

KARAKTERISASI ISOLAT *Fusicoccum* (Crous. S dan Wingf. M.J) PADA KARET (*Hevea brasiliensis*) SECARA MORFOLOGI DAN TEKNIK POLYMERASE CHAIN REACTION

Characterization of Fusicoccum (Crous. S and Wingf. M.J) Isolates on Rubber (Hevea brasiliensis) through Morphologically and Polymerase Chain Reaction Technique

Yudiarto SARSONO¹, Dwi SUGIPRIHATINI¹, Tuti MURDIATI¹,
Masayun Eka MAYLANDARI¹, dan Tri Rapani FEBBIYANTI^{2*}

¹Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian
Badan Karantina Pertanian – Kementerian Pertanian
Jalan Pemuda Nomor 64 Kav 16-17 Rawamangun
Jakarta Timur 13220 DKI Jakarta

²Pusat Penelitian Karet Sembawa
Jalan Raya Palembang – Pangkalan Balai KM 29
Sembawa, Banyuasin 30953, Sumatera Selatan
*Email : trifebbi@yahoo.com

Diterima : 24 Juli 2020 / Disetujui : 21 Desember 2020

Abstract

Fusicoccum is one of the causes of leaf fall (leaf blight) in rubber plants. This disease has occurred in Johor Peninsular Malaysia rubber plantation in 2010, caused by the fungus Neofusicoccum ribis. Agricultural Quarantine as a Focal Point of the National Plant Protection Organization has an interest in ensuring the fungus that causes leaf blight on rubber plants and taking action to prevent entry and/or spread of Neofusicoccum ribis classified as Plant Pest Organisms (OPTK) A2 Group. Therefore, Agricultural Quarantine Agency through Center for Diagnostic Standard of Agricultural Quarantine in collaboration with Indonesian Rubber Research Institute Sembawa and the Indonesian Institute of Science Bogor tried to develop a test method to identify the fungus that causes Fusicoccum leaf fall disease in the rubber plantation for quarantine purpose. The purpose of this study was to characterize the pathogens that cause Fusicoccum leaf fall disease morphologically. Morphological examination results directly on the leaves of symptomatic rubber leaves fall, showed Neofusicoccum fungi. PCR testing by using Universal ITS1/ITS4 Primers and continued with Specific Primer BOT15/BOT16 obtained Neofusicoccum umdonicola and Neofusicoccum parvum, hereinafter referred

as Neofusicoccum complex with each similarity were 99.66% and 97.08%.

Keywords: Disease; Fusicoccum; leaf fall; morphology; Neofusicoccum; rubber

Abstrak

Fusicoccum merupakan salah satu penyebab penyakit gugur (hawar) daun pada tanaman karet. Penyakit ini pernah terjadi di pertanaman karet Johor Peninsular Malaysia pada tahun 2010, yang disebabkan oleh cendawan Neofusicoccum ribis. Karantina Pertanian sebagai Focal Point bagian dari Organisasi Perlindungan Tumbuhan Nasional berkepentingan untuk memastikan cendawan penyebab penyakit hawar daun pada tanaman karet dan melakukan tindakan untuk mencegah masuk dan/atau tersebarnya cendawan Neofusicoccum ribis yang dikelompokkan sebagai Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPTK) A2 golongan I. Oleh karena itu, Karantina Pertanian melalui Balai Besar Uji Standar Mutu Karantina Pertanian bekerja sama dengan Pusat Penelitian Karet Sembawa serta Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lembaga Ilmu

Pengetahuan Indonesia (LIPI) - Bogor mencoba mengembangkan metode uji dalam mengidentifikasi cendawan penyebab penyakit gugur daun *Fusicoccum* pada tanaman karet untuk keperluan karantina. Tujuan penelitian ini mengkarakterisasi patogen penyebab penyakit gugur daun *Fusicoccum* secara morfologi. Hasil pemeriksaan morfologi secara langsung terhadap daun karet bergejala gugur daun diperoleh jenis cendawan *Neofusicoccum* dan hasil pengujian PCR dengan menggunakan primer ITS1/ITS4 universal dan dilanjutkan dengan Primer BOT15/BOT16, diperoleh *Neofusicoccum umdonicola* dan *Neofusicoccum parvum* yang selanjutnya disebut sebagai *Neofusicoccum complex* dengan masing-masing tingkat kekerabatan 99,66% dan 97,08%.

