

PANGAN

PROPOSAL  
PENELITIAN TERAPAN  
UNIVERSITAS LAMPUNG



PENGEMBANGAN METODE DETEKSI CEPAT BERBASIS *SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) GEN DISEASE RESISTANCE PROTEINS RPS2* UNTUK SELEKSI BENIH JAGUNG (*Zea Mays*) TAHAN HAMA ULAT GRAYAK (*Spodoptera frugiperda*)

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ii</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>BAB 1. LATAR BELAKANG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Urgensi Penelitian.....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Ulat Grayak ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ) .....	5
2.2 Tanaman Jagung.....	6
2.3 Gen <i>Diseases Resistance Protein RPS2</i> .....	8
2.4 Marka Molekuler <i>Single Nucleotide Polymorphism (SNP)</i> .....	9
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>10</b>
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian .....	10
3.2 Metode Penelitian.....	10
3.2.1 Identifikasi Kerusakan Tanaman Jagung oleh Hama Ulat Grayak ( <i>Spodoptera frugiperda</i> ).....	10
3.2.2 Desain Marka DNA berbasis SNP .....	11
3.2.3 Uji Marka SNP pada Benih 8 Varietas Jagung .....	12
3.3 Pembagian Tugas Penelitian .....	13
<b>BAB 4. RENCANA ANGGARAN BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN.</b> ..	<b>14</b>
4.1 RENCANA ANGGARAN BIAYA .....	14
4.2 JADWAL PENELITIAN .....	15
<b>REFERENSI</b> .....	<b>16</b>

## RINGKASAN

Pada tahun 2019 di Indonesia terjadi serangan hama baru ulat grayak (*Spodoptera frugiperda*) yang berasal dari Benua Amerika yang diketahui sebagai hama paling destruktif pada tanaman jagung (*Zea mays*). Saat ini, langkah terbaik untuk mengendalikan hama dan penyakit dalam produksi pertanian adalah penerapan varietas tahan. Penelitian sebelumnya (hibah Professor 2019) yang telah kami lakukan belum berhasil menemukan marka *Deoxyribose Nucleic Acid* (DNA) spesifik berbasis *Polymerase Chain Reaction* (PCR) bagi jagung tahan ulat grayak. Hal tersebut dikarenakan marka molekuler sebelumnya berasal dari tanaman pisang, dimana tentunya terdapat perbedaan antara sekuens DNA tanaman pisang dengan tanaman jagung. **Melalui penelitian pendahuluan telah berhasil dilakukan sekuensing terhadap gen *Disease Resistance Proteins RPS2* genom dari 8 varietas jagung.** Berdasarkan hasil sekuensing tersebut sangat dimungkinkan untuk didesain marka molekuler DNA berbasis PCR karena ditemukan banyak *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) yang bisa dijadikan marka molekuler khusus untuk jagung tahan hama ulat grayak. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan marka DNA yang mampu membedakan varietas jagung antara yang tahan serangan hama dengan yang tidak. Marka yang didapat sangat potensial untuk diaplikasikan di masyarakat. Setelah marka DNA berhasil didesain, dilakukan konfirmasi dengan mengujinya pada ekstrak DNA kecambah jagung sebanyak 8 varietas. Dilakukan juga uji lapangan ketahanan 8 varietas kecambah jagung tersebut terhadap serangan ulat grayak menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 ulangan, perlakuan faktor tunggal yaitu 32 ulat grayak, dan variabel pengamatan menggunakan intensitas serangan ulat skala 1-4. Selanjutnya dilakukan analisis data serangan menggunakan aplikasi R-Studio. Penelitian ini bekerja sama dengan PT Inti Kemika Sejahtera yang berkontribusi menyediakan instrumen PCR sebagai instrumen utama penelitian. Kerjasama juga dilakukan dengan Gabungan Kelompok Tani Kabupaten Mesuji. Penelitian ini melibatkan 2 orang mahasiswa Jurusan Agronomi dan Hortikultura.

Kata Kunci : Jagung, Ulat Grayak, PCR, SNP, gen *Disease Resistance Proteins RPS2*

## BAB 1. LATAR BELAKANG

### 1.1 Latar Belakang

Jagung (*Zea mays* L.) merupakan salah satu serealia terpenting di dunia setelah gandum dan padi (Sudharani et al., 2012), serta juga merupakan komoditas terpenting di Indonesia setelah padi. Sayangnya, pada tahun 2019 terjadi serangan hama baru ulat grayak (*Spodoptera frugiperda* J. E. Smith) di Sumatera yang berasal dari Benua Amerika dan telah menyerang tanaman jagung di berbagai negara (Lubis et al., 2020). Hama ini diketahui sebagai hama paling destruktif pada tanaman jagung karena dapat menimbulkan kerusakan secara langsung pada bagian vegetatif maupun reproduktif, yang berimbas pada penurunan hingga kehilangan hasil (Makgoba et al., 2021). Sudarsono et al. (2019) menjelaskan bahwa hama ulat grayak sudah masuk ke wilayah Lampung dan menyebabkan kerusakan yang besar, sehingga harus ditangani dengan serius.

