggaraan: 2017

Judul yang akan diseminarkan: “*Analysis of resistance, the chlorophyll content and the density of stomata of Vanilla mutants which resistant to Fusarium wilt disease in vivo.*”

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
IDENTITAS DAN URAIAN UMUM	iii
DAFTAR ISI	v
RINGKASAN	vi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
BAB 5. KESIMPULAN	16
REFERENSI	23
LAMPIRAN-LAMPIRAN	27
1. Sertifikat ICBS 2017	27
2. POSTER: ICBS 2017	28
3. Artikel: ICBS 2017	29

RINGKASAN

Penelitian tentang *Induced Resistance* planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) dengan asam fusarat (AF) telah dilakukan sebelumnya, dan ditemukan indikasi konsentrasi AF toleran untuk seleksi planlet *in vitro* yang tahan. Inokulasi isolat jamur *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* (*Fov*) pada planlet tahan dilakukan secara *in vitro*, dilanjutkan dengan analisis DNA dan profil protein dari *V. planifolia* yang tahan terhadap *Fo*, dibandingkan dengan kontrol.

Hasil dari penelitian sebelumnya, berupa Pita DNA baru (spesifik) yang mempunyai ukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19), dan diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet terhadap *Fov*; Pita protein baru (berat molekul ± 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan mutan *V. planifolia* tahan terhadap *Fov*, yaitu dengan analisis *sequencing*.

Tujuan jangka panjang dalam keseluruhan penelitian ini adalah memperoleh bibit mutan *V. planifolia* yang tahan terhadap *Fov*. **Target khusus** yang ingin dicapai adalah **1)** mengetahui urutan basa nukleotida gen mutan *V. planifolia* tahan *Fov* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dengan analisis *sequencing*, **2)** Uji ketahanan dan karakterisasi *V. planifolia* yang tahan *Fov* secara *in vivo*.

Tahapan kegiatan yang dilakukan meliputi: **1)** Analisis *sequencing* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA diharapkan akan diperoleh urutan basa nukleotida gen 18 S ITS-1, 5,8 S ITS-2 dan 28 S rDNA yang mengindikasikan mutan *V. planifolia* tersebut tahan *Fo*, **2)** Analisis ketahanan dan karakterisasi mutan yaitu kerapatan stomata dan klorofil untuk memperoleh karakter spesifik mutan tahan *Fov*.

Kriteria ketahanan vanili setelah di inokulasi dengan *Fov* secara *in vivo* pada hari ke-29 (0 ppm) kontrol adalah rentan, 90 ppm dan 100 ppm kriterianya moderat. Pada konsentrasi AF 110 ppm kriteria ketahanannya adalah tahan dengan intensitas penyakit hingga 25%. Planlet vanili yang tahan terhadap *Fov* memiliki karakter ekspresi yang berbeda dengan planlet yang tidak tahan. Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada *vanili* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 90, 100, 110 ppm.

Kata kunci : Mutan *Vanilla planifolia*; ITS rDNA; *Sequencing*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae*; *in vivo*

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang dan Permasalahan

Salah satu komoditas perkebunan di Indonesia dan di Provinsi Lampung khususnya, dengan nilai ekonomi yang cukup tinggi dan telah mempunyai nama cukup baik di pasaran Internasional adalah vanili. Di pasaran internasional vanili Indonesia dikenal dengan sebutan *Java Vanilla Beans* karena mempunyai kualitas terbaik dengan kadar *vanillin* 2,75% (Hadipoetyanti, 2007). *United Nations Development Programme* (UNDP), merekomendasikan bahwa vanili Indonesia tidak berbeda dari "Bourbon vanili" yang memiliki citra komoditas sangat baik di masyarakat internasional (Umamaheswari & Mohanan, 2011).

Penyakit BBV disebabkan oleh jamur *Fusarium oxysporum* f.sp. *vanillae* (*Fov*) yang dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar dengan akibat matinya tanaman 50 - 100%, atau bahkan tidak dapat berproduksi serta mutu buah yang berasal dari tanaman yang sakit sangat rendah (Hadisutrisno, 2004). Salah satu alternatif cara pengendalian penyakit yang aman, efisien dan efektif serta aman terhadap lingkungan, antara lain menggunakan varietas yang tahan.

Asam fusarat (AF) merupakan metabolit yang dihasilkan oleh beberapa spesies jamur dari genus *Fusarium*. Secara kimia AF disebut *5-n-butylpicolinic acid*. Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan *mutant* yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen (Arai dan Takeuchi, 1993). Identifikasi mutan atau varian yang insensitif terhadap AF dengan seleksi *in vitro* pernah dilakukan pada tanaman tomat (Toyoda *et al.*, 1984), pisang (Morpurgo *et al.*, 1994; Matsumoto *et al.*, 1995), gladiol (Remotti *et al.*, 1997), nanas (Borras *et al.*, 2001), dan vanili (Nurchayani *et al.*, 2012; Nurchayani, 2013; Nurchayani *et al.*, 2014). Hasil penelitian para peneliti tersebut menunjukkan bahwa somaklonal dari hasil regenerasi *massa* sel yang tahan terhadap toksin tersebut juga tahan terhadap patogen, dan sifat ini diturunkan pada generasi berikutnya.

Berdasarkan penelitian sebelumnya diperoleh luaran berupa **kandidat mutan** *V. planifolia* tahan *Fov*. Kandidat mutan tersebut, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru (spesifik) yang mempunyai ukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19) benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet *V. planifolia* tahan *Fov*, yaitu dengan analisis *sequencing*. Dengan demikian kajian **yang diajukan pada Proposal Penelitian ini** adalah menganalisis sekuens daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA. Mutan *V. planifolia* selanjutnya di aklimatisasi di rumah kaca, sehingga diperoleh mutan yang sudah beradaptasi dengan lingkungan luar (*in vivo*). Analisis ketahanan *V. planifolia* dan makropropagasi mutan tersebut selanjutnya dilakukan untuk memperoleh ketahanan mutan *V. planifolia* tahan *Fov* secara *in vivo*. Karakterisasi mutan berupa kerapatan stomata dan klorofil dilakukan selanjutnya untuk memperoleh karakter spesifik mutan tahan *Fov*.

Berdasarkan latar belakang diatas maka diperlukan penelitian yang lebih mendalam tentang *Induced Resistance* mutan *V. planifolia* tahan busuk batang vanili berdasarkan analisis molekularnya, sehingga akhirnya akan diperoleh teori baru untuk mendukung pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi (IPTEK).

B. Tujuan Khusus

Tujuan khusus yang akan dicapai dalam penelitian ini adalah:

1. Mengetahui urutan basa nukleotida gen mutan *V. planifolia* tahan *Fov* pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dengan analisis *sequencing* untuk memperkuat Teori *Induced Resistance* vanili terhadap *Fov*.
2. Mengetahui karakter dan uji ketahanan mutan *V. planifolia* yang tahan *Fov* secara *in vivo* sehingga diperoleh kriteria ketahanan dan karakter spesifik mutan *V. planifolia* tahan *Fov*.

C. Urgensi Penelitian

Rencana penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya (Hibah Penelitian Disertasi Doktor). Penelitian yang diajukan dalam proposal ini sangat penting untuk dilanjutkan dalam rangka mengetahui dan mengkaji lebih

mendalam mutan *V. planifolia* tahan *Fov* yang dihasilkan pada penelitian sebelumnya dan dampaknya secara langsung terhadap lingkungan. Data awal dalam analisis dampak mutan *V. planifolia* terhadap lingkungan penting dilakukan karena data ini diperlukan dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru (mutan *V. planifolia* tahan *Fov*).

Hasil analisis molekular yang telah dicapai dalam penelitian sebelumnya adalah ditemukannya Pita DNA baru (spesifik) dengan ukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19). Pita baru tersebut dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Pita protein baru (berat molekul \pm 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Protein dengan tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fov*.

Kandidat mutan *V. planifolia* tahan *Fov* yang diperoleh pada penelitian sebelumnya, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita DNA baru (spesifik) tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet *V. planifolia* tahan *Fov* yaitu dengan analisis *sequencing*.

Mutan *V. planifolia* selanjutnya di aklimatisasi di rumah kaca, dan dilanjutkan dengan analisis ketahanan dan makropropagasi. Karakterisasi mutan berupa kerapatan stomata dan kadar klorofil dilakukan untuk memperoleh karakter spesifik mutan tahan *Fov*. Analisis dampak terhadap lingkungan mutan *V. planifolia* dilakukan pula untuk memperoleh data awal dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Apabila uji coba bibit *V. planifolia* mutan tahan *Fov* di rumah kaca tersebut berhasil, kemudian dilanjutkan uji coba dilapangan (Rencana penelitian selanjutnya) pada daerah-daerah endemik vanili yang terkena penyakit busuk batang vanili (*Fov*), dan apabila uji di lapangan tersebut berhasil maka selanjutnya bibit mutan diusulkan untuk dipatenkan, dan lisensinya ditawarkan ke perusahaan swasta untuk diproduksi massal.

Dalam jangka panjang, hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat petani vanili pada khususnya dalam memperoleh bibit vanili *V.*

planifolia yang tahan penyakit busuk batang, sehingga nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual vanili *V. planifolia* serta pendapatan petani vanili di Indonesia.

Temuan yang ditargetkan dalam proposal penelitian yang diajukan ini adalah:

- a) **Teori** tentang mekanisme *Induce Resistance* *V. planifolia* terhadap *F.oxysporum* f.sp. *vanillae* (*Fov*) yang didasarkan atas urutan basa DNA dengan analisis sequencing daerah ITS r-DNA. Dengan diketahuinya urutan basa DNA nya, maka dapat memperkuat pendapat bahwa adanya pita baru pada pola DNA dan Profil protein *V. planifolia* pada penelitian sebelumnya, membuktikan bahwa gen tersebut adalah gen yang benar-benar menyebabkan vanili tahan terhadap *Fov* (mutan vanili). Teori baru ini secara ilmiah dapat memberikan kontribusi bidang analisis molekular.
- b) **Data awal** dalam menentukan kebijakan penggunaan varietas baru. Tata kerja diatur dalam Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 61/Permentan/Ot.140/10/2011 Tentang Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas (Anonymous, 2010). **Data awal** ini dapat mendukung pengembangan iptek di bidang pemuliaan dan lingkungan hidup.

2. TINJAUAN PUSTAKA

A. Ketahanan terimbas (*induced resistance*).

Pengendalian penyakit secara hayati dapat melalui interaksi antara populasi patogen dan agens hayati baik secara langsung maupun tidak langsung. Ketahanan terimbas bersifat tidak spesifik terhadap jenis patogen, sehingga dapat lebih efisien dalam pelaksanaannya (Agrios 2005). Beberapa parameter dapat menggambarkan terjadinya mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen antara lain peningkatan senyawa fenol, peningkatan enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein), dan adanya lignifikasi (Vidhyasekaran, 1997; Agrawal *et al.*, 1999; Lea & Leegood, 1999).

Enzim peroksidase (termasuk kelompok PR-protein) merupakan salah satu senyawa yang dapat menggambarkan mekanisme ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Vidhyasekaran, 1999). Hal ini sudah diidentifikasi pada akar tanaman pisang yang terinfeksi oleh *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* (Saravanan *et al.*, 2004), dan vanili yang terinfeksi oleh *F.oxysporum* f. sp. *vanillae* (Nurcahyani, 2013).

Contoh aplikasi gen peroksidase yang diekspresikan dengan reporter *gus* (β -glucuronidase) pada tomat (*Lycopersicon esculentum*) telah dilaporkan oleh Medina (1999), demikian pula pada ketela rambat (*Ipomoea batatas*) (Jang *et al.*, 2004). Enzim peroksidase yang diinduksi oleh patogen berbagai tumbuhan juga telah dilaporkan, misalnya pada mentimun (*Cucumis sativus*) (Alkahtani *et al.*, 2011), *Eustoma grandiflorum* (Popa *et al.*, 2009), kacang tanah (Ye & Ng, 2002), kacang kapri (Luhova *et al.*, 2003), *Phytolacca dioica* L (Guida *et al.*, 2010), dan Nurcahyani (2013) pada vanili.