Kata kunci : *Fusicoccum*; gugur daun; karet; morfologi; *Neofusicoccum*; penyakit

PENDAHULUAN

Tanaman karet (*Hevea bresiliensis*) termasuk dalam famili Euphorbiaceae dari genus *Hevea* (Dornelas & Rodriguez, 2005). Terdapat beberapa sentra produksi tanaman karet di Indonesia, antara lain Provinsi Sumatra Selatan, Sumatra Utara, Riau, Jambi dan Kalimantan Barat (Badan Pusat Statistik [BPS], 2018) dengan luas total 3,11 Juta Ha. Diantara provinsi tersebut, Sumatera Selatan merupakan penghasil lateks terbesar, yaitu 33,41% (991,000 ribu ton) dari total produksi Nasional (BPS, 2018), kemudian produksi lateks Indonesia menduduki peringkat ke lima sebagai penyumbang devisa terbesar dari sektor non migas yaitu sebesar 2,742 ton atau setara dengan USD 3.836,7 juta (BPS, 2018). Hal tersebut menempatkan Indonesia sebagai produsen karet terbesar kedua di dunia setelah Thailand (BPS, 2018).

Rendahnya produksi karet rakyat disebabkan oleh berbagai faktor, diantaranya adanya gangguan dari berbagai penyakit (Basuki, 1982). Penyakit tanaman dapat menimbulkan hambatan pada pertumbuhan dan kerusakan pada bagian

atau organ tanaman, penurunan hasil secara langsung atau kematian tanaman secara tidak langsung (Soepadmo, 1980). Penyakit tanaman karet tersebar di perkebunan karet Indonesia dengan menimbulkan kerusakan yang berbeda menurut lokasi kebun dan waktu yang berbeda.

Salah satu penyakit daun yang keberadaannya mulai meningkat di beberapa pertanaman karet yaitu penyakit hawar daun (*Leaf Blight*) *Fusicoccum* (Junaidi *et al.*, 2018; Febbiyanti *et al.*, 2018). Penyakit ini dilaporkan pernah terjadi pada awal 1987. Penyakit yang disebut dengan “menyerupai antraknos *Colletotrichum*” dilaporkan menyerang 60% TBM umur 4 tahun di daerah 50 m di atas permukaan tanah di negara bagian Johor, Semenanjung Malaysia. Jenis klon yang terinfeksi yaitu klon RRIM 600, PR 261, PB 260, PB 255 dan PB 217 (Radziah & Chee, 1989; Amponsah, 2010). Kemudian tahun 2010, penyakit yang disebabkan oleh *Neofusicoccum* sp ini kembali dilaporkan terjadi di Penisular Malaysia, menyerang tiga wilayah yaitu Selangor, Perak, dan Johor (Ngobisa *et al.*, 2012; Ngobisa *et al.*, 2013).

Di Indonesia, penyakit dengan gejala yang serupa pernah terjadi di Kebun Percobaan Balai Penelitian Sungei Putih, Sumatera Utara tahun 2013 yang menyerang klon IRR 117, tetapi belum menimbulkan kerugian yang berarti. Junaidi *et al.* (2018) melaporkan bahwa penyakit ini kembali terjadi di Balai Penelitian Sungei Putih, Medan, Sumatera Utara. Penyakit ini didominasi oleh patogen *Colletotrichum* dan *Fusicoccum*. Pada tanaman karet, patogen *Neofusicoccum ribis* dikelompokkan sebagai Organisme Pengganggu Tumbuhan (OPTK) A2 golongan I.

Menurut Peraturan Menteri Pertanian Nomor 31 Tahun 2018, *Neofusicoccum ribis* pada tanaman karet keberadaannya masih sangat terbatas dan diusahakan untuk tidak menyebar ke wilayah sentra karet lainnya di Indonesia. Oleh karena itu, perlu dipastikan bahwa patogen penyebab kejadian penyakit gugur

daun *Fusicoccum* yang dilaporkan terjadi di wilayah Sumatera Utara dan Sumatera Selatan. Untuk dapat melaksanakan hal tersebut, Badan Karantina Pertanian melalui Balai Besar Uji Standar Mutu Karantina Pertanian bekerja sama dengan Pusat Penelitian Karet Sembawa serta Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor mencoba mengembangkan metode uji dalam mengidentifikasi cendawan penyebab penyakit gugur daun *Fusicoccum* pada tanaman karet untuk keperluan karantina. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengkarakterisasi patogen penyebab penyakit gugur daun *Fusicoccum* secara morfologi dan deteksi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