Pengendalian hama saat ini lebih berorientasi pada konsep Pengendalian Hama Terpadu (PHT) dengan aspek ekologi dan ekonomi yang berkelanjutan (Adhayani, 2021). Penggunaan pestisida kimia sintetik yang hingga saat ini masih banyak digunakan oleh petani dapat berdampak negatif terhadap organisme bukan sasaran (hewan dan manusia), menyebabkan resistensi hama, mencemari tanah, tumbuhan, air dan ekosistem lainnya (Zulaiha et al., 2012). Wang et al. (2023) menyatakan bahwa saat ini, langkah terbaik untuk mengendalikan hama dan penyakit dalam produksi pertanian adalah penerapan varietas tahan. Ketahanan tanaman terhadap penyakit yang umumnya dikendalikan oleh kelompok gen ketahanan (R gen), termasuk didalamnya gen *Disease Resistance Protein RPS2* (Sun et al., 2023). Gen RPS2 diketahui mampu menunjukkan ekspresi berupa resistensi terhadap patogen dan mencegah perluasan sebaran patogen sebagai bentuk imunitas tanaman yang berasosiasi dengan nonaktifnya sel HR (hypersensitive response) sehingga dapat mengirimkan sinyal aktivasi imunitas dan resistensi. **Melalui penelitian pendahuluan telah berhasil dilakukan sekuensing terhadap gen *Disease Resistance Proteins RPS2* genom dari 8 varietas jagung.** Berdasarkan hasil sekuensing tersebut sangat dimungkinkan untuk didesain marka molekuler DNA berbasis PCR karena ditemukan banyak *Single Nucleotide*

*Polymorphism* (SNP) yang bisa dijadikan marka molekuler khusus untuk jagung tahan hama ulat grayak.

Dengan adanya permasalahan yang diuraikan diatas, salah satu solusi yang ditawarkan untuk mengatasi hama ulat grayak ialah dengan melakukan seleksi tanaman jagung yang tahan terhadap serangan hama ulat grayak melalui molekuler sejak perkecambahan. Penggunaan marka molekuler sangat menjanjikan dalam program pemuliaan tanaman, terutama dalam membantu penandaan gen-gen yang mengontrol karakter yang diinginkan, seperti peningkatan produktivitas dan ketahanan terhadap hama dan penyakit tanaman serta kondisi lingkungan yang ekstrim (Reflinur dan Puji, 2016). Diantara berbagai macam jenis marka, *Single Nucleotide Polymorphism*/SNPs merupakan marka molekuler terbaru yang ditemukan. SNPs merupakan variasi urutan DNA yang terjadi ketika sebuah nukleotida tunggal A, T, C, dan G dalam suatu genome dari satu varietas memiliki perbedaan dengan varietas lainnya. Artinya, terdapat perbedaan antara sekuens DNA varietas tanaman dengan genom referensinya pada marker tertentu (Savitri, 2015). Deteksi SNPs bisa dilakukan dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Sutanto et al. 2016). Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diperlukan penelitian perancangan marka DNA untuk seleksi dini benih jagung yang tahan hama ulat grayak berbasis *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), serta menguji apakah *gen Disease Resistance Protein RPS2* dapat efektif mencegah serangan hama ulat grayak. Penelitian ini bekerjasama dengan PT. Inti Kemika Sejahtera yang menyediakan alat PCR sebagai instrumen utama penelitian.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang diatas, maka ditentukan rumusan masalah sebagai berikut :

1. Bagaimana performa DNA marker yang dirancang untuk dapat menyeleksi dini benih jagung yang tahan hama ulat grayak berbasis *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)?
2. Bagaimana kaitannya SNP *gen Disease Resistance Protein RPS2* tanaman jagung masing-masing varietas pada fase perkecambahan?

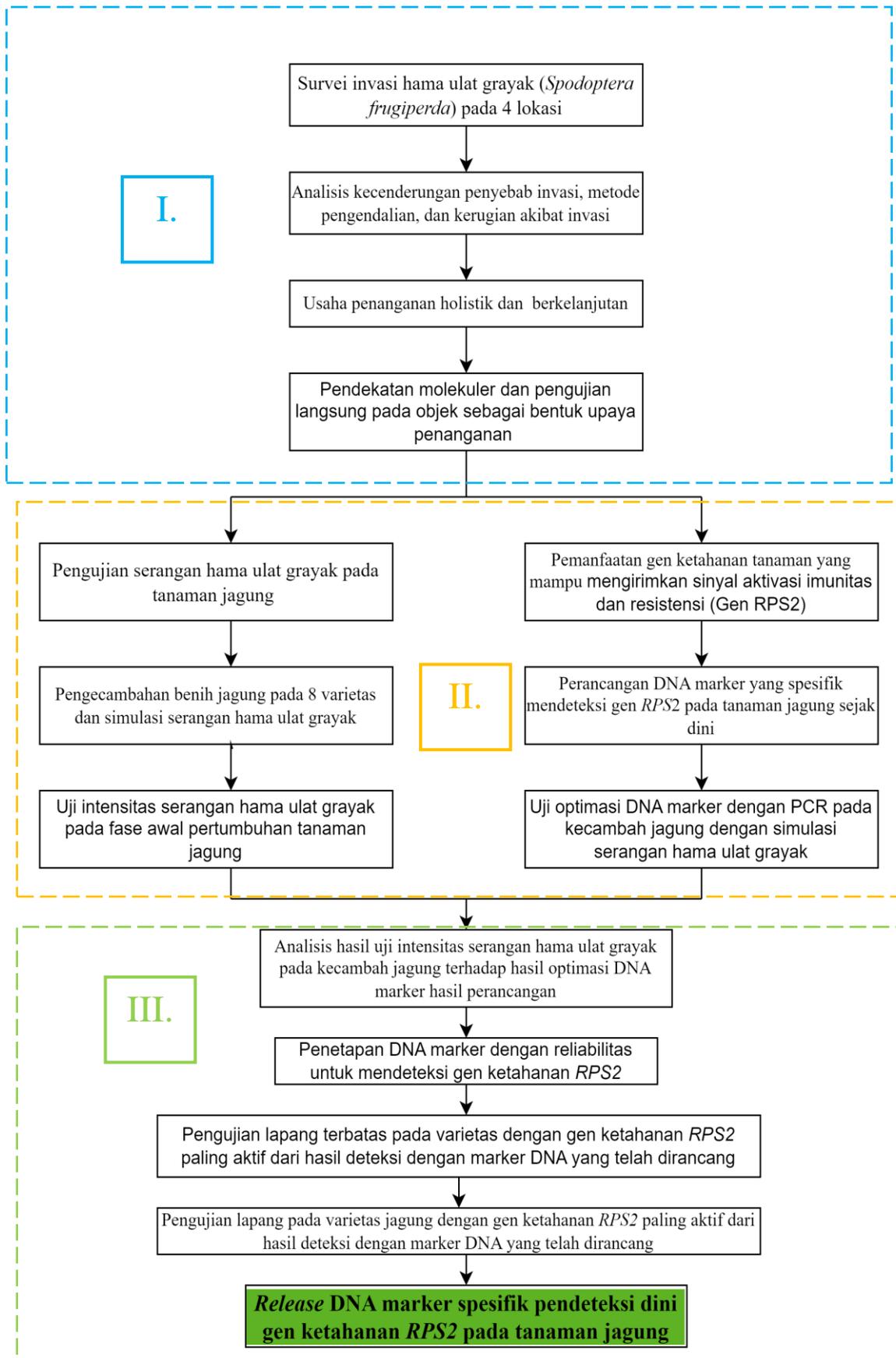
### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, dilakukan penelitian dengan tujuan sebagai berikut:

1. Mengetahui performa DNA marker yang dirancang untuk dapat menyeleksi dini benih jagung yang tahan hama ulat grayak berbasis *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)
2. Mengetahui kaitannya SNP *gen Disease Resistance Protein RPS2* tanaman jagung masing-masing varietas pada fase perkecambahan

### 1.4 Urgensi Penelitian

Sampai saat ini, peneliti belum menemukan referensi terkait pemanfaatan *gen Disease Resistance Proteins RPS2* untuk menguji ketahanan tanaman jagung terhadap hama ulat grayak. Meskipun penelitian sebelumnya dari Timotiwu *et al* (2023) telah berhasil membuktikan adanya gen ketahanan terhadap serangan ulat grayak ini pada jagung menggunakan marka molekuler, namun penanda molekulernya masih berasal dari marka untuk tanaman pisang. Oleh karena itu, perlu dilakukan perancangan DNA marker yang spesifik untuk seleksi dini tahan hama ulat grayak pada benih jagung dan pengujian dengan memanfaatkan *gen Disease Resistance Proteins RPS2* untuk mengidentifikasi ketahanan delapan varietas tanaman jagung terhadap serangan ulat grayak pada fase perkecambahan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dipublikasikan di jurnal terindeks Scopus Q4. Melalui penelitian ini, diharapkan akan dihasilkan marka DNA yang dapat menseleksi dini ketahanan benih jagung terhadap serangan hama ulat grayak sehingga dapat meminimalisir kerugian ekonomi. Untuk mencapai hasil akhir dilakukan 3 tahapan penelitian, dimana roadmap penelitian secara utuh disajikan pada Gambar 1. Penelitian yang diusulkan saat ini memasuki tahap II.



Gambar 1. Roadmap penelitian secara utuh. Penelitian yang diusulkan saat ini adalah pada tahap II.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Ulat Grayak (*Spodoptera frugiperda*)

*Spodoptera frugiperda* bermetamorfosis sempurna, yaitu: telur, 6 instar larva, pupa, dan ngengat. Dalam kondisi hangat, ngengat *S. frugiperda* betina dapat bertelur hingga 2000 butir seumur hidup. *S. frugiperda* merusak tanaman jagung dengan cara larva penggerek daun. Larva instar satu memakan jaringan daun, meninggalkan lapisan epidermis yang transparan. Larva instar kedua dan ketiga membuat lubang gerekkan di daun dan memakan daun dari tepi ke dalam. Larva *S. frugiperda* memiliki sifat kanibal, sehingga dalam satu tanaman jagung dapat ditemukan 1-2 larva, perilaku kanibal terjadi pada larva instar 2 dan 3. Sedangkan pada larva instar akhir menyebabkan kerusakan berat yang menyisakan tulang daun dan batang tanaman jagung (Nonci *et al.*, 2019).

Nonci *et al.*, (2019) menjelaskan terkait siklus hidup dari hama ulat grayak ialah telur, larva, pupa dan ngengat.

#### 1. Telur

Betina *S. frugiperda* bertelur di bagian atas atau bawah daun jagung. Telur awalnya berwarna putih saat diletakkan, kemudian berubah menjadi putih kecoklatan keesokan harinya. Telur menetas dalam 2-3 hari.

#### 2. Larva

Larva *S. frugiperda* terdiri dari 6 instar. Larva instar 1-5 berwarna terang pada awalnya, kemudian berubah menjadi hijau muda kecoklatan dan menjadi gelap pada perkembangan selanjutnya. Durasi perkembangan larva adalah 12-20 hari dari larva yang baru lahir hingga perkembangan akhir, tergantung pada kondisi lingkungan (suhu dan kelembaban). Larva instar akhir (tahap 6) biasanya ditandai dengan tiga garis kuning di sepanjang punggung, diikuti oleh garis hitam dan garis kuning di sepanjang sisi. Terlihat empat titik hitam membentuk persegi dari segmen kedua hingga terakhir, setiap titik hitam memiliki rambut pendek, kepala gelap; Bagian depan kepala memiliki bentuk Y yang agak terbalik.

### 3. Pupa

Larva instar 6 berwarna coklat tua, kemudian menjadi kepompong di dalam tanah.

Perkembangan kepompong dapat memakan waktu 12-14 hari sebelum tahap dewasa terjadi.

### 4. Ngegat

Ngegat memiliki lebar sayap 3-4 cm. Sayap depan berwarna coklat tua dan sayap belakang berwarna keputihan. Dapat hidup 2-3 minggu.

CABI (2019) menunjukkan bahwa hama (*S. frugiperda*) dapat hidup pada rentangan suhu rata-rata per tahun 17°C - 35°C, dengan curah hujan <100 mm per tahun. Sedangkan pada iklim tropis dengan curah hujan >1500 mm per tahun. Prasetya *et al.*, (2022) menjelaskan siklus hidup *S. frugiperda* adalah selama musim panas yaitu 30 hari, namun dapat mencapai 60 hari pada musim semi dan hingga 80-90 hari pada musim gugur.