B. Tanaman *Vanilla planifolia* Andrews

Vanili merupakan tumbuhan epifit dan termasuk ke dalam familia Orchidaceae. Genus vanili terdiri dari sekitar 150 spesies, tetapi yang bernilai ekonomis hanya 3 spesies yaitu *V. planifolia* Andrews, *V. tahitensis* J. Wi Moore dan *V. pompona* Schieda (Besse *et al.*, 2004; Minoo *et al.*, 2008; Umamaheswari & Mohanan, 2011). Spesies yang banyak dibudidayakan, khususnya di Indonesia

adalah *V. planifolia* Andrews (Anandaraj *et al.*, 2005; Rajeev P & Dinesh R, 2005; Palama *et al.*, 2010).

International Standar Organization (ISO) telah menetapkan spesifikasi vanili yang diperdagangkan di seluruh dunia. Secara nasional telah ditetapkan oleh Dewan Standardisasi Nasional dengan nama Standar Nasional Indonesia (SNI). Standar ini meliputi definisi, klasifikasi, syarat mutu, cara pengambilan contoh, cara uji, syarat penandaan, dan cara pengemasan. Pada SNI ini produk vanili digolongkan dalam empat jenis mutu, yaitu mutu IA, mutu IB, mutu II, dan mutu III (Hadipoentyanti *et al.*, 2007). Perkembangan mutu vanili Indonesia sesuai selera pasar diharapkan merupakan vanili bermutu paling baik, yaitu mutu IA meliputi ukuran polong dan kadar vanilinya yang tinggi. Mutu IA yang digemari konsumen akan diperoleh bila buah berasal dari tanaman yang sehat dan sedikit pestisida kimiawi.

C. Penyakit Layu *Fusarium* (Penyakit busuk batang vanili)

Fusarium oxysporum f. sp. *vanillae* (Fov) patogen pada tanaman vanili dapat bertahan secara alami di dalam medium tumbuh dan pada akar-akar tanaman sakit. Apabila terdapat tanaman peka, melalui akar yang luka dapat segera menimbulkan infeksi. (Semangun, 2001; Hadisutrisno, 2004). Perakaran menjadi busuk dan dapat meluas ke atas sampai ke pangkal batang. Jika akar rimpang dipotong akan tampak bahwa epidermis dan hipodermis berwarna ungu, sedang *phloem* dan *xylem* berwarna ungu merah jambu muda. Akhirnya seluruh akar rimpang menjadi berwarna ungu (Semangun, 2001)

Fusarium oxysporum terkenal karena menyebabkan kondisi yang disebut **layu Fusarium**, yang mematikan bagi tanaman. Pada saat tanaman menunjukkan tanda-tanda gejala penyakit dari infeksi patogen, maka untuk pengendaliannya sudah terlambat, dan tanaman akan mati. Selain itu, *F. oxysporum* tidak diskriminatif, mereka dapat menyebabkan penyakit di hampir setiap tanaman pertanian penting. *F. oxysporum* terbukti sangat sulit diberantas karena spora *F. oxysporum* juga dapat bertahan di udara untuk jangka waktu yang lama, sehingga rotasi tanaman bukan merupakan metode kontrol yang tepat (Djaenuddin, 2003).

D. Asam fusarat

Asam fusarat (AF) diketahui merupakan hasil metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur *Fusarium heterosporum* Nee. dan salah satu toksin yang bertanggung jawab terhadap timbulnya gejala layu pada beberapa tanaman (Landa *et al.*, 2002).

Bouizgarne *et al.* (2006) menyatakan konsentrasi AF yang nontoksik (di bawah 10^{-6} M) dapat mengimbas sintesis fitoaleksin, suatu bentuk tanggapan tanaman untuk menghambat aktivitas patogen. Melalui metode ini telah banyak dilakukan penelitian dan telah berhasil mendapatkan sifat ketahanan terhadap penyakit layu *Fusarium* seperti pada pisang, gandum, anyelir dan planlet vanili secara *in vitro* (Nurchayani *et al.*, 2012; Nurchayani *et al.*, 2014). Penggunaan AF sebagai agens penyeleksi dalam seleksi *in vitro* dapat menghasilkan sel atau jaringan mutan yang insensitif terhadap AF, sehingga setelah diregenerasikan menjadi tanaman dapat menghasilkan galur yang resisten terhadap infeksi patogen.

E. Analisis Sequencing daerah ITS rDNA

Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) nuklear ribosomal DNA (rDNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S r DNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga. (Brinegar, 2009).

Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R) (Baldwin *et al.*, 1995; Baldwin & Markos, 1998). Penelitian tentang identifikasi strain tanaman alga *Porphyra haitanensis* Chang et Sheng (Bangiales, Rhodophyta) melalui penanda molekular ITS-5,8S rDNA telah dilakukan. Penanda ITS rDNA dapat mengidentifikasi 10 strain dari *species* alga tersebut (Chen *et al.*, 2010). Penelitian tentang divergensi jamur *Waitea circinata* var. *circinata* pada wilayah distribusi geografi di Amerika pada *annual bluegrass*, dengan penanda sekuen daerah ITS rDNA telah

dilakukan. Dari penelitian ini diketahui bahwa *W. Circinata* var. *circinata* memiliki divergensi patogen yang tinggi berkaitan dengan adaptasinya terhadap *annual bluegrass* di berbagai habitat di Amerika serikat (Chen *et al.*, 2009).

F. Hasil penelitian Sebelumnya yang sudah dicapai

Proposal yang diajukan dalam penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian disertasi pengusul. Hasil penelitian yang sudah dicapai sebelumnya adalah diperolehnya mutan *V. planifolia* tahan penyakit busuk batang, dengan kesimpulan sebagai berikut.

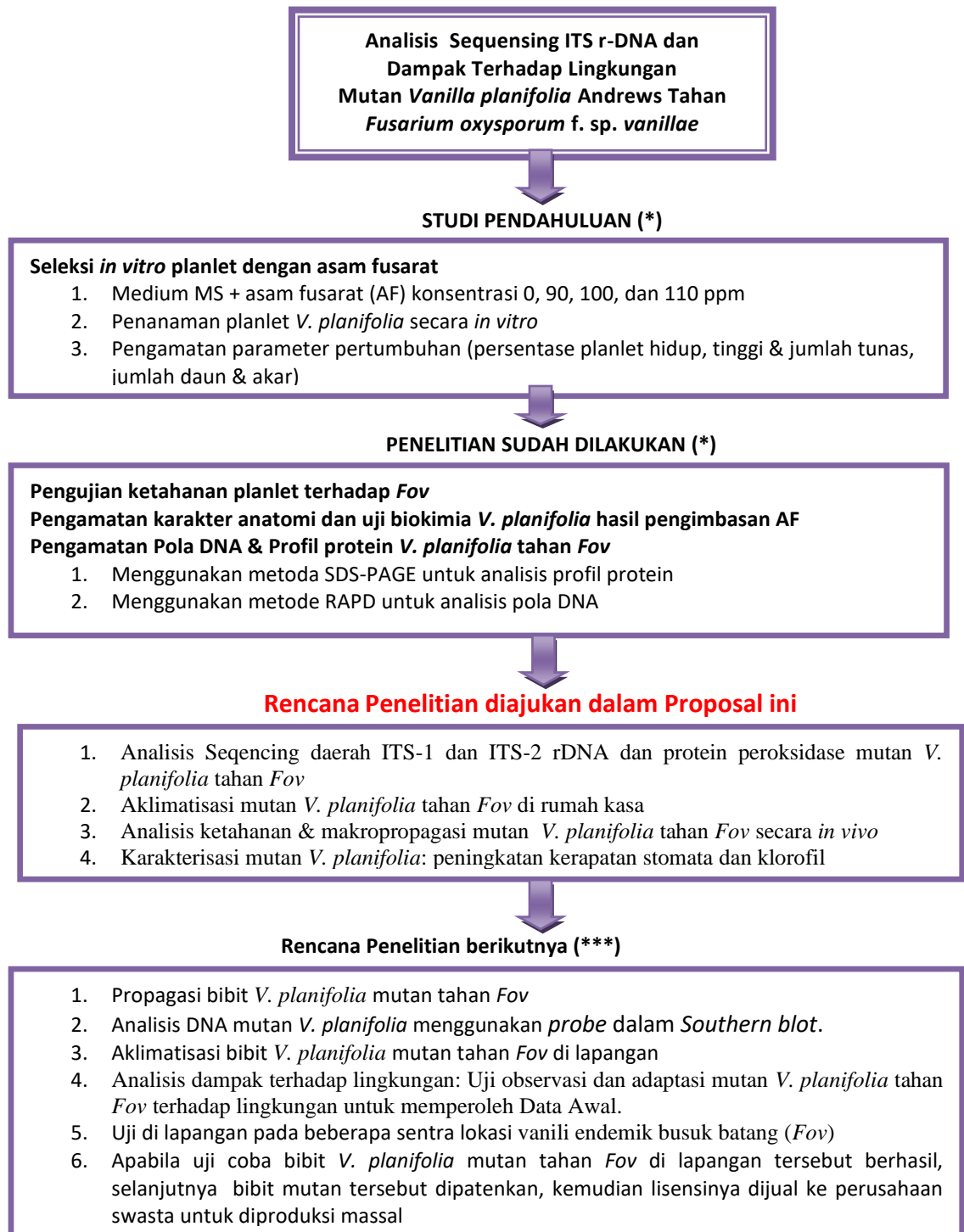
1. Kisaran konsentrasi Asam Fusarat toleran untuk seleksi planlet *V. planifolia* secara *in vitro* adalah 90-110 ppm
2. Secara *in vitro* penekanan jamur *Fo* menggunakan Asam Fusarat konsentrasi 110 ppm lebih efektif dibandingkan dengan konsentrasi 90 dan 100 ppm, konsentrasi AF 110 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga mampu menekan intensitas penyakit hingga 25%, dan menaikkan kriteria ke tahan
3. Semakin meningkat konsentrasi Asam Fusarat maka meningkat pula aktivitas enzim peroksidase dan ketebalan lignin pada planlet *V. planifolia* tahan *Fov*
4. Pita DNA baru (spesifik) mempunyai ukuran bervariasi tergantung dari primer yang digunakan. Pita DNA spesifik dengan ukuran 930 bp (OPB_14), 430 bp (OPB_20), serta 230 bp dan 270 bp (OPD_19) 1400 bp (OPB_14) dan 1250 bp (OPB_20), dapat diprediksi sebagai kandidat marker RAPD untuk ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Pita DNA spesifik tersebut dapat dijadikan sebagai karakter untuk mengelompokkan dan memisahkan planlet *V. planifolia* yang tidak diimbas (kontrol) dan diimbas AF. Pita protein (berat molekul ± 18 kD) pada SDS-PAGE 1D mengindikasikan terbentuknya ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*. Protein dengan berat molekul sekitar 18 kD tersebut diprediksi merupakan protein peroksidase, yang berperan di dalam ketahanan terhadap *Fov*.
5. Mutan *V. planifolia* tahan *Fov* yang diperoleh pada penelitian sebelumnya, selanjutnya perlu dikaji lebih mendalam untuk memastikan apakah pita

DNA baru (spesifik) tersebut benar-benar merupakan protein peroksidase yang menyebabkan planlet *V. planifolia* tahan *Fov* yaitu dengan analisis *sequencing* (diusulkan dalam proposal ini). Mutan *V. planifolia* selanjutnya di aklimatisasi di rumah kaca, dan dilanjutkan dengan analisis ketahanan dan makropropagasi. Karakterisasi mutan berupa kerapatan stomata dan kadar klorofil dilakukan untuk memperoleh karakter spesifik mutan tahan *Fov* (di teliti pada proposal ini)

6. Apabila uji coba bibit *V. planifolia* mutan tahan *Fov* di rumah kaca tersebut berhasil, kemudian dilanjutkan uji coba dilapangan (Rencana penelitian berikutnya) pada daerah-daerah endemik vanili yang terkena penyakit busuk batang vanili (*Fov*), dan apabila uji di lapangan tersebut berhasil maka selanjutnya bibit mutan diusulkan untuk dipatenkan, dan lisensinya ditawarkan ke perusahaan swasta untuk diproduksi massal.
7. Dalam jangka panjang, hasil penelitian ini diharapkan dapat membantu masyarakat petani vanili pada khususnya dalam memperoleh bibit *V. planifolia* yang tahan penyakit busuk batang, sehingga nantinya diharapkan akan dapat meningkatkan kembali kualitas, produksi, dan daya jual serta pendapatan petani vanili di Indonesia.