BAHAN DAN METODE

Kegiatan pengembangan metode uji deteksi dan identifikasi cendawan pada tanaman karet dilaksanakan pada bulan April hingga Desember 2019 di Laboratorium Mikologi dan Biomolekuler Karantina Tumbuhan, Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP) Jakarta dan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor. Isolat *Fusicoccum* disediakan oleh Pusat Penelitian Karet Sembawa. Bahan yang digunakan yaitu sampel berupa daun karet bergejala gugur daun dan kultur murni cendawan patogen penyebab gugur daun dalam media agar kentang sukrosa. Sampel tersebut diambil dari klon BPM24 yang diperoleh dari Pusat Penelitian Karet Sembawa. Bahan pendukung lain terdiri atas Primer ITS1/ITS4, primer BOT15/16 Spesifik, marker 100 bp dan 1 kb, Master mix Green TAE 1x, Etidium bromide, Agar ros, Aquades steril, *seire* atau *lactofenol blue*, ch lorok, objek dan *cover glass*, kertas blotter, tiseu, kutex, kertas label, Alkohol 70%, spiritus. Alat digunakan dalam penelitian meliputi mikroskop stereo, mikroskop, nampan, *laminar air flow*, *biosafety cabinet*, *heat block*, timbangan, sentrifuge, mesin PCR, Geldoc, alat elektroforesis, mikropipet, mikro alu, jarum inokulasi, pipet, gunting, *cutter*, lampu spiritus.

Metode Pengujian Morfologi (Karakteristik Morfologi dan Kultur)

Pengujian Secara Langsung (*Direct Inspection*)

Seluruh sampel daun karet bergejala diperiksa secara langsung dengan menggunakan mikroskop stereo untuk melihat ada atau tidaknya hifa, konida, tubuh buah (*pycnidia*) dan sorus. Semua cendawan yang ditemukan dibuat preparat pada objek gelas dengan setetes larutan siere dan ditutup dengan *cover* gelas. Preparat tersebut kemudian diidentifikasi secara morfologi. Hasil identifikasi selanjutnya didokumentasikan dalam bentuk foto.

Pengujian Dengan Menggunakan Metode Kertas Saring (*Blotter Test*)

Seluruh sampel daun karet bergejala hawar dibilas air biasa yang mengalir sebanyak 1 kali, dipotong kecil-kecil, direndam klorok 1% ($\pm 1-2$ menit) dan dicuci dengan air akuades steril. Sampel kemudian diletakan dalam cawan petri yang berisi kertas saring yang telah dilembabkan dengan akuades steril. Selanjutnya diletakan dalam ruang inkubasi pada suhu kamar selama $\pm 7-14$ hari di bawah peninaran *Near Ultra Violet* (NUV) 12 jam terang-gelap. Setelah diinkubasi, seluruh sampel daun karet bergejala hawar dalam cawan petri di periksa untuk melihat ada atau tidaknya hifa, konida, tubuh buah (*pycnidia*) dan sorus. Semua cendawan yang ditemukan di buat preparat pada objek gelas dengan setetes larutan siere dan ditutup *cover* gelas. Preparat tersebut kemudian diidentifikasi secara morfologi dan morfometri dengan menggunakan mikroskop kompon. Hasil identifikasi selanjutnya didokumentasikan dalam bentuk foto.

Pengujian Dengan Menggunakan Kultur (Media Agar Kentang Dekstrosa, PDA)

Seluruh sampel daun karet bergejala hawar dibilas air biasa yang mengalir, direndam klorok 1% ($\pm 1-2$ menit), dicuci dengan akuades steril dan dikeringanginkan. Selanjutnya sampel diperiksa secara langsung menggunakan mikroskop stereo untuk melihat ada atau

tidaknya hifa, konida, tubuh buah (*pycnidia*) dan sorus. Semua cendawan yang ditemukan (dalam bentuk hifa, konida, tubuh buah (*pycnidia* dan *sorus*) dibiakan dalam media PDA. Selanjutnya diletakan dalam ruang inkubasi pada temperatur sejuk selama \pm 7-14 hari di bawah penyinaran *Near Ultra Violet* (NUV) 12 jam terang-gelap. Hasil kultur diperiksa dan didokumentasikan dan dikarakterisasi morfologinya menggunakan buku acuan menurut Rayachhetry *et al.* (1996), Slippers *et al.* (2004), Pavlic *et al.* (2009), Amponsah (2010), Begoude *et al.* (2010), Phillips *et al.* (2013), dan Sakalidis *et al.* (2013).

