

# Laporan Kegiatan

## Penelitian Pengembangan Molekular Marker untuk Deteksi Awal Tembakau Resisten *Ralstonia* dan *Phytophthora*

Kolaborasi riset dengan PT. Sadhana



**UBAYA**  
UNIVERSITAS SURABAYA

Oleh:

**Johan Sukweenadhi, Ph.D.**

**Fakultas Teknobiologi  
Universitas Surabaya  
2022**

## HALAMAN PENGESAHAN

**Judul Kegiatan** : Penelitian Pengembangan Molekular Marker untuk Deteksi Awal Tembakau Resisten Ralstonia dan Phytophthora

**Pelaksana**

**Nama Lengkap** : Johan Sukweenadhi, Ph.D.

**NPK/NIDN** : 211016/ 0703088904

**Jabatan Fungsional** : Lektor 200

**Fakultas/Program studi** : Teknobiologi/ Biologi

**Hp** : 081232818580

**Email** : sukwee@staff.ubaya.ac.id


**Pelaksanaan Kegiatan** : Oktober 2021- Februari 2022

**Lokasi** : Universitas Surabaya dan PT. Sadhana


**Sumber pendanaan** : Pihak ketiga (PT. Sadhana)

**Total anggaran** : Rp 15.000.000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Teknobiologi,

  
Dr. rer. nat. Sulistyono Emantoko Dwi Putra, S.Si., M.Si.  
NIDN 0701127303

Pelaksana,

  
Johan Sukweenadhi, Ph.D.  
NIDN 0730088904

Mengetahui,  
Ketua Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat (LPPM)  
Universitas Surabaya

  
Prof. Suyanto, S.E., M.Ec.Dev., Ph.D.  
NIDN 0716027601

# DAFTAR ISI

Halaman Pengesahan .....	i
Daftar Isi .....	ii
Pendahuluan .....	1
Tinjauan Pustaka.....	5
Pelaksanaan Kegiatan .....	14
Kesimpulan dan Saran .....	27
Daftar Pustaka.....	43
Lampiran.....	49

# Pendahuluan

## I. Tujuan:

Adapun tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengetahui perbedaan ketahanan tembakau varietas Dark 302, dan Dark 314 terhadap oomycetes *Phytophthora nicotianae* bila diamati dari profil ekspresi gennya.
2. Mengetahui apakah terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen pada tembakau varietas Beinhart-1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314 dalam merespon infeksi oomycetes *Phytophthora nicotianae*.
3. Mengetahui pengaruh lama waktu infeksi oomycetes *Phytophthora nicotianae* pada ekspresi gen tembakau varietas Beinhart-1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314.
4. Mengetahui profil ekspresi mRNA gen ketahanan terhadap *Ralstonia solanacearum* (ERF15, WRKY11, dan CYP450) pada varietas tembakau uji.
5. Mengetahui ketahanan varietas tembakau uji (Dark-314 dan Dark-302) terhadap *Ralstonia solanacearum*.

## II. Latar belakang

Penyakit lanas atau *black shank* disebabkan oleh oomycetes *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan, merupakan salah satu penyakit utama tembakau seluruh dunia. Penyakit ini sangat merugikan petani sebab dapat menyerang tanaman tembakau di semua usia, baik saat usia bibit, muda, maupun dewasa, terutama di organ akar, batang, dan daun (Gallup *et al.*, 2006). Gejala infeksi yang timbul adalah tanaman layu, pangkal batang busuk dan tampak berwarna kecokelatan, serta nampak sekat-sekat di empulur bila dibelah (Steede *et al.*, 2017). Kerugian petani akibat serangan penyakit lanas di Indonesia dapat bervariasi, berkisar antara 10-90% (Hidayah dan Djajadi, 2009), sebab tanaman yang layu akibat serangan penyakit lanas perlu dicabut, dan dibuang. Tingginya persentase kerugian tersebut disebabkan oleh penyebaran *P. nicotianae* yang cepat saat kondisi lingkungan mendukung, salah satunya dari segi tanah yang kondusif, yaitu pH tanah umumnya asam, rendah konsentrasi fosfat dan bahan organik, serta tekstur lempung berpasir (Hidayah dan Djajadi, 2009). Faktor pendukung lain adalah kemampuan *P. nicotianae* untuk menghasilkan spora yang persisten di tanah, sehingga dapat menjadi sumber inokulum awal di

suatu lahan.