Peta Jalan (*Road Map*) penelitian disajikan pada Gambar 1 sebagai berikut.

Roadmap riset



Keterangan:

(*) Penelitian Pendahuluan & Penelitian yang sudah dilakukan

(**) Penelitian yang akan dilakukan dalam proposal ini (PUU.2017)

(***)Rencana Penelitian yang akan dilakukan setelah kegiatan yang diusulkan dalam proposal ini selesai

Gambar 1. Road Map Penelitian

BAB III. METODE PENELITIAN

Berikut ini diuraikan metode penelitian dari tahap kegiatan yang diusulkan dalam proposal Tahun I ini.

1. *Polymerase Chain Reaction (PCR) daerah ITS rDNA mutan V. plicata tahan Fov*

DNA yang digunakan dalam penelitian ini, adalah hasil dari isolasi DNA *V. planifolia* pada penelitian sebelumnya.

- a. Dibuat campuran PCR dengan total 25 µl di dalam tabung 200 µl dengan komposisi seperti Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Premix PCR untuk daerah ITS rDNA

Senyawa	Total 25 µl (µl)	Keterangan
KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>	22,0	Prosedur KAPPA2G <i>Fast ReadyMix</i>
Primer forward	1,00	Konsentrasi 100 µM
Primer reverse	1,00	Konsentrasi 100 µM
DNA	1,00	Konsentrasi 10 ng
Jumlah	25,00	

- b. Primer ITS DNA yang digunakan yaitu *primer forward* dengan susunan nukleotida 5-GATCGCGGCGGCGACTTGGGCGGTTC-3 (F1), dan *primer reverse* dengan susunan nukleotida 5-GGTAGTCCCGCCTGACCTGGG-3 (R1) (Ming Li *et al.*, 2011).
- c. Selanjutnya premix di amplifikasi dengan mesin PCR (*GeneAmp 2400*). Kondisi reaksi untuk pelaksanaan proses PCR-RAPD mengikuti metode Williams *et al.* (1990) yang dimodifikasi. Kemudian dilakukan elektroforesis. Selanjutnya di *running* pada tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Visualisasi band ITS rDNA target dilakukan dengan menggunakan UV transiluminator dan band yang muncul difoto dibandingkan dengan DNA *Ladder*.
- d. Dikirimkan produk PCR yang memiliki band ITS rDNA target antara 700-800 bp positif, ke 1st based Singapura sebanyak 55 µl untuk dilakukan *sequencing* daerah 18 S ITS-1; 5,8S ITS-2 dan 28S rDNA.
- e. Dilakukan *sequencing* untuk mengetahui urutan basa nukleotida gen 18 S ITS-1; 5,8S ITS-2 dan 28S rDNA. Sequencing DNA menghasilkan 2

sequence. Analisis menggunakan program *Sequence Scanner version 1.0*. Gabungan kedua *sequence* menggunakan *editSeq* dan *SeqMan* dalam *Software Suite for Sequence Analysis DNASTAR Lasergene DM version 3.0.25*. Pembanding untuk penanda ITS rDNA adalah *V. planifolia* dari GenBank.

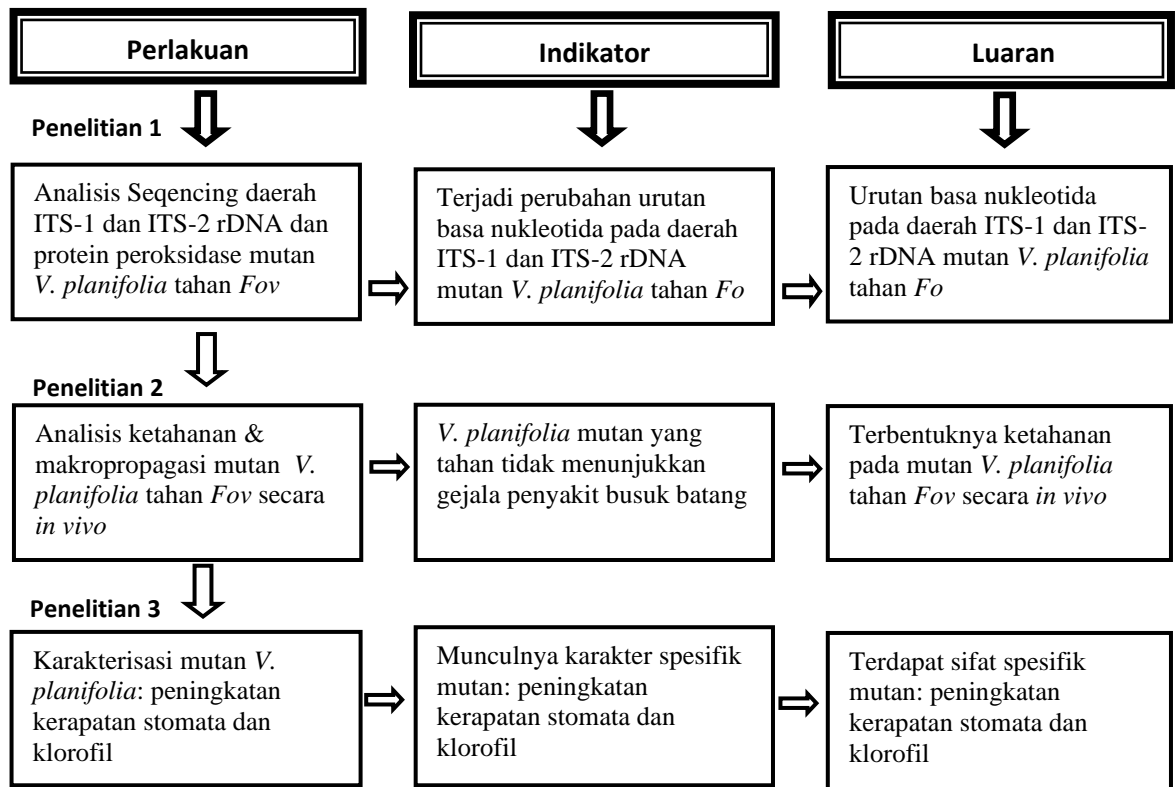
2. Analisis ketahanan mutan *V. planifolia* tahan *Fov* secara *in vivo*.

Aklimatisasi dilakukan dengan memindahkan planlet ke dalam *polybag* dan di aklimatisasikan selama 2 minggu di *rumah kaca*. Inokulasi dilakukan menurut teknik Hadisutrisno (1995). Inokulasi *Fov* dilakukan secara langsung pada *V. planifolia*. Mikrokonidium jamur *Fov* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL ditetaskan pada daun 1-2 tetes. Kemudian diinkubasikan selama 24 jam. Pengamatan dilakukan mulai hari ke-3 setelah inokulasi selama 4 minggu. Intensitas penyakit dihitung berdasarkan indeks kelayuan menurut He *et al.* (2002) yang telah dimodifikasi. Tingkat ketahanan tanaman ditentukan berdasarkan skoring dengan mengacu pada ketentuan Wibowo (2002).

3. Analisis Klorofil dan Kerapatan Stomata

Analisis klorofil dengan menggunakan metode Harbourn (1987) dengan spektrofotometer. Kadar klorofil dihitung dengan menggunakan rumus: Klorofil total = $17,3 \lambda_{646} + 7,18 \lambda_{663}$ mg/L; Klorofil a = $12,21 \lambda_{663} - 2,81 \lambda_{646}$ mg/L; Klorofil b = $20,13 \lambda_{646} - 5,03 \lambda_{663}$ mg/L. **Kerapatan Stomata** menggunakan metode dari Ruzin (1999). Dibuat potongan-potongan segi empat dari daun mutan *V. planifolia* dengan sisi ± 5 mm dan dimasukkan ke dalam tabung berisi larutan kloralhidrat dalam air (5:1). Tabung dipanasi dalam waterbath selama $\pm 10-15$ menit hingga potongan daun tersebut transparan. Potongan daun diletakkan dalam larutan kloralhidrat pada gelas benda. Permukaan yang ada stomatanya diletakkan disebelah atas, kemudian ditutup dengan gelas penutup. Preparat diamati pada 5 bagian daerah yang berlainan. Tiap sel epidermis (E) ditandai dengan (x), tiap stoma (S) ditandai dengan (O). Kerapatan stomata merupakan jumlah stomata persatuan luas daerah pengamatan. Hasil akhir adalah rata-rata dari 5 buah pengamatan.

Tahapan penelitian pada proposal penelitian PUU.2017 disajikan dalam bentuk bagan alir seperti tercantum dalam Gambar 2.



Gambar 2. Bagan Alir Tahapan Penelitian dalam Proposal ini

Analisis data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan data kuantitatif. Data kualitatif disajikan dalam bentuk deskriptif komparatif dan didukung foto. Data kuantitatif ditabulasi dengan faktor konsentrasi yang berbeda dan 5 ulangan mutan *V. planifolia* dibandingkan kontrol.

Analisis data pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), sedangkan data kuantitatif dari setiap parameter dianalisis dengan menggunakan Analisis Ragam (*Analysis of Variance*) dengan tingkat kepercayaan 95%. Apabila ada beda nyata dilanjutkan dengan Uji Jarak Berganda atau DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) pada taraf kepercayaan 95% (Gomes & Gomes, 1984).

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini terdiri dari hasil uji ketahanan planlet *V. planifolia* terhadap *Fov*, analisis kandungan klorofil dan indeks stomata, serta analisis *Sequencing* daerah ITS rDNA. Berikut pengamatan yang telah dilakukan dan pembahasan terhadap parameter seleksi *V. planifolia* dengan AF dan ketahanan *V. planifolia* terhadap *Fo* disajikan sebagai berikut.

A. Pengujian Ketahanan Planlet *V. planifolia* terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* Secara *In Vivo*

Seleksi ketahanan *V. planifolia* terhadap *F. oxysporum* f.sp. *vanillae* dilakukan secara langsung pada tanah steril dengan menginokulasikan secara langsung 1-2 tetes mikrokonidium *F. oxysporum* dengan kerapatan spora $1,7 \times 10^4$ per mL mikrokonidium secara *in vivo*. Vanili yang telah diinokulasi *F. oxysporum* diinkubasi pada suhu kamar (25°C) selama 24 jam (Hadisutrisno, 1995).

Hasil pengamatan terhadap gejala kelayuan pada daun vanili yang dilakukan setiap hari selama 4 minggu menunjukkan adanya gejala layu pada vanili. Selanjutnya, berdasarkan skoring terhadap gejala layu atau kuning yang muncul dapat ditentukan intensitas penyakit dan kriteria ketahanan pada vanili yang telah diinokulasi dengan *F. oxysporum* f. sp. *vanillae* secara *in vivo* (Wibowo, 2002). Intensitas penyakit hasil uji ketahanan *V. planifolia* disajikan dalam Tabel 4.