Metode Pengujian *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Ekstraksi DNA

Pengujian PCR dilakukan terhadap isolat cendawan target yang diduga *Neofusicoccum ribis*. Isolat diperoleh dari biakan murni setiap klon berumur 10 hari. Dari isolat tersebut sebanyak enam blok miselium yang ditumbuhkan pada temperatur 26°C dipindahkan ke dalam labu erlemeyer berisi 50 mL agar Broth Kentang Dekstrosa dan digoyang pada 60 rpm dalam suhu kamar selama 5 hari. Kemudian miselia disaring menggunakan kemas saring dan dicuci dua kali dengan akuades steril, dibiarkan mengering selanjutnya diambil 250 mg dan digerus dengan mikro alu dalam tabung kerucut mikro *centrifuge* 1,5 mL dengan penambahan nitrogen cair. Ekstraksi DNA dilakukan menggunakan protokol yang disarankan oleh Sambrook *et al.*, (1989) dan Birren dan Lai (1994). Setelah memperoleh DNA cendawan maka dilakukan pengujian menggunakan PCR Primer Universal ITS-1 dan ITS-4 (White *et*

al., 1990) dan dilanjutkan dengan primer BOT15/BOT16. Primer BOT merupakan primer spesifik keluarga *Botryosphaeriaceae* dan *Neofusicoccum ribis* termasuk dalam golongan ini. Dengan mengikuti komposisi pencampuran (dalam satuan volume) untuk reaksi PCR sebagai berikut 1 μ L Primer ITS 1 Forward, 1 μ L Primer ITS 4 Reserve, 1 μ L Template (DNA), 12,5 μ L Master Mix, dan 9,5 μ L Nuclease Free Water, sehingga volume total pencampuran adalah 25 μ L.

Amplifikasi dilakukan menggunakan PCR pada volume total 25 mL dalam siklus. 1 siklus pada 94°C selama 3 menit terdiri dari 35 Siklus Denaturasi 94°C, 1 menit, penempelan primer 60°C, 1 menit, pemanjangan primer 72°C, 2 menit. 1 Siklus pemanjangan akhir 72°C, 10 menit, siklus terakhir 4°C. Hasil PCR divisualisasi pada gel agaros 1% dalam larutan buffer TAE 1 \times 40 mM Tris, 20 mM asam asetat, dan 1 mM EDTA pada 80 Volt selama 45 menit dalam suhu ruang. Pembuatan agaros mengikuti rumus 1% x kapasitas cetakan gel agaros (mL). Untuk mempermudah visualisasi, gel diberikan pewarnaan dengan cara merendam dalam etidium bromide (\pm 30-60 menit), dan pita divisualisasikan di bawah sinar UV dan difoto menggunakan sistem dokumentasi gel (*gel doc*). Ukuran fragmen DNA yang diperkuat ditentukan menggunakan penanda berat molekul (GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)).

Sekuensing DNA dan Analisis

Sekuensing dari hasil produk PCR dilakukan ke pihak ketiga (First Base di Kuala Lumpur, Malaysia) menggunakan metode Sanger *et al.* (1977). Urutan sekuen

Tabel 1. Susunan basa primer yang digunakan dalam penelitian
Table 1. Prime base arrangement which was used in the experiment

| Primer Prime | Susunan basa Base arrangement |
|-----------------|----------------------------------|
| ITS1 | 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' |
| ITS4 | 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' |
| BOT15 | 5'-CTG ACT TGT GAC GCC GGC TC-3' |
| BOT16 | 5'-CAA CCT GCT CAG CAA GCG AC-3' |

fragmen gen yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan program BLAST pada website www.ncbi.nlm.nih.gov dengan menggunakan program MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakter Morfologi

Deskripsi morfologi dari *Fusicoccum* mengikuti kunci identifikasi menurut Pavlic (2009) dan beberapa referensi lainnya. Cendawan ini memiliki askostroma *erumpent* melalui permukaan kulit daun, diameter 100-400 μm . Askomata *pseudothecial*, membentuk kumpulan *botryose* hingga 5-50, *globose* dengan lubang pengeluaran askospora di tengah dengan *papillate* atau tidak, cokelat sampai kehitaman, 175-250 μm , dinding *pseudothecial* terdiri dari 5-15 lapisan tekstur angularis, bagian luar sel cokelat atau cokelat gelap, bagian dalam 2-4 lapisan sel-sel hialin yang melapisi lokus. Askus *bitunicate*, *clavate*, 8-askospora, 80-120 \times 17-20 μm . *Pseudoparasitiformis* *filiform*, bersekat, jarang bercabang, lebar 2-4 μm . Askospora *fusoid*, sering membulat di ujungnya kemudian secara luas ellips, hialin, 1 sel, halus dengan isi granular, *biseriate* pada ascus, (14-18)-(23-27) \times (6-8)-10 μm (rerata dari 80 askospora = 20,5 \times 7,1 μm). *Pseudotesium* subepidermal, bulat, diameter 230 μm , dinding *askokarp* dibentuk oleh sel-sel dari tekstur *angularis*, *silindris*, bertangkai pendek, 63-68 \times 13-14 μm , askospora *ellips* sampai *ellips* tidak teratur, hialin sampai kekuningan, 20-25,5 \times 6-8,5 μm . Konidia yang diproduksi dengan daun pinus pada awalnya hialin dan aseptat dan menjadi cokelat muda dan 1- atau 2-septate seiring bertambahnya usia. Selain itu, konidia berbentuk ellipsoidal dengan ujung membulat bundar dan bagian dasar terpotong dengan ukuran 16,5-24,0 \times 3,5-6,5 μm dan rasio P/L rata-rata 3,9 μm . Tidak ada struktur *teleomorphy* yang terbentuk.