## 2.2 Tanaman Jagung

Jagung (*Zea mays* L) adalah tanaman monoecious dimana bunga jantan tanaman terpisah dari bunga betina. Jagung merupakan tanaman C4 yang dapat beradaptasi dengan baik terhadap pertumbuhan dan menghasilkan faktor pembatas. at penghasil fotosintesis yang kemudian membelah adalah sel pembuluh yang mengandung klorofil. Dalam sel-sel ini, terjadi dekarboksilasi malat dan aspartat, menghasilkan CO<sub>2</sub>, yang kemudian memasuki siklus Calvin untuk membentuk pati dan sukrosa. Mengenai kondisi lingkungan, tanaman C4 beradaptasi dengan keterbatasan banyak faktor seperti: B. intensitas radiasi matahari yang tinggi dan suhu siang dan malam yang tinggi, curah hujan yang rendah dan cahaya musim yang tinggi dikombinasikan dengan suhu yang tinggi, dan kesuburan tanah yang relatif rendah. Karakteristik yang berguna dari jagung sebagai tanaman C4 antara lain aktivitas fotosintesis yang relatif tinggi pada kondisi normal, fotorespirasi sangat rendah, transpirasi rendah, dan penggunaan air yang efisien (Muhadjir, 2018).

Morfologi tanaman jagung adalah sebagai berikut:

#### a. Akar

Jagung memiliki tiga macam sistem perakaran serabut, yaitu : (a) akar seminal, (b) akar adventif, dan (c) akar kait atau penyangga. Pertumbuhan akar benih melambat setelah pulmula (batang) muncul dari tanah dan secara otomatis berhenti pada tahap V3. Berat total akar jagung terdiri dari 52% akar adventif dan 48% akar nodal. Sedangkan akar tunggang merupakan akar adventif yang terbentuk pada dua atau tiga ruas di atas permukaan tanah (Fiqriansyah *et al.*, 2021). Menurut Riwandi *et al.*, (2014) Akar adventif juga berperan dalam pengambilan air dan unsur hara, akar udara merupakan akar yang muncul pada dua atau tiga ruas di atas permukaan tanah yang berfungsi sebagai penopang agar tanaman jagung tidak tumbang. Akar ini juga membantu dalam penyerapan nutrisi dan air.

b. Batang

Tanaman jagung memiliki batang silindris tidak bercabang yang terdiri dari beberapa ruas dan nodus. Simpul memiliki tunas yang berkembang menjadi tongkol. Dua tunas teratas berkembang menjadi tongkol produktif. Batang terdiri dari tiga komponen jaringan utama yaitu kulit (epidermis), jaringan pembuluh (*vascular bundles*) dan bagian tengah batang (jantung) (Rinaldi *et al.*, 2009). Batang tanaman jagung memiliki tinggi antara 150-250 cm yang terlindungi oleh pelepah daun yang berselang-seling dari setiap buku (Riwandi *et al.*, 2014).

c. Daun

Daun jagung merupakan tipe daun sempurna, bentuknya memanjang, antara pelepah dan helai daun terdapat ligula, tulang daun yang sejajar dengan ibu tulang daun, dengan permukaan daun licin dan berambut. Stoma berbentuk halter, yang khas dimiliki family Poaceae. Struktur ini berperan penting dalam respon tanaman terhadap defisit air pada sel daun (Budiman, 2012). Jagung memiliki jumlah daun 8-15, berwarna hijau berbentuk pita, dan tidak bertangkai. Tanaman jagung di daerah tropis mempunyai jumlah daun relatif lebih banyak dibandingkan dengan tanaman jagung yang tumbuh di daerah beriklim sedang (Riwandi *et al.*, 2014).

d. Bunga

Tanaman jagung juga dikenal sebagai tanaman berumah satu karena bunga jantan dan betina terdapat pada tanaman yang sama tetapi letaknya terpisah. Bunga jantan berada di bagian atas tanaman, sedangkan bunga betina berada di paku sekitar

setengah batang. Bunga jantan tumbuh di pucuk tanaman dalam bentuk tandan (*inflorescence*). Serbuk sari berwarna kuning dan beraroma khas. Bunga betina tersusun atas tongkol. Tongkol tumbuh dari buku, di antara batang dan pelepah daun. Pada umumnya, satu tanaman hanya menghasilkan satu tongkol produktif meskipun memiliki sejumlah betina (Riwandi *et al.*, 2014).

### **2.3 Gen *Diseases Resistance Protein RPS2***

Gen yang memberikan resistensi terhadap berbagai penyakit dan patogen penyakit dikenal sebagai R-gen. R-gen pada tanaman memiliki jumlah genom yang melimpah mewakili sekitar 1% dari semua gen. Besar sejumlah gen-R telah dikloning dan dikarakterisasi pada tanaman menggunakan pendekatan penandaan berbasis peta dan transposon. Gen-R ini sebagian besar terdiri dari nukleotida yang dilestarikan *domain nucleotide binding site-leucine-rich repeat* (NBS-LRR) (Saha *et al.*, 2013). Mackey *et al.* (2003) menjelaskan bahwa ketahanan tanaman sering ditentukan oleh alel spesifik gen ketahanan (R). Kelas utama protein R mengandung *nucleotide binding site* (NB) dan *leucine-rich repeat* (LRR) dan disebut protein NB-LRR.