Tabel 2. Intensitas penyakit hasil uji ketahanan *Vanilla planifolia* pada setiap perlakuan AF

Perlakuan	Hari Pengamatan							
	5		13		21		29	
	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan	IP (%)	Kriteria Ketahanan
Kontrol	72,60	Rentan	92,69	Rentan	95,77	Rentan	100,00	Rentan
90 ppm	41,35	Moderate	43,43	Moderat	43,77	Moderat	50,00	Moderat
100 ppm	43,33	Moderate	43,77	Moderat	50,00	Moderat	50,00	Moderat
110 ppm	00,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan	25,00	Tahan

Keterangan : IP = Intensitas Penyakit

Data pada Tabel 2 menunjukkan bahwa pada hari ke-29, hari terakhir pengamatan, kriteria ketahanan pada vanili hasil perlakuan kontrol menghasilkan kriteria ketahanan yang rentan dengan intensitas penyakit mencapai 100%, sedangkan pemberian asam fusarat 90 ppm dan 100 ppm, menghasilkan kriteria ketahanan yang moderat dengan intensitas penyakit mencapai 50%. Pada perlakuan pengimbasan dengan asam fusarat pada konsentrasi 110 ppm menghasilkan vanili yang memiliki intensitas penyakit mencapai 25%, sehingga kriteria ketahanannya adalah tahan. Berdasar hal tersebut dapat diketahui bahwa intensitas penyakit perlakuan AF 110 ppm tidak mengalami peningkatan sejak hari ke-5 hingga ke-29.

Berdasarkan data intensitas penyakit dan ketahanan pada Tabel 2 di atas dapat diketahui bahwa perlakuan asam fusarat 110 ppm mampu mengimbas ketahanan yang paling baik sehingga dapat menekan intensitas penyakit hingga 25% dan menaikkan kriteria menjadi tahan. Hal ini menunjukkan bahwa AF mampu mengimbas ketahanan planlet vanili terhadap penyakit layu *Fusarium*.

Hasil penelitian ini sesuai dengan pendapat Arai dan Takeuchi (1993) yang menyatakan bahwa toksin murni AF dan filtrat AF dapat digunakan sebagai komponen seleksi karena adanya korelasi antara ketahanan terhadap toksin dengan ketahanan terhadap penyakit. Hasil penelitian ini juga mendukung pernyataan Agrios (2005) yang menyatakan bahwa ekspresi dari pengimbasan ketahanan adalah dengan menurunnya intensitas penyakit.

B. Analisis Kandungan Klorofil

Pengaruh pengimbasan asam fusarat (AF) terhadap vanili dapat diketahui terhadap kandungan klorofilnya. Kandungan klorofil diamati pada daun vanili yang diimbas dengan AF maupun kontrol. Metode analisis klorofil yang digunakan adalah metode Harboune (1987). Kandungan klorofil pada daun vanili dengan penambahan berbagai konsentrasi AF di sajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan klorofil daun vanili hasil pengimbasan asam fusarat

Perlakuan (ppm)	Kandungan Klorofil a (mg/g Jaringan)	Kandungan Klorofil b (mg/g Jaringan)	Kandungan Klorofil total (mg/g Jaringan)
0 (Kontrol)	6,802 ± 0,011 ^a	3,377 ± 0,003 ^a	1,310 ± 0,017 ^a
90	7,443 ± 0,010 ^b	4,603 ± 0,014 ^b	1,743 ± 0,012 ^b
100	8,601 ± 0,015 ^c	5,116 ± 0,013 ^c	2,370 ± 0,002 ^c
110	9,124 ± 0,018 ^d	5,605 ± 0,025 ^d	2,415 ± 0,012 ^d

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Berdasarkan Tabel 3 di atas dapat diketahui adanya peningkatan kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total pada vanili yang diperlakukan dengan asam fusarat. Peningkatan kandungan klorofil pada vanili seiring dengan meningkatnya konsentrasi asam fusarat yang diberikan. Uji BNT pada taraf nyata 5% menunjukkan bahwa kandungan klorofil a, klorofil b dan klorofil total daun vanili pada perlakuan konsentrasi AF 110 ppm lebih tinggi dari pada seluruh perlakuan lainnya.

Berdasarkan Tabel 3 dapat diketahui adanya kecenderungan pola peningkatan signifikan kandungan klorofil secara keseluruhan sejalan dengan semakin meningkatnya cekaman AF. Kandungan klorofil total pada cekaman AF 90 ppm meningkat rata-rata 1,2 kali dibandingkan kontrol, sedangkan kandungan klorofil total pada cekaman 100 ppm naik sampai 1,4 kali dan pada cekaman AF 110 ppm meningkat sampai 1,5 kali dibandingkan kontrol. Dengan kata lain bahwa kandungan klorofil pada vanili yang tahan terhadap AF memberikan kenaikan sekitar 1,5 kali dari kontrol. Hal ini memberi bukti bahwa ada peningkatan kandungan klorofil secara signifikan pada vanili yang tahan terhadap AF sekaligus tahan terhadap *Fov*.

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Suharyanto *et al.*(2007) tentang komplementasi *threonin deaminase defektif* (TD⁻) pada *Nicotiana plumbaginifolia* mutan yang ditransfer dengan cDNA TD

tanaman tomat. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas TD enzim dan asam amino isoleusin dua kali lipat dibandingkan kontrol. Disamping itu hal tersebut juga berdampak pada pertumbuhan tanaman terutama morfologis dan fisiologis.

Selain itu penelitian ini didukung pula oleh Frankard *et al.* (1991), Frankard (1992), dan Frankard *et al.* (1992), yang telah berhasil mengisolasi mutan dari *Nicotiana sylvestris* dengan agen seleksi β -Aminoethyl cystein (AEC). Tanaman progeni homozigot yang ditanam pada *greenhouse* menunjukkan pertumbuhan yang lebih baik dibandingkan tanaman *wild type*. Demikian pula fenotip tanaman mutan terutama daun, tampak lebih tebal dan lebih hijau dibandingkan kontrol. Akan tetapi tanaman mutan ini steril karena tidak membentuk bunga.

Kandungan klorofil juga pernah diteliti pada tanaman *Echinochloa crus-galli* tahan terhadap *Fenoxaprop-p-ethyl* dibandingkan kontrol. Hasilnya menunjukkan bahwa kandungan klorofil lebih meningkat dari pada tanaman yang rentan (Hamza *et al.*, 2012). Fenomena ini membuktikan bahwa vanili yang semula tercekam AF, lalu adaptif, dan akhirnya mengalami mutasi, mampu mendetoksifikasi racun tersebut dengan mengaktivasi gen peroksidase. Pertumbuhan dan perkembangan vanili yang tahan terhadap AF ini akan relatif lebih baik dibandingkan vanili yang rentan terhadap AF.

C. Analisis Kerapatan Stomata

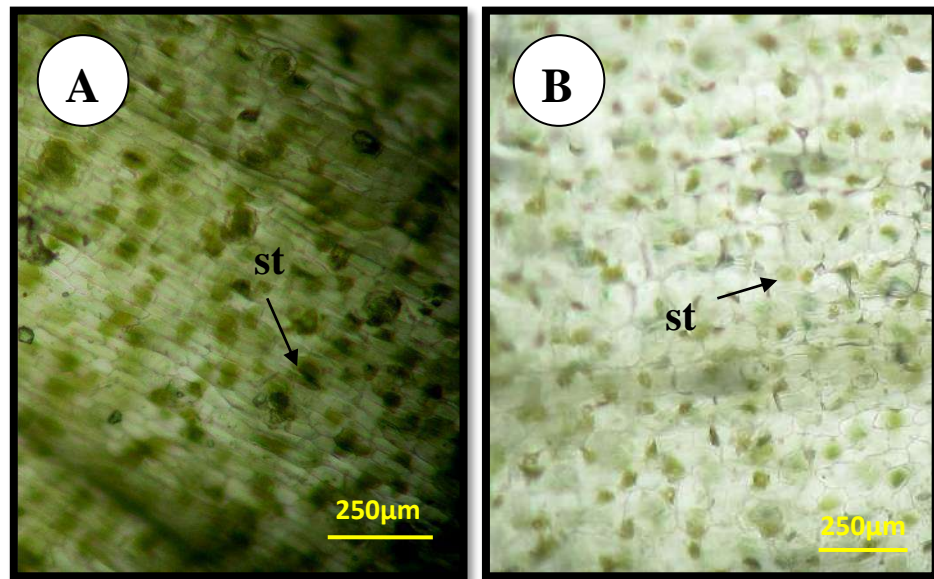
Kerapatan stomata vanili dengan berbagai konsentrasi asam fusarat yang di tanam pada secara *in vivo* di sajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Kerapatan stomata vanili hasil pengimbasan AF

Konsentrasi Asam Fusarat (ppm b/v)	Kerapatan Stomata (%)
Kontrol (0 ppm)	10,42 ± 2.0756aE-02 ^a
90	13,32 ± 0.1000E-03 ^b
100	14,48 ± 3.6160E-01 ^c
110	15,22 ± 0.8622E-02 ^d

Keterangan : Angka yang diikuti oleh huruf yang sama tidak berbeda nyata pada derajat kepercayaan 95% BNT

Tabel 4 di atas, menunjukkan adanya peningkatan kerapatan stomata dari sekitar 10,42% pada kontrol, menjadi 13,32% pada perlakuan AF 90 ppm, diikuti 14,48% pada perlakuan AF 100 ppm, 15,22% pada perlakuan AF 110 ppm, ketiga konsentrasi ini berbeda nyata terhadap kontrol.



Gambar 3. Permukaan bawah daun vanili, menunjukkan stomata (A) tidak terimbaf AF, (B) terimbaf AF dengan konsentrasi 110 ppm. st= stoma.

Berdasarkan Gambar 3, bentuk stomata terlihat seperti ginjal. Sel penutup pada stomata dikelilingi empat sel tetangga. Sel tetangga biasanya berkembang dari sel protoderm yang berdekatan dengan sel induk stoma, tetapi dapat juga berkembang dari sel induk stoma (Mulyani, 2006). Bentuk dan susunan sel epidermis daun vanili beragam. Sel epidermis daun vanili terlihat berbentuk persegi panjang serta berbentuk bulat tidak beraturan. Epidermis merupakan jaringan yang terletak paling luar pada setiap organ tumbuhan yaitu daun, batang dan akar. Epidermis memiliki fungsi khusus sebagai pelindung terhadap hilangnya air, kerusakan mekanik, perubahan suhu dan hilangnya zat-zat makanan (Aryulina *et al.*, 2006).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat pengaruh kerapatan stomata pada vanili yang mengalami cekaman kekeringan. Vanili mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya konsentrasi AF pada medium seleksi.

Selain AF, pengaruh paparan sumber emisi gas dapat mempengaruhi indeks stomata pada tumbuhan. Penelitian ini dilakukan oleh Suyitno *et al.* (2003), tanggapan stomata daun *Vaccinium varingiaefolium* menurut jarak tumbuh terhadap sumber emisi gas di kawah belerang. Hasil penelitiannya menunjukkan daun *Vaccinium* yang tumbuh pada jarak terdekat dengan emisi gas belerang indeks stomatanya lebih tinggi, artinya jumlah sel bertambah tetapi ukuran selnya menjadi kecil. Hal ini karena pengaruh kondisi lingkungan yang memberikan keadaan stress bagi tumbuhan.

Hasil penelitian berbeda dengan yang dilakukan oleh Kartikaningtyas *et al.* (2013), respon *Acacia mangium* Willd. terhadap cekaman garam memberikan pengaruh nyata terhadap penurunan indeks stomata, panjang stomata, dan lebar stomata. Hal ini diakibatkan karena cekaman garam mengalami toksisitas garam akibat konsentrasi ion yang tinggi, sehingga menyebabkan tanah mengalami hipertonis dan terjadi kekurangan air.