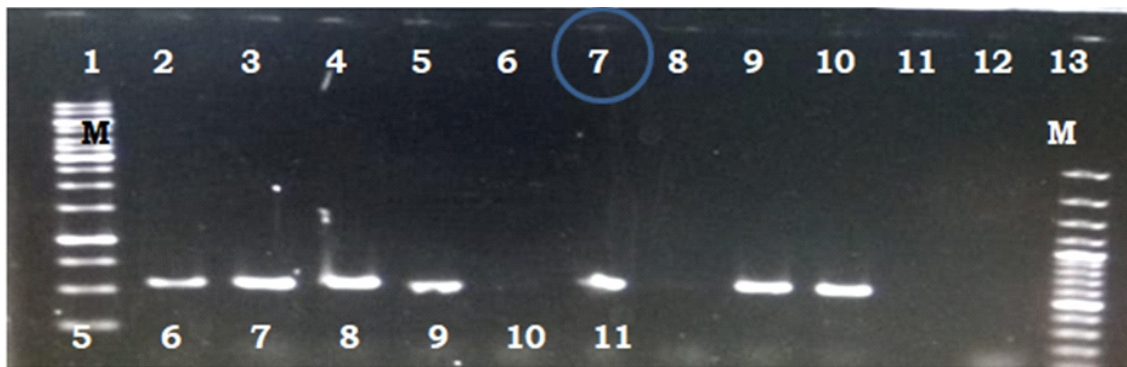
Isolasi cendawan tumbuh cepat dengan miselium putih yang berubah menjadi abu-abu kehijauan gelap atau abu-abu dalam beberapa hari. Koloni ditandai oleh pertumbuhan koloni cepat yaitu 16,5-17,0 mm/hari, yang menutupi cawan petri setelah 5 hari. Selain itu, miselium putih berbulu menjadi sedikit kuning atau kecoklatan di bagian bawah setelah 4 hari. Pada hari ke-5, pusat-pusat menjadi cokelat terang; miselium putih berbulu hanya pada bagian tepi. Piknidida muncul dalam 7-12 hari pada *Potato Dextrosa Agar*.

Karakter Molekuler Dengan Analisa Polymerase Chain Reaction (PCR)

Hasil amplifikasi ITS1/ITS4 menunjukkan isolat hasil karakter morfologi *Fusicoccum* pada garis ke-7 memiliki pita DNA berkisar antara 525 hingga 550 *basepare* (bp) dalam marker penanda 1 kb sebagai pembanding. Hasil analisis PCR selengkapnya tersaji dalam Gambar 1. Selain menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4, pada isolat target juga dilakukan analisis PCR dengan primer spesifik yaitu primer BOT dengan tahapan dan cara yang sama pada primer sebelumnya. Hasil amplifikasi isolat *Fusicoccum* menggunakan primer BOT memiliki kisaran pita DNA antara 340 bp sampai dengan 350 bp dalam marker penanda 100 *basepare*, selengkapnya tersaji pada Gambar 2.