Protein NBS-LRR sensitif terhadap protein efektor patogen, yang menyebabkan efektor protein untuk memicu respon imun ETI, sehingga tanaman dapat menghasilkan respon defensif terhadap bakteri, virus, jamur, dan patogen lainnya. Protein NBS-LRR tidak hanya mampu untuk secara langsung atau tidak langsung mengenali produk protein efektor dari patogen, tetapi juga bisa berinteraksi dengan mereka. Pengenalan efektor ini dapat menyebabkan perubahan konformasi protein NBS-LRR, ia berubah dari keadaan penghambatan ke keadaan aktivasi, sehingga menjadi aktif transduksi sinyal hilir dan menghasilkan respons pertahanan (Wang *et al.*, 2023).

RPS2 memainkan peran up-regulasi dalam transkripsi miR393b, yang merupakan microRNA dan memiliki tiga gen target: MEMB12 (yang mengkode untuk Protein SNARE yang terletak di badan golgi), VPS54 (yang mengkode rasi homolog protein yang terlibat dalam transpor retrograde dari endosom sekunder ke badan Golgi), dan EXO70H3 (subunit kompleks vesikel yang diperlukan untuk eksositosis), ketiga gen tersebut terlibat dalam proses transpor membran. Merobohkan MEMB12 juga dapat meningkatkan sekresi protein pertahanan PR-1 yang diinduksi oleh aktivasi RPS2.

Respon imun yang diinduksi oleh protein NBS-LRR setelah mengenali protein efektor patogen biasanya terkait dengan lokalisasinya dalam sel (Wang *et al.*, 2023). Domain yang dilestarikan dalam gen seperti urutan gen NBS-LRR mewakili peluang untuk merancang strategi berbasis PCR dengan *degenerate* primer untuk amplifikasi dan isolasi banyak urutan terkait pada spesies tumbuhan lain. Beberapa penanda DNA dikembangkan dari urutan RPS2 terisolasi telah digunakan untuk beberapa tujuan, seperti analisis keragaman genetik, penandaan sifat-sifat terkait resistensi penyakit, dan penemuan gen kandidat dalam beberapa tanaman (Herlina *et al.*, 2018).

#### **2.4 Marka Molekuler *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)**

Dengan berkembangnya teknologi berbasis penanda DNA, telah ditemukan tiga jenis penanda DNA yang masing-masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Tiga jenis penanda DNA adalah (1) penanda berbasis hibridisasi DNA seperti polimorfisme panjang fragmen restriksi (RFLP); (2) Penanda berdasarkan reaksi berantai polimerase dan menggunakan urutan nukleotida sebagai primer, misalnya DNA Polimorfik Amplifikasi Acak (RAPD) dan Polimorfisme Panjang Fragmen Amplifikasi (AFLP); dan (3) penanda berbasis PCR menggunakan primer yang mengandung sekuens komplementer spesifik pada DNA target, seperti *Sequence Tagged Sites* (STS), *Sequence Characterized Amplified Regions* (SCAR), *Simple Sequence Repeats* (SSR) atau mikrosatelit (*microsatellites*). dan *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) (Azrai, 2005).

Menurut Azrai (2005), marka SNP tergolong marka generasi ketiga. SNP adalah variasi yang melibatkan hanya satu nukleotida. Penanda ini adalah mutasi titik di mana satu nukleotida digantikan oleh yang lain di lokasi tertentu. SNP adalah jenis yang lebih umum untuk membedakan urutan antara alel, bersifat kodominan, dan mewakili penanda polimorfik dari sumber daya yang tidak habis-habisnya untuk digunakan dalam pemetaan genetik resolusi tinggi dari suatu karakter basis data urutan gen tertentu. Pengujian dengan marka SNP dapat dilakukan pada tanaman seperti padi dan jagung yang informasi genomnya cukup lengkap

## **BAB 3. METODE PENELITIAN**

### **3.1 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Benih dan Pemuliaan Tanaman, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Jl. Prof. Dr. Sumantri Brojonegoro No.1 Bandar Lampung, Lampung dan analisis DNA dilaksanakan di laboratorium biomolekuler pribadi anggota peneliti. Diamati juga intensitas serangan ulat grayak terhadap kebun jagung petani di Kabupaten Mesuji. Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Mei 2024 sampai dengan Oktober 2024 dengan melibatkan mahasiswa Jurusan Agronomi yaitu Desi Anggia Putri (NPM 1814161039) dan Dona Pratiwi (NPM 1814161040).

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Identifikasi Kerusakan Tanaman Jagung oleh Hama Ulat Grayak**

*(Spodoptera frugiperda)*

Dilakukan survey lapangan ke petani jagung di Kabupaten Mesuji yang terdampak serangan hama ulat grayak. Diamati intensitas serangan dari masing-masing varietas jagung. Selanjutnya, identifikasi kerusakan tanaman jagung pada fase perkecambahan oleh hama ulat grayak dilakukan di Laboratorium Ilmu Hama Tumbuhan, Fakultas Pertanian. Perkecambahan benih tanaman jagung dilakukan dengan menggunakan alat tray semai ukuran 200 lubang tanam menggunakan media tanam komersil. Setiap lubang ditanami sebanyak satu benih jagung. Setiap varietas jagung yang digunakan sebanyak 25 benih yang dikelompokkan berdasarkan petakan yang telah ditentukan. Benih yang dikecambahkan menggunakan benih jagung varietas NK7328, NK Super, Pertiwi 5, BISI 321, BISI 18, P36, Eksotik, dan Lokal. Setelah kecambah benih jagung berusia 5 HST, kemudian ulat grayak instar 2-3 disebar secara merata kedalam tray semai sebanyak 32 ulat. Percobaan ini dilakukan sebanyak 4 ulangan. Selanjutnya dilakukan perekaman non stop menggunakan kamera. Pengamatan intensitas serangan ulat grayak ini dilakukan sampai seluruh ulat grayak yang digunakan telah menjadi kepompong (Instar 6 akhir). Setelah ulat grayak menjadi kepompong, kemudian dilakukan perhitungan intensitas kerusakan menggunakan skala 1-4 dan data hasil

perhitungan dilakukan pengujian dengan uji anova dan uji lanjutan menggunakan uji DMRT (Duncan) pada taraf signifikansi 5% menggunakan aplikasi R-Studio untuk menentukan perbedaan ketahanan dari masing-masing varietas yang diuji.