Upaya penanganan penyakit lanas telah dilakukan dengan mengombinasikan beberapa metode, seperti pemberian fungisida yang dicampurkan dengan air irigasi, maupun langsung pada tanah. Beberapa contoh fungisida yang baik untuk menangani penyakit lanas adalah Orondis Gold 2000, dan Ridomil Gold SL (Pfeufer, 2020). Penanaman tembakau dapat dilakukan hanya setiap tiga hingga empat tahun sekali untuk mengurangi pertumbuhan *P. nicotianae*; petani dapat menggantikan tembakau dengan berbagai tanaman yang berkerabat jauh dengan tembakau, misalnya jagung, kacang. Kelemahan yang ditemukan dalam aplikasi metode rotasi tanam ini adalah bahwa tembakau tidak dapat ditanam setiap tahun, sehingga berpotensi tidak mampu memenuhi permintaan pasar tembakau yang tinggi, sedangkan penggunaan fungisida dikenal tidak ramah lingkungan.

*Ralstonia solanacearum* (*Rs*) merupakan patogen tular tanah utama pada tanaman keluarga solanaceae, salah satunya tembakau (*Nicotiana tabacum*), yang menyebabkan penyakit layu bakteri yang sangat merusak. Bakteri ini memiliki beragam subspecies yang kompleks dan memiliki kisaran inang yang luas hingga >450 spesies. *R. solanacearum* dapat menyebabkan penurunan *yield* dan kualitas daun tembakau yang berarti (Gao *et al.*, 2019). Gejala awal yang ditimbulkan setelah proses pindah tanam berupa pertumbuhan daun yang asimetris atau layu di satu sisi (Yulianti *et al.*, 2012). Tindakan yang dinilai efektif untuk mengendalikan penyakit layu bakteri adalah penanaman varietas tahan. Maka, pemilihan metode seleksi varietas yang tepat menjadi penentu kesuksesan upaya pengendalian penyakit. Metode konvensional yang kini masih diterapkan oleh beberapa produsen membawa sejumlah kerugian terhadap produktivitas dan efisiensi industri. Salah satu faktornya adalah, secara praktis, seleksi fenotipik cenderung bergantung pada kondisi lingkungan sehingga membawa ketidakpastian hasil. Maka pemanfaatan seleksi berbasis penanda molekuler (MAS) mulai populer. Metode ini didasarkan sepenuhnya pada sifat genetik tanaman tanpa faktor lingkungan. Ini memungkinkan proses pemuliaan yang lebih tepat, cepat, dan hemat biaya, tenaga, serta waktu.

Seiring perkembangan zaman dan teknologi, pembuatan dan pengintroduksian tembakau galur resisten terhadap *oomycetes Phytophthora nicotianae* dan *Ralstonia solanacearum* banyak ditempuh sebab mampu meningkatkan produktivitas tembakau secara berkelanjutan, mengurangi biaya perawatan tembakau (*cost-effective*), dan tidak berefek buruk pada lingkungan. Terdapat empat varietas tanaman tembakau yang akan dipelajari dalam penelitian ini, yakni Beinhart-1000,

Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314. Tembakau varietas Beinhart-1000 merupakan salah satu varietas tembakau yang memiliki ketahanan parsial tinggi (*high partial resistance*) terhadap infeksi *oomycetes P. nicotianae*, sementara Hick Broadleaf adalah contoh varietas yang rentan (van Jaarsveld *et al.*, 2002).

Tembakau varietas Dark 302 dan Dark 314 merupakan dua contoh tembakau lokal Indonesia yang banyak tumbuh di area Jember, merupakan hasil adaptasi pada kondisi wilayah masing-masing, seleksi alam, dan persilangan dalam waktu lama. Tembakau lokal memiliki karakteristik spesifik dan khas daerah asal penanaman, termasuk dalam hal resistensi terhadap penyakit. Ketahanan tembakau varietas Dark 302 dan Dark 314 secara spesifik terhadap *P. nicotianae* hingga saat ini belum diteliti. Sejauh ini yang banyak dilakukan oleh pembudidaya tembakau di lapangan adalah pengamatan ketahanan melalui perhitungan tingkat kematian atau sakitnya tanaman akibat serangan patogen. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui profil resistensi tembakau varietas lokal pada penyakit lanas secara molekuler guna mempercepat *screening* varietas tembakau.