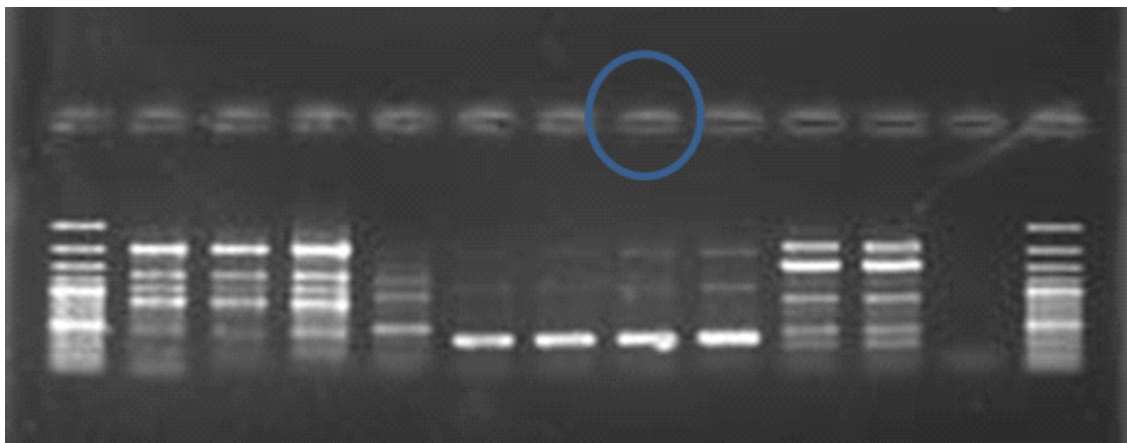
Pengujian PCR dilanjutkan pada tahapan skuensing DNA. Hasil skuensing produk PCR selanjutnya dibaca dan diurutkan menggunakan program MEGA versi 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Hasil analisis skuensing DNA tersebut disajikan pada Tabel 2.

Dari perbandingan di atas diperoleh nama jenis cendawan dari isolat uji. Berdasarkan hasil terlihat isolat uji memiliki kekerabatan lebih ke arah *Neofusicoccum umdonicola* strain CBS 12365 dengan homolog ikatan basa mencapai 99,66% dan



Gambar 1. Hasil amplifikasi dengan menggunakan primer ITS1/ITS4 pada gel *agarose* 1,2%, 100 volt selama 45 menit. Garis 1 berisi marker 100 bp, garis ke 7 berisi isolat uji, garis ke 10 Kontrol positif Fox P, Kontrol positif, Fox J; Garis ke 12 Kontrol negatif; dan garis ke 13 berisi marker 1kb

Figure 1. The amplification results used ITS1 / ITS4 primer on 1.2% agarose gel, 100 volts for 45 minutes. Line 1 contains marker 100 bp, line 7 contains target isolate, line 10 Positive control of Fox P, positive control, Fox J; Line 12 Negative control; and the 13 th line contains a 1kb marker