Tingkat serangan hama dihitung berdasarkan rumus (Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan, 2021):

$$I = \frac{\sum_{i=0}^z (ni \times vi)}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan :

I = Intensitas serangan (%)

ni = Jumlah tanaman atau bagian tanaman contoh dengan skala kerusakan vi

vi = Nilai skala kerusakan contoh ke-i

N = Jumlah tanaman atau bagian tanaman contoh yang diamati

Z = Nilai skala kerusakan tertinggi

Adapun kategori penilaian tingkat serangan hama adalah sebagai berikut:

**Tabel 1.** Kategori penilaian tingkat serangan hama

Kategori	Tingkat Serangan Pada Tanaman
Ringan	bila tingkat serangan > Ambang Pengendalian ≤ 25%
Sedang	bila tingkat serangan > 25 ≤ 50%
Berat	bila tingkat serangan > 50 ≤ 85%
Puso	bila tingkat serangan > 85%

Sumber. (Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan, 2021).

### 3.2.2 Desain Marka DNA berbasis SNP

Hasil sekuensing terhadap gen RPS2 genom 8 varietas jagung (dari penelitian pendahuluan dilakukan identifikasi letak dan susunan basa SNP. Setelah didapatkan hasil identifikasi SNP, selanjutnya dilakukan pendisainan primer untuk marka SNP. Pasangan primer SNAP dirancang berdasarkan situs SNP terpilih menggunakan website WebSNAPER (Gambar 5). Situs SNP target diindikasikan [X/Y], di mana X adalah nukleotida alel referensi dan Y adalah nukleotida alel alternatif. Parameter yang harus

dimasukkan antara lain ukuran produk amplifikasi PCR, suhu TM dan nama primer yang diinginkan. Proses desain primer diulang untuk setiap posisi SNP dalam urutan DNA yang diinginkan. Selain itu, dari hasil analisis masing-masing, satu set primer dipilih untuk setiap situs SNP, yang terdiri dari sepasang primer untuk alel referensi dan sepasang primer lain untuk alel alternatif. Setelah sekuens primer diperoleh kemudian diseleksi berdasarkan jumlah situs SNP, primer disintesis menggunakan kontraktor manufaktur primer. Setelah marka SNP berhasil didesain, dilanjutkan dengan uji primer tersebut menggunakan metode analisis berbasis PCR. Marka SNP didesain paling sedikit 4 pasang.

**Gambar 5.** Situs Web SNAPER.

### 3.2.3 Uji Marka SNP pada Benih 8 Varietas Jagung

Langkah awal yang dilakukan yaitu ekstraksi DNA 8 varietas jagung menggunakan bagian meristem pada usia kecambah jagung 7 HST mengikuti protokol KIT *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (Promega, AS) (Setiawan *et al.*, 2021). Setelah DNA berhasil diekstraksi, dilakukan analisis konsentrasi dan kemurniannya menggunakan instrument *Nanophotometer* buatan Implen, Jerman (Setiawan *et al.*, 2021). Selanjutnya dilakukan PCR menggunakan DNA hasil ekstraksi dan kandidat primer marka SNP

hasil desain. Setiap pereaksi PCR terdiri dari 10 $\mu$ L *mastermix*, 0,25  $\mu$ L primer *Forward* (F), 0,25  $\mu$ L primer *Reverse* (R), 9,75  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, dan 0,25  $\mu$ L template DNA yang dimasukkan dalam *microtube* berukuran 0,2 mL. Program *thermocycling* yang digunakan memiliki 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (95°C selama 5 menit), tahap denaturasi (95°C selama 1 menit), tahap penempelan primer atau *annealing* (56,5°C selama 1 menit), pemanjangan atau *elongation* (72°C selama 1 menit), elongasi akhir (72°C selama 5 menit), dan *cooling* (20°C selama 10 menit). Tahap denaturasi, penempelan primer (*annealing*), dan pemanjangan (*elongation*) diulang sebanyak 35 siklus.

Setelah tahapan PCR dilakukan, langkah selanjutnya ialah memvisualisasikan hasil amplifikasi sekuens DNA menggunakan elektroforesis. Alat yang digunakan ialah alat elektroforesis digital *QiaxCel Advanced* (Qiagen, Jerman) menggunakan DNA high resolution kit dengan metode *capillary electrophoresis*. Penggunaan alat elektroforesis ini mengikuti protokol penggunaan alatnya (*QiaxCel Advanced Handbook*, 2014). Variabel yang diamati ialah muncul-tidaknya amplikon pada hasil PCR masing-masing primer marka SNP hasil desain. Diagram alir selengkapnya disajikan dalam gambar 1, dimana penelitian yang dikerjakan saat ini merupakan tahap II.

### 3.3 Pembagian Tugas Penelitian

Pembagian tugas dalam penelitian ini dijelaskan melalui tabel 2 berikut:

Tabel 3 . Pembagian tugas penelitian

No.	Posisi	Peran/Tanggung Jawab
1.	Ketua	Merumuskan penelitian, mengkoordinir kegiatan laboratorium dan lapangan, memastikan anggaran berjalan sesuai dengan perencanaan, menginterpretasikan data, dan membuat kesimpulan.
2.	Anggota 1	Merumuskan metode lapangan, menganalisis data lapangan, proof reading penulisan jurnal.
3.	Anggota 2	Merumuskan metode laboratorium, menganalisis data laboratorium, menginterpretasikan data, dan membuat kesimpulan.
4.	Mahasiswa 1	Mengumpulkan data lapangan dan laboratorium
5	Mahasiswa 2	Mengumpulkan data lapangan dan laboratorium