Analisis transkriptomik telah banyak digunakan untuk mempelajari respon pertahanan tanaman terhadap patogen, dan mengidentifikasi gen yang terkait. Di penelitian ini, akan dilakukan seleksi varietas tembakau resisten *P. nicotianae* berbasis molekuler, yakni melalui deteksi profil level ekspresi gen pada tanaman tembakau masing-masing varietas dalam merespon infeksi *oomycetes*. Gen terkait ketahanan tanaman tembakau yang dipilih yakni *Pathogenesis related 1 (PR1)*, *Pathogenesis related 4 PR4* (Bao *et al.*, 2019), sedangkan gen terkait kerentanan yaitu *Patatin like protein 2 (PLP2)*, dan *Plant U-box 24 (PUB24)* (Meng *et al.*, 2021). Penelitian mengenai level ekspresi gen terkait ketahanan maupun kerentanan tembakau varietas lokal seperti Dark 302, dan Dark 314 terhadap *P. nicotianae* belum pernah dilakukan. Kelebihan dilakukannya analisis transkriptomik adalah bahwa ketahanan tembakau terhadap *oomycetes P. nicotianae* dapat diketahui dengan lebih cepat dibandingkan uji penanaman di lahan yang umumnya memakan waktu beberapa bulan sejak penyemaian benih, sedangkan kekurangannya adalah diperlukan alat, bahan, dan tenaga kerja yang dapat melakukan analisis molekuler, juga laboratorium untuk mendukung sterilitas proses analisis. Diperolehnya informasi mengenai ketahanan tembakau terhadap *P. nicotianae* dengan lebih cepat akan meningkatkan efisiensi tindakan yang terkait dengan perencanaan lokasi dan teknik budidaya varietas tembakau tersebut.

Penelitian transkriptomik terdahulu mengungkapkan gen-gen penting yang berperan

mengatur ketahanan tembakau terhadap Rs yaitu ERF15, WRKY11, dan CYP450 (Li et al., 2021). Li et al. mengungkapkan bahwa ERF15 menjadi faktor transkripsi yang meregulasi ketahanan tembakau terhadap Rs secara positif. WRKY11 adalah faktor transkripsi lain yang memiliki peran utama dalam regulasi positif pada induced systemic resistance (ISR) yang dipicu oleh Rs. Sementara CYP450 ditemukan berperan signifikan terutama dalam jalur fenilpropana untuk meningkatkan akumulasi turunan fenilpropana sebagai upaya resistensi. Berdasarkan referensi terkait, juga basis data yang memadai, maka penelitian terkini hendak melakukan studi dasar berupa analisis ekspresi gen-gen tersebut, pada tingkat mRNA, menggunakan teknik PCR. Varietas unggul tembakau yang menjadi objek penelitian disediakan oleh PT. Sadhana yaitu Dark 302 dan Dark 314, tergolong tembakau Burley. Penelitian ini diharapkan menyediakan cukup informasi sebagai dasar untuk pengembangan penanda molekuler terpaut gen ketahanan terhadap Rs pada varietas terkait di masa mendatang.

# Tinjauan Pustaka

## Tembakau

Tembakau (*Nicotiana tabacum*) merupakan tanaman yang berasal dari Amerika Utara dan Amerika Selatan. Tembakau adalah salah satu jenis tanaman perkebunan yang paling banyak dikenal oleh masyarakat Indonesia. Bagian dari tanaman tembakau berguna sebagai bahan baku dalam industri pembuatan rokok. Tanaman tembakau ditampilkan pada **Gambar 1**. Berikut ini taksonomi dari tanaman tembakau:

Kingdom : Plantae  
Divisi : Spermatophyta  
Kelas : Dicotyledonae  
Ordo : Solanales  
Famili : Solanaceae  
Genus : *Nicotiana*  
Spesies : *Nicotiana tabacum L.*

(Tjitrosoepomo, 2007)