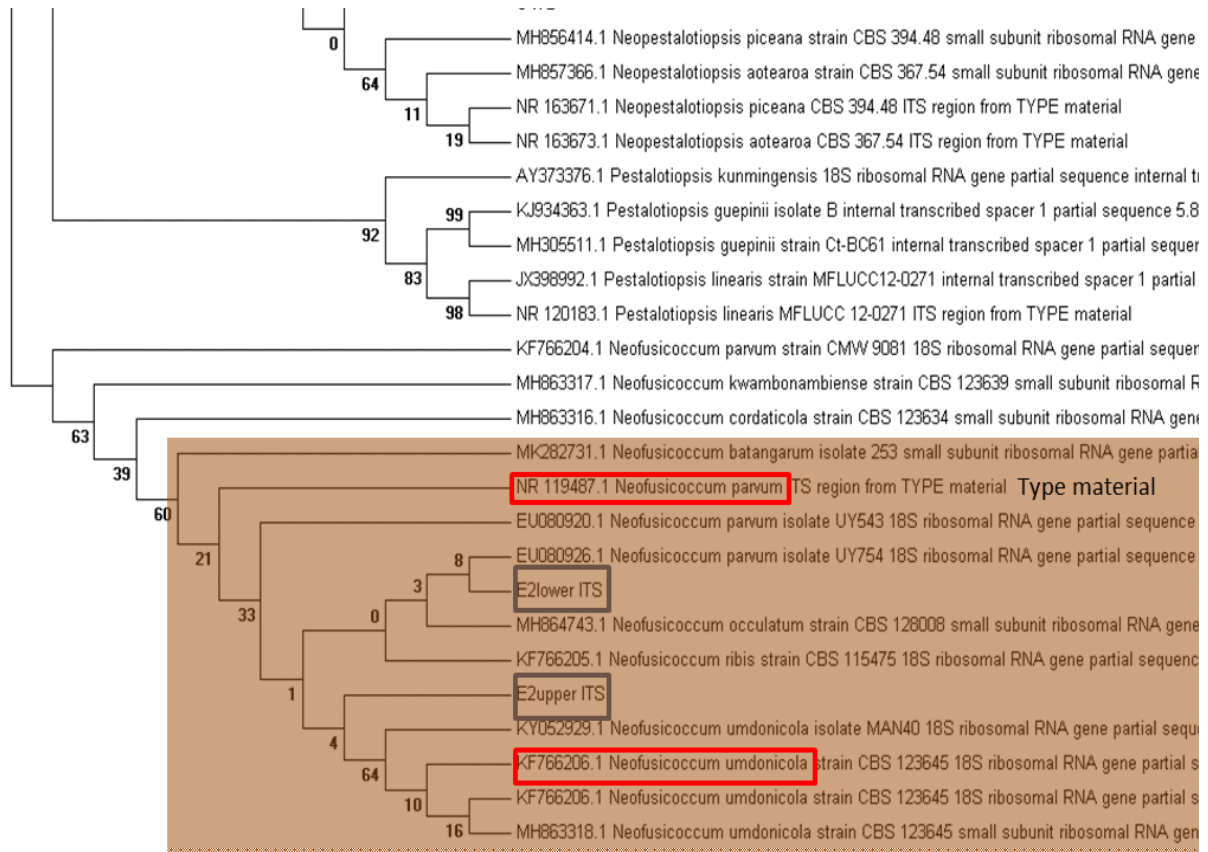


Gambar 2. Hasil amplifikasi menggunakan primer spesifik BOT15/BOT16 pada gel *agarose* 1,2 %, 100 volt selama 45 menit. Garis 2 : marker 100 bp; garis ke 8 berisi isolat uji, Kontrol positif Fox P, Kontrol positif Fox J; garis 12 berisi kontrol negatif dan garis ke 13 berisi marker 100 bp

Figure 2. The results of the amplification used BOT15 / BOT16 specific primers on agarose gel 1.2%, 100 volts for 45 minutes. Line 2: 100 bp marker; the 8th line contains target isolate, Fox P positive control, Fox J positive control; line 12 contains negative controls and the 13th line contains 100 bp markers

Tabel 2. Hasil penyejajaran DNA yang tersedia dalam data GenBank NCBI
 Table 2. Result of DNA sequence alignment available in NCBI GenBank data

| Isolat <i>Isolate</i> | Nama di NCBI <i>Name in NCBI</i> | Tingkat kekerabatan <i>Similarity analysis</i> |
|--------------------------|--|---|
| E2 | <i>Neofusicoccum umdonicola</i> strain CBS 12365 | 99,66 % |
| E2 | <i>Neofusicoccum parvum</i> strain CMW 9081 | 97,08% |



Gambar 3. Pohon *phylogenetic* isolat *Neofusicoccum parvum* dan *Neofusicoccum umdonicola* menggunakan analisa *Maximum Likelihood*
 Gambar 3. *Phylogenetic tree* of *Neofusicoccum parvum* and *Neofusicoccum umdonicola* isolates by using *Maximum Likelihood* analysis

Neofusicoccum parvum dengan tingkat kekerabatan 97,08% dan keduanya disebut sebagai *Neofusicoccum complex* karena memiliki hasil spesies yang berbeda dengan menggunakan dua primer yang berbeda (ITS dan BOT). Apabila ingin mendapatkan satu nama spesies yang pasti, maka harus menggunakan primer jenis beta tubulin atau Primer *Elongation Factor* (EF) yang dapat memberikan satu nama spesies. Selanjutnya hasil dari perbandingan di atas divisualisasi menjadi pohon *phylogenetic* dengan menggunakan ClustalW2. Pohon *phylogenetic* dibuat untuk mempermudah penilaian dan analisis kekerabatan, dengan gabungan hubungan kekerabatan yang berdekatan.