Indeks stomata pada daun yang mengalami stress lingkungan jumlah stomata akan meningkat, tetapi peningkatan tersebut lebih karena mengecilnya ukuran sel-sel epidermis sehingga jarak stomata akan lebih dekat (Wahyudi *et al.*, 2008). Faktor-faktor yang berpengaruh kuat terhadap indeks stomata, konduktivitas stomata serta laju transpirasi diantaranya seperti intensitas cahaya, kelembaban udara, kecepatan angin, kadar air dan kelembaban tanah (Suyitno *et al.*, 2003).

D. Analisis Sequencing daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA mutan *Vanilla planifolia* tahan *Fov*

Sampel vanili yang digunakan untuk penanda molekular dengan analisis ITS DNA, yaitu yang mewakili pada analisis RAPD. Amplifikasi daerah ITS dilakukan dengan menggunakan pasangan primer F1 (5'GATCGCG GCGGCGACTTGGGCGGTT-3') sebagai primer *forward* dan R1 (5'-GGTAGTCCCGCCTG ACCTGGG-3') sebagai primer *reverse* (Mueller *et al.*, 2008).

Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Hal tersebut sesuai dengan analisis dengan metoda ITS

rDNA, yang telah dilakukan oleh peneliti terdahulu pada tumbuhan berbiji (Baldwin & Markos, 1995; Baldwin *et al.*, 1998; Chase *et al.*, 2005).

Daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) nuklear ribosomal DNA (rDNA) adalah bahan genetik nonstruktural, berada di daerah gen 18S; 5,8S dan 28S rDNA. Daerah ITS-1 berada antara gen 18S dan 5,8S, sedangkan ITS-2 antara gen 5,8S dan 28S. Daerah ITS ini secara umum merupakan daerah yang bersifat *conserve* dalam *species*, sehingga dapat menjadi pembeda antar *species* atau marga. (Brinegar, 2009). Teknik ini berdasarkan pada reaksi polimerasi berantai (PCR) dengan primer tertentu yaitu forward (F) dan reverse (R) (Baldwin *et al.*, 1995; Baldwin & Markos, 1998).

Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada vanili yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 90, 100, 110, dan 120 ppm. Adanya mutasi pada vanili perlakuan dapat disebabkan karena semula melalui persilangan alami, kemudian diikuti oleh pemilihan ragam oleh pemulia tanaman, dapat pula terjadi karena pengaruh perbedaan faktor lingkungan di habitat.

BAB V. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang sudah dicapai dalam penelitian ini, dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Pada semua perlakuan, amplifikasi daerah ITS rDNA terdeteksi pada pita ukuran 600-700 bp. Berdasarkan perbandingan susunan basa nukleotida, setiap kultivar mengalami mutasi baik pada daerah 18S, ITS 1, 5,8S, ITS2, maupun 26S rDNA. Mutasi terjadi baik pada *vanili* yang diperlakukan dengan asam fusarat konsentrasi 90, 100, 110 ppm.
2. Kriteria ketahanan vanili setelah di inokulasi dengan *Fusarium oxysporum* f. sp *vanillae* pada hari ke-29 (0 ppm) kontrol adalah rentan, 90 ppm dan 100 ppm kriterianya moderat. Pada konsentrasi AF 110 ppm kriteria ketahanannya adalah tahan; Kandungan klorofil a, b, dan total pada daun vanili serta kerapatan stomata yang tahan terhadap *Fov* mengalami peningkatan dibandingkan kontrol.

REFERENSI

- Agrawal AA, Tuzun S, & Bent E. 1999. *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores, Biochemistry, Ecology, and Agriculture*. APS Press, St. Paul, Minnesota. 390 p.
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Academic Press. New York. 922 p.
- Alkahtani M, Omer SA, El-Naggar MA, Abdel-Kareem EM, & Mahmoud MA. 2011. Pathogenesis-related Protein and Phytoalexin Induction Against Cucumber Powdery Mildew by Elicitors. *International Journal of Plant Pathology* 2(2): 63-71.
- Anandaraj M, Rema J, Sasikumar B, & Suseela-Bhai R. 2005. *Vanilla (Extension Pamphlet)*. Printers Castle, Kochi. 11p.
- Anonymous. 2010. *Pedoman Pengujian, Penilaian, Pelepasan dan Penarikan Varietas Tanaman Perkebunan*. Ditjenbun.Jakarta.
- Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojecichowski, Campbell CS, & Donoghue MJ. 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Annals of Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277.
- Baldwin BG & Markos S. 1998. Phylogenetic Utility of the ETS of 18S-26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of Calycadenia (Compositae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* (10) 3: 449-463.
- Besse P, Da Silva D, Bory S, Grisoni M, Le Bellec F, & Duval MF. 2004. RAPD Genetic Diversity in Cultivated Vanilla: *Vanilla planifolia*, and Relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science* 167: 379-385.
- Bouizgarne, B, Bouteau HEM, Frankart C, Reboutier D, Madiona K, Pennarun AM, Monestiez M, Trouverie J, Amiar Z, Briand J, Brault M, Rona JP, Ouhdouch Y, & Hadrami EI. 2006. Early Physiological Responses of *Arabidopsis thaliana* Cells to Fusaric Acid : Toxic and Signalling Effects. *New Phytologist* 169: 209 – 218.
- Boras O, Santos R, Matos A, Cabral P, & Arzola RS. 2001. A First Attempt to Use A *Fusarium subglutinans* Culture Filtrate For The Selection of Pineapple Cultivar to Fusariose Disease. *Plant Breeding* 120(5): 345-438.
- Brinegar C, 2009. Assessing Evolution and Biodiversity in Plants at the Molecular Level. *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology* 5 (2): 149-159.
- Chen CM, de la Cerda KA, Kaminski JE, Douhan GW, & Wong FP. 2009. Geographic Distribution and rDNA ITS Region Sequence Diversity of *Waitea circinata* var. *circinata* Isolated from Annual Bluegrass in the United States. *Plant Disease* (93) 9: 906-911.

- Gomes KA & Gomes AA. 1984. *Prosedur Statistik untuk Penelitian Pertanian*, Edisi ke-2. Terjemahan dari: *Statistical procedures for Agricultural Researchs*. Syamsudin E & Baharsyah JS. UI Press. Jakarta.
- Guida V, Criscuolo G, Tamburino R, Malorni L, Parente A, & Di Maro A. 2010. Purification and enzymatic properties of a peroxidase from leaves of *Phytolacca dioica* L. (Ombú tree). *BMB Reports*. <http://bmbreports.org>. Diakses 25 Januari 2013.
- Hadipoentyanti E, Ruhayat A, Udarno L. 2007. *Booklet Teknologi Unggulan Tanaman Perkebunan: Vanili*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan. 21 p.
- Hadisutrisno B. 1995. Kajian Pengendalian Hayati Penyakit Busuk Batang Vanili dengan Isolat Lemah *Fusarium batatatis* Tucker. *Buletin Ilmiah Azolla* 21: 27-35.
- Hadisutrisno B. 2004. *Taktik dan Strategi Perlindungan Tanaman Menghadapi Gangguan Penyakit Layu Fusarium*. Makalah Simposium Nasional I di Purwokerto, 2-3 Maret.
- Jang IC, Park SY, Kim KY, Kwon SY, Kim JG, & Kwak SS. 2004. Differential Expression of 10 Sweetpotato Peroxidase Genes in Response to Bacterial Pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 451-455.
- Djaenuddin N, 2003. Bioekologi dan Pengelolaan Penyakit Layu Fusarium: *Fusarium oxysporum*. Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros. pp. 67-71.
- Landa BB, Cachinero-Diaz JM, Lemanceu P, Jimenez-Diaz RM, & Alabouvette C, 2002. Effect of Fusaric Acid and Phytoanticipins on Growth of Rhizobacteria and *Fusarium oxysporum*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 971-985.
- Lea P. & Leegood RC. 1999. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. 364 p.
- Luhova L, Lebeda A, Hedererova D, & Pec P. 2003. Activities of Amine Oxidase, Peroxidase and Catalase in Seedlings of *Pisum sativum* L. Under Different Light Conditions. *Plant Soil Environ* 49: 151-157.
- Marzuki I. 2014. *Pengenalan Varietas Unggul Pala Dan Cengkih*. Makalah. Disampaikan pada Pertemuan Evaluasi Dan Tukar Menukar Informasi/Teknologi Antar POPT dan PBT Lingkup BBPPTP Ambon Tanggal 4 November 2014.
- Matsumoto K, Barbosa ML, Souza LAC, & Teixeira JB. 1995. Race 1 Fusarium Wilt tolerance on banana plants selected by Fusaric Acid. *Euphytica* 84: 67-71.
- Medina MI, Quesada MA, Pliego F, Botella MA, & Valpuesta V. 1999. Expression of The Tomato Peroxidase Gene TPX1 in NaCl-Adapted and Unadapted Suspension Cells. *Plant Cell Reports* 18: 680-683.

- Minoo D, Jayakumar VN, Veena SS, Vimala J, Basha A, Saji KV, Babu KN, & Peter KV. 2008. Genetic Variations and Interrelationships in *Vanilla planifolia* and Few Related Species as Expressed by RAPD Polymorphism. *Genet. Resour Crop Evol* 55: 459-470.
- Morpurgo R, Lopato SV, Afza R, & Novak FJ. 1994. Selection parameters for Resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and 4 on Diploid Banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* 75: 121-129.
- Nurchayani E, Sumardi I, Hadisutrisno B, & Suharyanto E. 2012. Penekanan Perkembangan Penyakit Busuk Batang Vanili (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*) Melalui Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro*. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika*. Terakreditasi SK No. 110/DIKTI/Kep/2009. ISSN: 1411-7525. Vol. 12 /No. 1: 12-22
- Nurchayani E. 2013. Karakterisasi Planlet Vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Hasil Seleksi Asam Fusarat Secara *In Vitro* Terhadap *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Disertasi*. Fakultas Biologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 201 p. Tidak Dipublikasikan.
- Nurchayani, E., Hadisutrisno, B., Sumardi, I., & Suharyanto, E. 2014. Identifikasi ~~gaur~~ planlet vanili (*Vanilla planifolia* Andrews) Resisten terhadap infeksi *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae* hasil seleksi *in vitro* dengan asam fusarat. *Prosiding Seminar Nasional: "Pengendalian Penyakit Pada Tanaman Pertanian Ramah Lingkungan"*. Perhimpunan Fitopatologi Indonesia Komda Joglosemar-Fakultas Pertanian UGM. ISBN 978- 602-71784-0-3./2014 Hal. 272- 279.
- Popa G, Brezeanu A, Cornea CP, & Boe JP. 2009. Peroxidase Activity in *Eustoma grandiflorum* Plants Transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Rom. J. Biol.– Plant Biol* 54:41-46.
- Rajeev P & Dinesh R. 2005. *Vanilla* (Extension Pamphlet). VA. Parthasarathy, Indian Institute of Spices Research. Printers Castle. Kochi.
- Remotti PC, Löffler HJM & Loten-Doting LV. 1997. Selection of Cell Lines and Regeneration of Plants Resistance to Fusaric Acid from *Gladiolus x grandiflorus* cv. 'Peter Pear'. *Euphytica* 96: 237 – 245.
- Saravanan T, Bhaskaran R, & Muthusamy M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (cv. Rasthali) against *Fusarium* Wilt Disease. *Plant Pathology Journal* 3: 72-80.
- Semangun H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Tombe M. 2010. *Teknologi Ramah Lingkungan Dalam Pengendalian Terpadu penyakit Busuk Batang Vanili (BBV)- Orasi Pengukuhan Profesor Riset Bidang Fitopatologi (Hama dan Penyakit Tanaman)*. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Jkt. <http://pustaka.litbang.deptan.go.id/berita.b100405b.pdf>. Diakses 14 juni 2010.