## BAB 4. RENCANA ANGGARAN BIAYA DAN JADWAL PENELITIAN

### 4.1 RENCANA ANGGARAN BIAYA PENELITIAN

Rencana anggaran biaya penelitian disajikan dalam tabel 4 berikut:

Tabel 4. Rencana anggaran biaya penelitian

<b>1. Pengadaan alat dan bahan penelitian</b>		
a	Kit ekstraksi DNA	Rp.6.000.000,-
b	Master mix PCR	Rp.1.800.000,-
c	Primer Jagung 1	Rp.850.000,-
d	Primer Jagung 2	Rp.850.000,-
e	Primer Jagung 3	Rp. 850.000,-
f	Primer Jagung 4	Rp. 850.000,-
g	Tray Semai Kecambah	Rp.200.000,-
h	Boks es	Rp.75.000,-
i	Mortar+pistil	Rp.250.000,-
j	Kamera portable	Rp.275.000,-
<b>2. Biaya perjalanan penelitian</b>		
a	4x Sewa Mobil + driver	Rp.2.400.000,-
b	4x Bahan Bakar Mobil Sewa	Rp.2.000.000,-
<b>3. Analisis Data</b>		
1.	Analisis data hasil desain marker DNA	Rp.1.100.000,-
2.	Analisis data optimasi PCR marker DNA	Rp.1.325.000,-
3.	Analisis data hasil uji intensitas serangan terhadap hasil uji optimasi marker DNA	Rp.775.000,-
<b>4. Sewa Peralatan</b>		
a	Alat dokumentasi serangan ulat grayak (Alat pembenihan, alat uji serangan, dan CCTV)	Rp.1.650.000,-
b	Alat Sentrifugasi	Rp.425.000,-
c	Alat Mikropipet	Rp.125.000,-
d	Alat Tissue lyser	Rp.125.000,-
e	Alat Autoklaf	Rp.250.000,-
f	Alat Pemanas Heating block	Rp.125.000,-
g	Nanofotometer	Rp.850.000,-
h	Alat Elektroforesis	Rp.3.500.000,-
<b>6. Alat tulis kantor/bahan habis pakai</b>		
a	Alat tulis	Rp.150.000,-

b	Kertas HVS	Rp.150.000,-
c	Tinta printer	Rp.450.000,-
d	Benih Jagung	Rp.640.000,-
e	Mikrotip	Rp.175.000,-
f	<i>Microtube</i>	Rp.250.000,-
g	Media tanam	Rp.120.000,-
h	Ulat grayak instar 3	Rp.450.000,-
i	Plastik mika	Rp.60.000,-
j	Glove	Rp.120.000,-
k	Masker	Rp.100.000,-
l	Air Destilasi Steril	Rp.550.000,-
m	Alkohol laboratorium 70%	Rp.300.000,-
n	Plastik tahan panas	Rp.85.000,-
<b>7. Publikasi</b>		
a	Biaya Submit Jurnal/Publikasi	Rp.9.750.000,-
<b>TOTAL BIAYA YANG DIBUTUHKAN</b>		<b>Rp.40.000.000,-</b>

#### 4.2 JADWAL PENELITIAN

Jadwal penelitian disajikan dalam tabel 4. berikut:

Tabel 4. Jadwal penelitian

No.	Jenis Kegiatan	Bulan ke-					
		1	2	3	4	5	6
1	Survey lokasi invasi hama						
2.	Desain Marka SNP PCR						
3.	Persiapan alat dan bahan						
3.	Penanaman benih jagung						
4.	Pengamatan kerusakan tanaman jagung oleh hama ulat grayak ( <i>spodoptera frugiperda</i> ) pada fase perkecambahan benih						
6.	Ekstraksi DNA Jagung						
7.	Pengujian Marka SNP PCR pada kecambah jagung						
8.	Analisis data						
9.	Pelaporan dan publikasi						

## REFERENSI

- Adhayani, R.N.W. 2021. Tingkat populasi dan serangan hama ulat grayak (*Spodoptera frugiperda* j.e. Smith) pada tanaman jagung dengan aplikasi ekstrak buah maja (*Aegle marmelos* L. Corr) dan daun biduri (*Calatropis gigantea* L.Dryand). *Skripsi*. Fakultas Pertanian. Universitas Hasanuddin.
- Budiman, H. (2012). *Budidaya Jagung Organik*. Pustaka Baru Press. Yogyakarta.
- CABI. (2019). *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). *CABI Compendium*. <https://doi.org/10.1079/cabicompendium.29810>
- Direktorat Perlindungan Tanaman Pangan. 2021. *Petunjuk Teknis Pengamatan dan Pelaporan Organisme Pengganggu Tumbuhan & Dampak Perubahan Iklim (OPT-DPI)*. Direktorat Jenderal Tanaman Pangan.
- Fiqriansyah, W.M., Putri, S.A., Syam, R., Rahmadhani, A.S., & Utami, Y.D. (2021). Teknologi Budidaya Tanaman Jagung (*Zea mays*) dan Sorgum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Jurusan Biologi FMIPA UNM*. Makassar. ISBN : 978-623-94869-7-6
- Herlina, L., Reflinur, R., Nugroho, K., Terryana, R. T., Sobir, S., Maharijaya, A., & Wiyono, S. (2018). Genetic Diversity Analysis Using Resistance Gene Analog-Based Markers to Support Morphological Characterization of Shallots. *Jurnal Agrobiogen*, 14(2), 65–65. <https://doi.org/10.21082/jbio.v14n2.2018.p65-74>
- Lubis, A. A. N., Anwar, R., Soekarno, B. P., Istiaji, B., Dewi, S., Irmansyah, & Herawati, D. (2020). Serangan Ulat Grayak Jagung (*Spodoptera Frugiperda*) pada Tanaman Jagung di Desa Petir, Kecamatan Daramaga, Kabupaten Bogor dan Potensi Pengendaliannya Menggunakan Metarizhium Rileyi. *Jurnal Pusat Inovasi Masyarakat (PIM)*, 2(6).
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Dangl, J. L. (2003). Arabidopsis RIN4 Is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and Modulates RPS2-Mediated Resistance. *Cell*, 112(3), 379–389. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00040-0)
- Makgoba, M. C., Tshikhudo, P. P., Nnzeru, L. R., & Makhado, R. A. (2021). Impact of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) (J.E. Smith) on small-scale maize farmers and its control strategies in the Limpopo province, South Africa. *Jàmbá : Journal of Disaster Risk Studies*, 13(1), 1016. <https://doi.org/10.4102/jamba.v13i1.1016>
- Muhadjir, F. 2018. *Karakteristik Tanaman Jagung*. Balai Penelitian Tanaman Pangan Bogor. Litbang Pertanian. <https://balitsereal.litbang.pertanian.go.id/wp-content/uploads/2018/08/3karakter.pdf>
- Nonci, N., Kalqutny, S.H., Mirsam, H., Muis, A., Azrai, M., & Aqil, M. (2019). Pengenalan Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda* J.E. Smith) Hama Baru pada Tanaman Jagung di Indonesia, Balai Penelitian Tanaman Serealia. Maros.