KESIMPULAN

Berdasarkan pengujian isolat patogen gugur daun *Fusicoccum* yang dilaporkan terjadi di wilayah Sumatera Utara dan Sumatera Selatan dengan menggunakan karakter morfologi dan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dapat diketahui adalah patogen *Neofusicoccum umdonicola* dan *Neofusicoccum parvum*. Kedua patogen ini selanjutnya disebut sebagai *Neofusicoccum complex* dengan masing-masing tingkat kekerabatan 99,66% dan 97,08%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Kepala Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, Bapak drh. Sriyanto, M.Si., Ph.D atas dukungan penelitian; Kepala Pusat Penelitian Karet Sembawa Palembang dan Peneliti Proteksi Pusat Penelitian Karet serta Badan Penelitian dan Pengembangan Teknologi-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Bapak Imam Hidayat Ph.D dan Ibu Dr.Marlina Ardiyanti, serta banyak pihak terkait yang tidak dapat disebutkan satu persatu hingga terwujudnya kajian penulisan ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amponsah, N.T. (2010). *Epidemiology of botryosphaeriaceous species associated with grapevines in New Zealand*. [Thesis]. New Zealand: Lincoln University-christchurch.
- Badan Pusat Statistik. (2018). *Statistik Karet Indonesia*. Jakarta, Indonesia: BPS.
- Basuki. (1982). *Penyakit dan Gangguan Pada Tanaman Karet*. Tanjung Morawa, Indonesia: Pusat Penelitian dan Pengembangan Perkebunan.
- Begoude, B.A.D., Slippers, B., Wingfield, M.J., & Roux, J. (2010). *Botryosphaeriaceae associated with Terminalia catappa in Cameroon, South Africa and Madagascar*. *Mycol. Progress*, 9, 101-123. <https://doi.org/10.1007/s11557-009-0622-4>
- Birren, B., & Lai, E. (1994). Rapid pulsed field separation of DNA molecules up to 250 kb. *Nucleic Acids Research*, 22(4), 5366-5370. <https://dx.doi.org/10.1093/nar22.24.5366>
- Dornelas, M.C., & Rodriguez, A.P.M. (2005). The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the LEAFY/FLORICAULA gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1965-1974. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri194>
- Febbiyanti, T.R., Alchemi, P.J.K., Fairuza, Z., & Herlinawati, E. (2018). The outbreak of *Fusicoccum* leaf disease in Indonesia and the potential yield loss. *International Plant Protection Workshop*. Palembang, Indonesia: Balai Penelitian Sembawa.

- Junaidi., Tistama, R., Atminingsih., Fairuzah, Z., Rachmawan, A., Darajat, M.R., & Andriyanto, M. (2018). Fenomena gugur daun sekunder di Wilayah Sumatera Utara dan pengaruhnya terhadap produksi karet. *Warta Per karetan*, 37(1), 1-16. <https://doi.org/10.22302/ppk.wp.v37i1.441>
- Ngobisa. N.A.I.C., Abidin, M.A.Z., Wong, M.Y., & Mahyudian, M.M. (2012). Cultural and morphological characterisation of *Fusicoccum* sp, the causal agent of rubber (*Hevea brasiliensis*) leaf blight in Malaysia. *Journal Rubber Research*, 15(1), 64-79.
- Ngobisa. N.A.I.C., Abidin, M.A.Z., Wong, M.Y., & Noordin, M.W.D.W. (2013). Neofusicoccum ribis associated with leaf blight on rubber (*Hevea brasiliensis*) in Peninsular Malaysia. *The Plant Pathology Journal*, 29(1), 10-16. <https://dx.doi.org/10.5423%2FPPJ.OA.07.2012.0110>
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., & Wingfield, M.J. (2009). Molecular and phenotypic characterization of the tree phylogenetic species discovered within the *Neofusicoccum parvum*/*N. ribis* complex. *Mycologia*, 101(5), 636-647. <https://doi.org/10.3852/08-193>
- Phillips. A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., & Crous, P.W. (2013). *The Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76(1), 51-167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Radziah, N.Z., & Chee, K.H. (1989). A new foliar disease of rubber. *Plant Pathology*, 38, 293-296. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1989.tb02147.x>
- Rayachhetry, M.B., Blakeslee, G.M., Webb, R.S., & Kimbrough, J.W. (1996). Characteristics of the *Fusicoccum* anamorph of *Botryosphaeria ribis*, a potential biological control agent for *Melaleuca quinquenervia* in South Florida. *Mycologia*, 88(2), 239-248. <https://doi.org/10.1080/00275514.1996.12026649>
- Sakalidis. M.L., Slippers, B., Wingfield, B.D., Hardy, G.E.St.J., & Burgess, T.I. (2013). The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: Global populations of the *Neofusicoccum parvum* - *N. ribis* species complex. *Diversity and Distributions*, 19, 873-883. <https://doi.org/10.1111/ddi.12030>
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis. T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, US: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings National. Academic Science USA.*, 74(12), 54637. <https://dx.doi.org/10.1073%2Fpnas.74.12.5463>
- Slippers, B., Burgess, T., Crous, P.W., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D., & Wingfield, M.J. (2004). Development of SSR markers for *Botryosphaeria* spp with *Fusicoccum* anamorphs. *Molecular Ecology Notes*, 4, 675-677. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00780.x>
- Soepadmo. (1980). Suatu pemikiran tentang pengendalian penyakit daun pada tanaman karet. *Menara Perkebunan*, 48(5), 147-154.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipksi, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., & Talor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Snisky, J.J., & White, T. J. *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*. New York, USA: Academic Press.