- Toyoda H, Hayashi H, & Yamamoto K. 1984. Selection of Resistance Tomato Calli to Fusaric Acid. *Ann. Phytophatol. Soc. Japan.* 50: 538-540.
- Umamaheswari R & Mohanan KV. 2011. A Study of the Association of Agronomic Characters in *Vanilla planifolia* Andrews. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 5 (1): 53-58.
- Vidhyasekaran P. 1997. *Fungal Pathogenesis in Plants and Crops, Molecular Biology and Host Defense Mechanism.* Marcel Dekker. New York. 553 p.



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS LAMPUNG
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT
GEDUNG REKTORAT LANTAI 5
Jalan. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung 35145
Telp. (0721) 705173, 701609 Ext. 136 Fax 773798 email.lppm@kpa.Unila.ac.id

**SURAT PENUGASAN
PENELITIAN UNGGULAN
TAHUN ANGGARAN 2017**

Nomor : 808 /UN26.21/PP/2017

Pada hari ini Kamis tanggal Dua Puluh Tujuh bulan Juli tahun Dua Ribu Tujuh Belas, saya yang bertandatangan dibawah ini

Nama Warsono, Ph D
NIP 196302161987031003
Jabatan Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat (LPPM)
Universitas Lampung
Alamat Jin Prof. Soemanten Brojonegoro No 1 Gedung Meneng Bandar Lampung

Dengan ini menugaskan kepada peneliti

Nama Dr. Endang Nurcahyani, M Si
NIP 196510311992032003
Jabatan Ketua Peneliti
Fakultas MIPA

Untuk melakukan tugas Penelitian UNGGULAN yang didanai oleh DIPA BLU Universitas Lampung Tahun Anggaran 2017, dengan judul **ANALISIS SEQUENSING ITS r-DNA DAN KARAKTER SPESIFIK MUTAN *Vanilla Planifolia Andrews TAHAN Fusarium oxysporum f. Sp. Vanillae***

Surat Penugasan Penelitian ini didasari oleh :

- 1 Peraturan Pemerintah Republik Indonesia No 19 Tahun 2005 tentang Standar Nasional Pendidikan, Peraturan Pemerintah Nomor 23 Tahun 2005, Tentang Pengelolaan Keuangan badan Layanan Umum (BLU), sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 74 Tahun 2012,
- 2 Keputusan Presiden Nomor 73 tahun 1966 tentang Pendirian Unila,
- 3 Keputusan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan Nomor 256/MPN A4/KP/2011 tentang Pengangkatan Rektor Unila,
- 4 Peraturan Menteri Keuangan Nomor 129/KMK 05/2009 Tentang Penetapan Unila Pada Departemen Pendidikan Nasional sebagai Instansi Pemerintah yang Menerapkan Pengelolaan Keuangan Badan Layanan Umum,
- 5 Peraturan Menteri Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor 6 Tahun 2015 tentang Statuta Universitas Lampung
- 6 Keputusan Menteri Pendidikan dan Kebudayaan RI Nomor 72 Tahun 2014 tentang Organisasi dan Tata Kerja Universitas Lampung,
- 7 Keputusan Rektor Universitas Lampung Nomor 18/UN26/OT/2015 tentang berdirinya LPPM Unila,
- 8 Keputusan Rektor Universitas Lampung Nomor 25/UN26/KP/2015 tentang Pengangkatan Ketua dan Sekretaris Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM) Universitas Lampung,
- 9 Surat perjanjian yang ditandatangani antara Pejabat Pembuat Komitmen Universitas Lampung dengan Ketua Lembaga Penelitian Universitas Lampung Nomor : 4095/UN26/KU/2017 Tentang Pelaksanaan Kegiatan Penelitian Unggulan

KEWAJIBAN – KEWAJIBAN YANG HARUS DIPENUHI

PASAL 1

Pelaksanaan penugasan penelitian sebagaimana dimaksud, nilai penugasan penelitiannya adalah sebesar Rp 35000000,- (Tiga Puluh Lima Juta Rupiah) yang dananya bersumber dari dana DIPA BLU Universitas Lampung Tahun Anggaran 2017.

PASAL 2

Pembayaran penugasan penelitian ini dilaksanakan dalam 2 (dua) Tahap yaitu :

- (1) Pembayaran Tahap Pertama, sebesar 70% dari nilai kontrak = Rp. 24500000,-(Dua Puluh Empat Juta Lima Ratus Ribu Rupiah) dibayarkan setelah surat perjanjian ini ditanda tangani oleh kedua belah pihak.
- (2) Pembayaran Tahap Kedua, sebesar 30% dari nilai kontrak = Rp. 10500000,-(Sepuluh Juta Lima Ratus Ribu Rupiah) dibayarkan setelah Peneliti menyerahkan laporan Akhir dan laporan keuangan Hasil Pelaksanaan Penelitian yang telah dilaksanakan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Lampung, disertai dengan Berita Acara Serah Terima Laporan Akhir dan Surat Pertanggung Jawaban Mutlak.

PASAL 3

Hal-hal dan segala sesuatu yang berkenaan dengan kewajiban pajak berupa PPN dan/atau PPh menjadi tanggung jawab PIHAK KEDUA dan harus dibayarkan ke Kas Negara sesuai dengan ketentuan peraturan perundang undangan yang berlaku.

PASAL 4

- (1) Peneliti melaksanakan penelitian sesuai dengan proposal yang telah disetujui oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung Tahun 2017.
- (2) Peneliti berkewajiban untuk mengupayakan hasil penelitiannya untuk dapat dipublikasikan baik dalam jurnal ilmiah di lingkungan Universitas Lampung maupun diluar Universitas Lampung.

PASAL 5

- (1) Dana penelitian yang diperoleh oleh peneliti dimanfaatkan sebenar-benarnya untuk pembiayaan penelitian yang dilaporkan kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung.
- (2) Perubahan-Perubahan dalam pelaksanaan penelitian dapat dibenarkan apabila telah mendapat persetujuan lebih dahulu dari Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung.

PASAL 6

- (1) Peneliti harus menyelesaikan Penelitian yang dimaksud dan menyerahkan : Laporan Akhir dan Laporan Keuangan selambat- lambatnya tanggal 7 November 2017
- (2) Laporan sebagaimana dimaksud dalam pasal 6 ayat (1) disampaikan dalam bentuk hardcopy (sebanyak 3 eksemplar) dan softcopy (sebanyak 2 keping CD).
- (3) Peneliti diwajibkan menyerahkan artikel ilmiah yang siap di publikasikan.
- (4) Bentuk/ukuran, format penulisan dan warna cover Sesuai dengan panduan yang telah ditetapkan.

PASAL 7

- (1) Apabila Peneliti (ketua) sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 tidak dapat menyelesaikan penelitian ini, maka peneliti wajib menunjuk pengganti ketua pelaksana sesuai dengan bidang ilmu yang diteliti dan merupakan salah satu anggota tim yang diketahui oleh Dekan Fakultas dan disetujui oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Unila
- (2) Apabila batas waktu penelitian habis peneliti belum menyerahkan hasil pekerjaan seluruhnya maka peneliti akan dikenakan denda sebesar 1 o/oo (satu permil) setiap hari keterlambatan sampai dengan setinggi-tingginya 5% (lima persen) dari nilai surat Penugasan Pelaksanaan Penelitian, terhitung dari tanggal jatuh tempo yang telah ditetapkan sampai dengan berakhirnya pembayaran dana Penelitian oleh PUMK Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung Peneliti tetap harus menyelesaikan pekerjaan dengan menyerahkan laporan penelitian sesuai dengan ketentuan pasal 6
- (3) Bagi peneliti yang tidak menyerahkan laporan hasil penelitian dalam akhir tahun anggaran yang sedang berjalan dan waktu proses pencairan biayanya telah berakhir maka sisa biaya atau dana penelitian yang bersangkutan, yang belum sempat dicairkan dinyatakan hangus dan peneliti wajib mengembalikan dana penelitian yang sudah dicairkan untuk dikembalikan ke Kas Negara.
- (4) Apabila Peneliti tidak dapat memenuhi pasal-pasal sebagaimana diatur dalam Perjanjian Penugasan Penelitian ini, maka Peneliti wajib mengembalikan seluruh dana penelitian yang telah diterimanya kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung untuk selanjutnya disetorkan ke Kas Negara.
- (5) Apabila dikemudian hari terbukti bahwa judul penelitian sebagaimana dimaksud pada Pasal 1 dijumpai adanya indikasi duplikasi dengan penelitian lain dan/atau diperoleh indikasi ketidak jujuran dan iktikad kurang baik yang tidak sesuai dengan kaidah ilmiah, maka penelitian tersebut dinyatakan batal dan Peneliti wajib mengembalikan dana penelitian yang telah diterimanya kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat Universitas Lampung untuk selanjutnya disetor ke Kas Negara

PASAL 8

Surat Penugasan Penelitian ini dibuat rangkap 2 (dua), dan masing-masing bermeterai sesuai dengan ketentuan yang berlaku, dan biaya meterainya dibebankan kepada PIHAK KEDUA.

PASAL 9

1. Jika terjadi perselisihan antara kedua belah pihak, pada dasarnya akan diselesaikan secara musyawarah.
2. Jika perselisihan itu tidak dapat diselesaikan secara musyawarah, maka akan diselesaikan oleh "Panitia Pendamai" yang berfungsi sebagai juri/wasit, yang dibentuk dan diangkat oleh kedua belah pihak yang terdiri :
 - Seorang wakil dari **PIHAK PERTAMA** sebagai anggota;
 - Seorang wakil dari **PIHAK KEDUA** sebagai anggota;
 - Seorang **PIHAK KETIGA** yang ahli sebagai Ketua, yang telah disetujui oleh **PIHAK PERTAMA** dan **PIHAK KEDUA**.
3. Keputusan Panitia Pendamai ini mengikat kedua belah pihak, dan biaya penyelesaian perselisihan yang dikeluarkan akan ditanggung secara bersama.
4. Jika Keputusan ini sebagai mana dimaksud ayat 3 pasal ini tidak dapat diterima oleh salah satu pihak, maka penyelesaian perselisihan akan diteruskan melalui Pengadilan Negeri.
5. Segala akibat yang terjadi dari pelaksanaan perjanjian ini, kedua belah pihak memilih kedudukan (domisili) yang tetap dan sah di Kantor Pengadilan Negeri Bandar Lampung

PASAL 10

Segala sesuatu yang belum diatur dalam surat perjanjian ini, atau perubahan-perubahan yang dipandang perlu oleh kedua belah pihak, akan diatur lebih lanjut dalam Surat Perjanjian Tambahan (Adendum) dan merupakan perjanjian yang tidak terpisahkan dari perjanjian ini

PIHAK PERTAMA,

Ketua LPPM
Universitas Lampung



PIHAK KEDUA,

Ketua /Selaku
Penanggung Jawab Penelitian

Dr. Endang Nurcahyani, M.Si
NIP. 196510311992032003

LAMPIRAN KEPUTUSAN REKTOR UNIVERSITAS LAMPUNG

NOMOR : 844/UN26.21/PP/2017

TANGGAL : 13 JULI 2017

TENTANG : PEMENANG HIBAH PENELITIAN PROFESOR, PENELITIAN
UNGGULAN DAN PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS
LAMPUNG TAHUN 2017.