<https://repository.pertanian.go.id/server/api/core/bitstreams/51b2dde5-0f79-40e2-b711-9b50ef181b2d/content>

- Prasetya, G. I., Siregar, A. Z., & Marheni, M. (2022). Intensitas dan Persentase Serangan *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith (Lepidoptera: Noctuidae) pada Beberapa Varietas Jagung di Kecamatan Namorambe Kabupaten Deli Serdang. *Jurnal Pertanian Cemara*, 19(1), 77–84. <https://doi.org/10.24929/fp.v19i1.1984>
- QiaxCel Advanced Handbook. 2014. *Qiagen Sample Assay and Technologies*. QIAGEN. Hilden.
- Reflinur, R., & Lestari, P. (2016). Penentuan Lokus Gen dalam Kromosom Tanaman dengan Bantuan Marka DNA. *Jurnal Penelitian Dan Pengembangan Pertanian*, 34(4), 177. <https://doi.org/10.21082/jp3.v34n4.2015.p177-186>
- Rinaldi (2009). Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Jagung (*Zea mays* L.) yang Ditumpangsarikan dengan Kedelai (*Glycine Max* L.). Skripsi. Universitas Taman Siswa. Padang.
- Riwandi, M., Handajansih, & Hasanudin. (2014). Teknik Budidaya Jagung dengan Sistem Organik di Lahan Marjinal. *UNIB Pres*. Bengkulu. ISBN : 978-979-9431-84-4
- Saha, D., Rana, R. S., Sureja, A. K., Verma, M., Arya, L., & Munshi, A. D. (2013). Cloning and characterization of NBS-LRR encoding resistance gene candidates from Tomato Leaf Curl New Delhi Virus resistant genotype of *Luffa cylindrica* Roem. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.11.007>
- Savitri, H.S. (2015). Implementasi Package Bioconductor pada Software R untuk Olah Data Hasil Genotyping by Sequencing pada Tanaman Cabai (*Capsicum annum*). Skripsi. Universitas Islam Indonesia.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., & Hendri, J. (2021). Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydvorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*, 7(4), 247. <https://doi.org/10.3390/fermentation7040247>
- Sudarsono, H., Susilo, F., Lestari, P., Suharjo, R., Swibawa, I. G., & Hariri, A. M. (2019). Identification of Spodoptera Specimens Collected on Corn Field in Pringsewu District, Lampung Province. *SEAPPRO (Southeast Asia Plant Protection Conference)*.
- Sudharani, M., Rao, P.S., Subba, R.L.V. (2012). Identification of SSR Markers for Testing of Hybridity and Seed Genetic Purity in Maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 2319-7064. <https://www.ijsr.net/archive/v3i10/TONUMTQ0.pdf>
- Sun, T., Rahman, M. U., Wu, X., & Ye, J. (2023). Resistant and Susceptible *Pinus thunbergii* Parl. Show Highly Divergent Patterns of Differentially Expressed Genes during the Process of Infection by *Bursaphelenchus xylophilus*.

- International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 14376–14376.  
<https://doi.org/10.3390/ijms241814376>
- Sutanto, A., Hermanto, C., Sukma, D., & Sudarsono, S. (2016). Pengembangan Marka SNAP Berbasis Resistance Gene Analogue Pada Tanaman Pisang (*Musa spp.*). *Jurnal Hortikultura*, 23(4), 300. <https://doi.org/10.21082/jhort.v23n4.2013.p300-309>
- Timotiwu, P. B., Agustiansyah, Setiawan, W. A., & Sudarsono, H. (2023). Evaluation of SNP-Based Markers Utilization for Resistance to Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* on Eight Corn Varieties. *Natural and Life Sciences Communications*, 22. <https://doi.org/10.12982/nlsc.2023.039>
- Wang, X., Xu, Y., Fan, H., Cui, N., Meng, X., He, J., Ran, N., & Yu, Y. (2023). Research Progress of Plant Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Protein. *Horticulturae*, 9(1), 122–122. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9010122>
- Yuenleni, Y. (2019). Langkah-Langkah Optimasi PCR. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(3), 51. <https://doi.org/10.22146/ijl.v1i3.48723>
- Zulaiha, S., Suprpto., & Apriyanto, D. 2012. Infestasi Beberapa Hama Penting Terhadap Jagung Hibrida Pengembangan Dari Jagung Lokal Bengkulu Pada Kondisi Input Rendah Di Dataran Tinggi Andisol. *NATURALIS Jurnal Penelitian Pengelolaan Sumberdaya Alam dan Lingkungan*, 1 (1) <https://ejournal.unib.ac.id/index.php/naturalis/article/view/5913>