NAMA-NAMA KETUA DAN JUDUL PENELITIAN
PEMENANG HIBAH PENELITIAN PROFESOR, PENELITIAN UNGGULAN DAN
PENELITIAN PASCASARJANA UNIVERSITAS LAMPUNG TAHUN 2017

1. PENELITIAN PROFESOR

No	Ketua	Judul
1	Prof. Dr. Ir. Sutopo Hadi, M.Sc	Pemanfaatan Potensi Senyawa Turunan Trifenil Timah (IV) Benzoat Sebagai Bahan Alternatif Antimalaria
2	Prof. Dr. Ir. Udin Hasanudin, M.T	Studi Biorefinery dari Limbah Tapioka Terintegrasi
3	Prof. Dr. Ir. Hamim Sudarsono, M.Sc	Pengendalian Hama Cassava Mealybug (Phenacoccusmanihoti): Asesmen Tingkat Serangan: Evaluasi Efikasi Musuh Alami, dan Insektisida Kimiawi
4	Prof. Dr. Ir. Yandri, M.S	Konversi Enzimatis Pati Menjadi Sirup Glukosa Menggunakan Enzim #-Amilase Amobil dari Bakteri Lokal Bacillus subtilis ITBCCB148
5	Prof. Dr. Ir. Rosma Hasibuan, M.Sc	Diversitas Morfologi dan Genetik Wereng Jagung dan Potensinya sebagai Vektor Penyakit Layu Jagung di Provinsi Lampung
6	Prof. Dr. Posman Manurung	Sintesis dan Karakterisasi Nanosilika Berbasis Batu Apung Dari Tanggamus dan Lampung Barat
7	Prof. Dr. Yusnita	Studi Keragaman Morfologi, Genotipik dan perbanyak Klonal kopi robusta (Coffea canephora Pierre ex A Froehner) Unggulan kopi Lampung Untuk mendukung Pemuliaan Tanaman dan Ketersediaan bibit
8	Prof. Agustinus Bambang Setiadi, Ph. D	Pengembangan Model Interaksi Komponen MotivasiBerbasis Kelokalan untuk mengidentifikasi Keberhasilan Belajar Bahasa Inggris di Indonesia
9	Prof. Dr. Muhammad Akib, S.H.,M.Hum	Model Kebijakan Hukum Kerja Sama Antardaerah Dalam Pengelolaan Lingkungan Hidup Berbasis Prinsip Ekoregion di Provinsi Lampung
10	Prof. Dr. Heryandi, S.H.,M.S	Harmonisasi dan Sinkronisasi Pengaturan Perencanaan Pembangunan Desa di Wilayah Pesisir Lampung
11	Prof. Sudjarwo	Pengembangan Model Pendidikan Dasar Berbasis Pendekatan Multi Budaya Dan Kearifan Lokal Di Kota Bandar Lampung

12	Prof. Dr. Satria Bangsawan	Desain Model dan Kebijakan pengembangan pariwisata masa depan berbasis Green Tourism di Provinsi Lampung
----	----------------------------	--

2. PENELITIAN UNGGULAN

No	Ketua	Judul
1	Dr. JUNAIDI, S.Si ., M.Sc.	Pembuatan larutan silver nanowires (AgNWs) dengan variasi berat molekul polivinil pirolidone (PVP) sebagai capping agent untuk aplikasi elektroda transparan sel surya (Solar Cell)
2	WAYAN SUANA, S.Pd., M.Si.	Desain dan Implementasi Pembelajaran Fisika dengan Pendekatan Saintifik melalui Model Blended Learning
3	Dr. NANDANG KOSASIH A, M.A.	Evaluasi Program Pendidikan Alternatif Di Kota Bandar Lampung
4	Dr. NOVERMAN DUADJI, M.Si.	Model Percepatan Kota Bandar Lampung Menjadi Kota Layak Anak
5	Dr. ENDANG NURCAHYANI, M.Si.	ANALISIS SEQUENSING ITS r-DNA DAN KARAKTER SPESIFIK MUTAN <i>Vanilla planifolia</i> Andrews TAHAN <i>Fusarium oxysporum f. sp. vanillae</i>
6	WAHYU HIDAYAT, S.Hut., M.Sc.	Pengaruh Perlakuan Pendahuluan terhadap Sifat Fisis-Mekanis Material Maju “Hybrid Particleboard” dari Kayu Rakyat Cepat Tumbuh dan Bambu
7	Prof. Dr. Ir MURHADI., M.Si	Identifikasi dan Pola Senyawa Antimikroba dari Produk Etanolisis Minyak Inti Sawit (Palm Kernel Oil/PKO)
8	DWI DIAN NOVITA, S.T.P.,M.Si.	Pengembangan electronic nose untuk mengevaluasi kemurnian kopi luwak menggunakan Jaringan saraf tiruan
9	Dr. BAMBANG IRAWAN, M.Sc.	Pengembangan inokulum fungsi tahan asam untuk peningkatan spora, viabilitas dan kualitas kompos seresah
10	GURUM AHMAD PAUZI, S.Si , M.T.	Peningkatan Daya Listrik dan Penurunan Laju Korosi pada Plat Elektrode Melalui Penambahan Sodium Bikarbonat (NaHCO ₃) pada Pembangkit Listrik Elektrokimia Menggunakan Air Laut Sebagai Sumber Energi Terbarukan.
11	Dr. Ir. I GEDE SWIBAWA, M.S.	Tingkat Serangan dan Populasi Wereng Perut Putih: Hama Baru pada Pertanaman Jagung di Lampung
12	Winda Rahmawati, S.T.P., M.Si.MSc	Pembuatan Biodegradable Board Dari Enceng Gondok Dengan Perekat Resin
13	DWI HAPSORO, Dr.	Regenerasi In Vitro Tanaman Pisang cv. Ambon Kuning (<i>Musa spp. AAA</i>) Melalui Pembentukan Scalp
14	NUR EFENDI, S.Sos., M.Si	Model Pengembangan Kawasan Ekowisata

		Berbasis Pantai di Kecamatan Kelumbayan Kabupaten Tangamus
15	SINDUNG HARYANTO, M.Si	Studi Implementasi Undang-undang No 6 Tahun 2014 Tentang Desa di Provinsi Lampung
16	Dr. RUSDI EVIZAL.,M.S.	Pertumbuhan, produksi, dan citarasa kopi grafting Interspesifik Robusta, Arabika, Liberika
17	Dr. JONI AGUSTIAN, S.T., M.Sc.	Sirup glukosa dari tapioka via likuifaksi enzimatis menggunakan alfa-amilase amobil pada silika mcf: optimasi proses dan penentuan konstanta kinetika
18	TRISTIYANTO, S.Kom., M.I.S., Ph.D.	Audit Tata Kelola Teknologi Informasi Universitas Lampung Menggunakan Framework COBIT 5
19	DR. HERMAN HALOMOAN SINAGA, S.T., M.T.	Pendeteksian Dan Monitoring Partial Discharge Pada Kabel Daya Dengan Menggunakan Transducer Coupling Electromagnetik
20	DR. AHMAD SAUDI SAMOSIR, S.T., M.T.	Inovasi Teknik Maximum Power Point Tracking (Mppt) Berbasis Fuzzy Logic Untuk Meningkatkan Daya Output Pembangkit Listrik Tenaga Surya
21	I GEDE SIDEMEN, M.Si	Model Kerjasama Pencegahan Dan Penanganan Penyelundupan Manusia (People Smuggling) Di Wilayah Pesisir Provinsi Lampung
22	Dr. Ir. KURNIA MULUDI, M.S.Sc	Penggunaan Teknologi Sistem Kecerdasan Buatan dalam Pengembangan Pohon Keputusan untuk Seleksi Merpati Lokal (Columba livia) Balap Datar dan Pedaging
23	HERLINAWATI, S.T.,M.T.	Karakterisasi Gelombang Ultrasonik Lumba-lumba Untuk Terapi Autis Menggunakan Alih Ragam Wavelet
24	SYARIEF MAKHYA, Dr., M.Si	Model Kerjasama Pemerintah Daerah Lintas Provinsi Di Daerah Perbatasan (Model Kebijakan Pengembangan Kapasitas Sumber Daya Aparatur Melalui Kebijakan Kerjasama Kewaspadaan Dini Gejolak Sosial Antara Pemerintah Kabupaten Mesuji Provinsi Lampung dan Kabupaten Ogan Komering Ilir Provinsi Sumatera Selatan Dalam Rangka Pelayanan Publik Yang Optimal)
25	DIAN KURNIASARI, M.Sc	Pendugaan Parameter Distribusi Generalized Gamma Dengan Metode Probability Weighted Momen
26	HARI KASKOYO, S.Hut., M.P., Ph.D	Penggunaan Sustainable Livelihood Framework dalam Pengukuran Dampak Program Hutan Kemasyarakatan pada Perikehidupan Masyarakat Lokal, Pembangunan Daerah dan Kelestarian Hutan
27	FENI ROSALIA, Dr., M.Si	Budaya Organisasi di Perguruan Tinggi (Studi Transformasi Dari Teaching University

		ke Research University Di Universitas Lampung)
28	RINAWATI, M.Si	Potensi Karbon Aktif Sekam Padi Sebagai Adsorben Polutan Organik Polisiklik Aromatik Hidrokarbon (PAH)
29	Dr. Mareli Telaumbanua, S.T.P., M.Sc.	Rancang Bangun Sistem Kendali Penyiraman, Pemupukan, Dan Pengendalian Hama Untuk Tanaman Cabai Rawit Dengan Interface Melalui Internet Of Thing (IoT)
30	Dr. Agung Abadi Kiswando, S. Si. M.Sc.	Teknologi Pemisahan Fenol dan Pemodelan Matematika Berbasis Metode Polymer Inclusion Membrane Sebagai Upaya Penanggulangan Limbah Industri
31	YAKTIWORO INDRIANI, Dr.Ir., M.S	Prevalensi Kegemukan dan Tingkat Resiko Penyakit Kardiovaskuler pada Anak SD di Daerah Perdesaan Sekitar Bandar Lampung
32	ADMI SYARIF, Dr.Eng	Implementasi Intelegensia Buatan (Artificial Intelligent) Berbasis Fuzzy pada Pengolahan Citra Digital (Digital Image Processing)
33	LESTARI WIBOWO, Ir., M.P.	Screening Isolat dan Pembuatan Formulasi Kering Metarhizium anisopliae sebagai Agensia Hayati Oryctes rhinoceros
34	Dr. Eng. DEWI AGUSTINA IRYANI, ST., M.T.	Modifikasi Kimia Limbah Agroindustri Menjadi Selulosa Xanthat Sebagai Adsorben Logam Merkuri
35	Dr. LA ZAKARIA, S.Si. M.Sc.	Reparameterisasi Persamaan Generalized \sin -Sine Gordon Dan Peluang Pemakaiannya Pada Aplikasi Fractal Untuk Mendisain Motif Batik Lampung
36	SYAIFUL ALAM, M.T.	Pengembangan Prototipe Deteksi Kebocoran Pipa Migas Berbasis Kamera Long Wave Infrared pada Aplikasi Wahana Udara Tak-berawak (UAV)
37	MARTA DINATA, Dr., M.Pd	Pengaruh Latihan Lari Dan Rompi Terhadap Penurunan Berat Badan
38	ROMMY QURNIATI, S.P. , M.S	Strategi Peningkatan Kesejahteraan Rumah Tangga Miskin di Sekitar Hutan Mangrove Berbasis Tata Guna Lahan Kolaboratif di Provinsi Lampung
39	HENRY B.H. SITORUS, S.T.M.T.	Analisis Kestabilan Oksidasi Minyak Nabati Methyl Ester (JMEO) Berbahan Minyak Jarak Pagar Sebagai Minyak Isolasi Dalam Peralatan Tegangan Tinggi
40	DIAH PERMATA, S.T.,M.T.	Perancangan Sistem Proteksi Terhadap Sambaran Petir Pada Unmanned Aerial Vehicle (Uav)
41	RISWANDI, Dr. M.Pd.	Pengembangan Model On The Job Training (OTJ-T) Berbasis Peningkatan Kompetensi guru Sekolah Dasar
42	ZAINAL ABIDIN, Ir., M.E.S.,Dr.	Analisis Manfaat Ekonomi Pengelolaan Air Bersih Berbasis Masyarakat Di Kawasan Taman Hutan Raya Wan Abdul Rachman,

		Provinsi Lampung
43	Dr. HERTI UTAMI, S.T. , M.T.	Pemanfaatan Zeolit Alam Lampung sebagai Katalis Padat pada Sintesis &#945;-Terpineol Produk Turunan Terpentin dan Kajian Kinetika Reaksinya
44	Dr. RINDU RIKA GAMAYUNI, SE., M.Si	Penguatan Teknologi Informasi Akuntansi Manajemen Desa Dan Implementasi Undang-Undang No.6 /2014 Tentang Desa Untuk Meningkatkan Pengelolaan Keuangan Desa Di Kabupaten/Kota Di Lampung
45	Dr. Dewi Sartika, S.T.P., M.Si.	Eksplorasi Komponen Bioaktif Singkong (Manihot Esculenta) Karet (Bagian kulit Batang, umbi, kulit umbi, dan daun) Sebagai Anti Mikroba Alami Pada Pangan
46	Dr. Eng. Endah Komalasari	Implementasi Filter Lel Pada Sistem Grid Pembangkit Listrik Tenaga Surya Untuk Kompensasi Harmonisa
47	Misfa Susanto, S.T., M.Sc., Ph.D.	Pengembangan Sistem Monitoring Aktifitas Pergerakan Gajah pada Area Konservasi berbasis Wireless Sensor Network dengan Sifat Sink Node dan Cluster Head Node yang Mobile
48	SUSI, S.E., M.B.A. , PhD, Akt	Penggunaan Informasi Kinerja Lingkungan dan Sosial oleh Loan Officer pada Lembaga Pembiayaan di Indonesia
49	Ir. SUGIATNO, M.S.	Adaptasi Klon-klon Unggul Kakao di Lampung
50	LIA LISMERI, S.T., M.T.	Produksi Glukosa Dari Limbah Batang Ubi Kayu Dengan Proses Hidrolisis Dalam Reaktor Elektromagnetik
51	EKO EFENDI, S.T., M.Si	Pemodelan Strategi Pengelolaan Sumberdaya Perairan Di Teluk Lampung
52	MUHAMMAD SYAMSOEL HADI, IR. M.Sc.	Aktivitas Starch Synthase Dan Produksi Etanol Pada Dua Tipe Sorgum Yang Ditanam Secara Tumpangsari Dengan Ubikayu Menggunakan Real Time Pcr
53	Suskandini Ratih Dirmawati, DR. ,IR., M.P.	Tekno Ekonomi Formulasi Pestisida Nabati Berbahan Aktif Cyperus Kyllingia Pengendali Penyakit Patek Cabai
54	Dr. Ing. ARDIAN ULVAN, S.T., MSc.	Optimasi Beban Jaringan NGWN 5G dengan Mekanisme Mobility Load-Balancing
55	ELIDA PURBA, Dr.	Optimasi Proses Absorpsi Co2 Secara Kimia Dan Biologi Skala Pilot Plant
56	LUSMEILIA AFRIANI, Dr. Ir.	Perancangan Alat Untuk Pengujian Pematatan Tanah di Laboratorium dengan Sistem Pengontrolan Pada Energi Pematatan
57	LIMAN, S.Pt. M.Si	Pengaruh Jenis Dan Tingkat Penggunaan Pupuk Kandang Pada Tanaman Sorgum Terhadap Kandungan Nutrisi, Produksi Segar, Jumlah Anakan, Proporsi Batang Dan Daun

58	DR. KUSUMA ADHANTO, S.Pt., M.P.	Suplementasi Mineral Mikro-Organik Dan Asam Amino Pembatas Pada Ransum Ternak Ruminansia Berbasis Limbah Kelapa Sawit
59	Ir. DARWIN H. PANGARIBUA N, M.Sc., Ph.D.	Kajian Esktrak Tanaman Kaya Unsur N, P, Dan K Untuk Meningkatkan Produksi, Kualitas Pasca Panen, Dan Serapan Hara Tanaman Jagung Manis (Zea Mays L.)
60	Nyimas Sa'diyah, Ir., M.P., Dr.	Perakitan Varietas Unggul Cabai Merah Tahan Terhadap Penyakit Antraknosa: Keragaman Dan Heritabilitas Populasi Varietas Ferosa Generasi M2
61	DWI JOKOWINARN O, S. T., M.Eng.	Analisis Kurva IDF dan Revitalisasi Kearifan Lokal dalam Mitigasi Banjir di Provinsi Lampung
62	RARA DIANTARI, S.Pi., M.Sc	Kajian Senyawa Bioaktif Ekstrak Kelopak, Buah, dan Daun Mangrove Avicennia sp. Terhadap Infeksi Bakteri Vibrio Harveyi Pada Udang Vaname (Penaeus vannamei)
63	OFIK TAUPIK PURWADI, S.T.,M.T.	Analisis Mekanika Tanah Dan Ketinggian Muka Air Tanah Untuk Menafsirkan Kerentanan Terhadap Kegempaan Di Kemiling
64	INDRA MAMAD GANDIDI, S.T., M.T.	Proses Co-Upgrading dan Mechanical Purification untuk Mendapatkan Bio Premium dari BCO Sampah Real Perkotaan serta Uji Performa Mesin dan Faktor Emisi Gas Buang
65	SANDI ASMARA, M.S.	Model dan Strategi Pengambilan Keputusan Perencanaan Pembangunan Ketahanan Pangan Berdasar StatusKerawanan Wilayah (Studi Kasus Kabupaten Lamsel, Tanggamus dan Tulang Bawang) .

3. PENELITIAN PASCASARJANA

No	Ketua	Judul
1	HENI SISWANTO, S.H.M.H.	Optimalisasi Model Penegakan Hukum Pidana Berbasis Pendekatan Integral Dan Pendekatan Keilmuan Dalam Menghadapi Kejahatan Pembegalan Di Lampung (Studi Di Wilayah Hukum Kepolisian Daerah Lampung)
2	DYAH ARING HEPIANA L, Dr.	Penguatan Kelembagaan Dan Rantai Pasok Kelapa Sawit Rakyat Dalam Rangka Peningkatan Pendapatan Dan Kesejahteraan Petani Di Kabupaten Tulang Bawang
3	Sutikno, Ir.M.Sc., Ph.D.	Pengembangan “Edible Active Packaging” Berbahan Dasar Rumput Laut
4	Dr. DOROTHY ROULY H.	Peran Moderasi Gender dalam Effect

	PANDJAITAN ,S.E.M.Si	Pemasaran Hijau pada Keputusan Pembelian Produk Kosmetik Bodyshop di Bandar Lampung
5	SOWIYAH, M.Pd, Dr.	Pengembangan Model Program Pembelajaran Individu Bagi Anak Berkebutuhan Khusus di Sekolah Dasar Inklusif Kota Metro
6	ROCHMAH AGUSTINA, Ph.D.	Pemanfaatan Tanaman Tomat (Lycopersicum Esculentum, Mill) F1 Dari Benih Induk Terpapar Medan Magnet 0,2 Mt Sebagai Benih Tahan Serangan Jamur Layu Fusarium
7	DR. AMRIZAL, S.T., M.T.	Unjuk Kerja Kolektor Surya Pelat Datar Berdasarkan Material Absorber
8	HERTANTO, Drs., M.Si., Ph.D.	Resolusi Konflik Internal Komisi Pemilihan Umum (Studi Kasus tentang Konflik antara Komisioner dengan Sekretariat Komisi Pemilihan Umum Provinsi Lampung dalam Pemilihan Gubernur Lampung Tahun 2014)
9	SUNYONO, Dr., Drs., M.Si	Pengembangan Media Interaktif Berbasis Model SiMaYang dalam Pembelajaran IPA untuk Meningkatkan Keterampilan Proses Sains dan Keterampilan Berpikir Kritis Siswa
10	Dr. Rahmat Safe'i, S.Hut., M.Si	Peran dan Keberlanjutan Gapoktan dalam Pengelolaan Hutan Kemasyarakatan di KPHL Kota Agung Utara
11	Dr. Eng. SHIRLEY SAVETLANA, ST, M.Met	Produksi Dan Pengujian Mekanik Bahan Komposit Implan Pengisi Tulang (Bone Filler) Berbasis Hidroksiapatit Dari Bahan Alam Lampung
12	IRWAN SUKRI BANUWA, Ir., M.Si.,Dr. Prof.	Partisipasi Masyarakat KPHP Gedong Wani terhadap Program Hutan Tanaman Rakyat
13	Dr. SUMARDI, M.Si	Pengaruh Paparan Medan Magnet 0,2 Mt Pada Media Yang Mengandung Logam (Fe, Al, Pb, Cd Dan Cu) Terhadap Aktivitas Bacillus Sp. Dalam Menghasilkan Enzim Protease
14	Dr. Ir. AGUS KARYANTO, M.Sc.	Pengaruh Unsur Hara Mikro Dan Genotipe Tanaman Terhadap Aktivitas Enzim Starch Synthase Dan Morfologi Granul Pati Ubi Kayu

15	TUBAGUS HASANUDDIN, Dr. Ir.	Persepsi Petani, Efektivitas Kelompok Tani, Dan Difusi Inovasi Sistem Pertanian Organik Di Propinsi Lampung
16	TUNTUN SINAGA, DR.,M.Hum	The Impact Of Critical Thinking And Academic Potentials On Students' Comprehension Of Literary Text For Man Students In Bandar Lampung
17	Dr. BAMBANG UTOYO SUTIYOSO, M.Si.	Pengembangan Social capital pada birokrasi untuk mewujudkan kompetensi dan performance organisasi dalam rangka meningkatkan daya saing daerah
18	ADELINA HASYIM, Dr.	Pengembangan Model Pembelajaran Bermain peran untuk membangun sikap bela negara pada mata pelajaran PPKn di SMP
19	GATOT EKO SUSILO, S.T., M.Sc., PhD.	Studi Pemanfaatan Air Kondesat Ac Sebagai Alternatif Bahan Baku Air Minum Dengan Menggunakan Water Purifier Di Kota Bandar Lampung
20	CHANDRA ERTIKANTO, Dr., M.Pd	Pengembangan Lembar Kerja Siswa Berbasis Inkuiri Model Pembelajaran Sains Dengan Pendekatan Sainifik Guna Menumbuhkan Skill Representasi Matematis Pada Mahasiswa Pgsd Fkip Unila
21	ASNAWI LUBIS, ST, MSc, PhD	Pengembangan model perancangan lifting lug pada bejana tekan silinder dengan pendekatan mekanika retak (fracture mechanics)
22	ERLINA RUFAIDAH, Dr. M.Si	Pengembangan Model Pendidikan Berbasis Multikultural Di Kabupaten Way Kanan
23	Prof. Dr. SUNARTO, S.H., M.H.	Restrukturisasi Model Penegakan Hukum Korupsi Yang Mengoptimalisasi Korporasi Sebagai Subjek Tindak Pidana Korupsi
24	PARGITO, Dr. M.Pd	Migrasi Sosial Masyarakat Transmigran Dan Proses Akulturasi Di Kabupaten Waykanan

25	Edi Suyanto, Dr., M.Pd.	Pengembangan Bahan Ajar Menulis Cerpen Berbasis Teks Tipe Cerpen-gram untuk Mengonstruksi Kompetensi Tulis Siswa SMP Kelas IX
----	-------------------------	--

REKTOR UNIVERSITAS LAMPUNG,

ttd

HASRIADI MAT AKIN
NIP 195706291986031002