**Gambar 1.** Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)

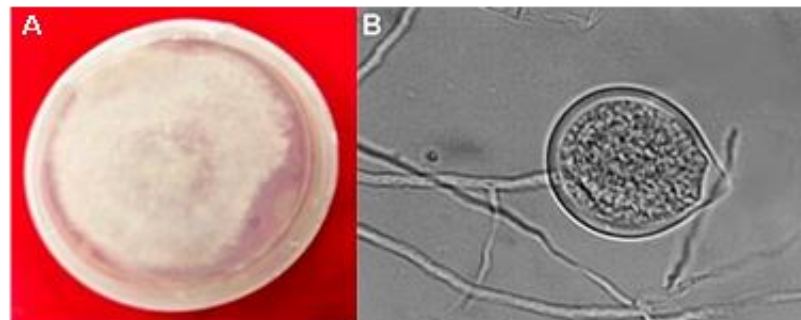
## *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan

*Phytophthora nicotianae* merupakan salah satu jenis *Phytophthora* yang menarik perhatian sebab telah menyebabkan kerugian besar di bidang pertanian, terutama sebab memiliki rentang tanaman inang (*host*) yang luas (Panabieres *et al.*, 2016), cocok berkembang di daerah beriklim



hangat dengan suhu tanah, sekitar 20-30°C. *Phytophthora nicotianae* juga dikenal dengan nama *Phytophthora parasitica* Dastur (Meng *et al.*, 2014). *Phytophthora nicotianae* merupakan patogen tipe hemibiotropik, yaitu akan mampu hidup berdampingan, dan mengambil nutrisi dari makhluk hidup (biotropik) pada masa awal infeksi, namun kemudian menginduksi kematian sel *host* dan hidup dalam jaringan mati (nekrotropik).

Selain memiliki banyak jenis tanaman *host*, *Phytophthora nicotianae* yang merupakan fitopatogen mirip jamur ini juga dapat menyerang di berbagai usia pertumbuhan, bertahan dengan baik di luar tubuh *host*. Tembakau merupakan *host* utama dari *Phytophthora nicotianae*, namun *oomycetes* ini juga dapat menyerang tanaman kentang, herba, dan berkayu lain; menyebabkan *foot rot*, *brown rot*, juga *gummosis* dan *root rot* pada tanaman spesies citrus (Erwin dan Ribeyro, 1996). Sporangia *P. nicotianae* dihasilkan oleh *sporangiophores*, dan pada kondisi sesuai serta ketersediaan air, mampu memproduksi zoospora yang mampu berenang bebas. Zoospora merupakan agen penginfeksi utama dalam menginisiasi terjadinya penyakit. Zoospora berkarakteristik tidak mempunyai dinding sel, memiliki inti sel tunggal, serta dua flagella untuk mendukung pergerakannya menuju sel *host* melalui mekanisme *chemotaxis* dan *elektrotaxis* (Walker dan van West, 2007). Zoospora kemudian melakukan penetrasi, memproduksi dinding sel dan kista, juga *germ tube* untuk kemudian menginfeksi jaringan tanaman (Ludowici *et al.*, 2013), seperti akar. Klamidospora *oomycetes* dapat bertahan di tanah bertahun-tahun.



**Gambar 2.** Kultur *P. nicotianae*; Penampakan kultur *P. nicotianae* yang ditumbuhkan di media Corn Meal Agar (CMA) selama 7 hari (Shilpa *et al.*, 2017) (A); sporangium *P. nicotianae* (Santos *et al.*, 2005) (B)

Teori *disease triangle* menyatakan bahwa suatu infeksi penyakit pada tanaman dapat terjadi jika terdapat interaksi antara 3 komponen penting yakni tanaman *host* rentan, fitopatogen virulen, dan lingkungan yang mendukung perkembangan penyakit tersebut (Agrios, 2005). Tembakau

telah diketahui secara luas sebagai jenis tanaman yang dapat diserang oleh *P. nicotianae*, namun variasi genetik pada *P. nicotianae* dapat menyebabkan beberapa varietas tembakau lebih rentan terhadapnya. Tembakau varietas NC 1071, dan Ky 14 x L8 diketahui dapat terserang oleh *P. nicotianae* ras 1, namun tidak oleh ras 0. Varietas Hicks dan K326 juga dapat terserang oleh *P. nicotianae* ras 1 (Sullivan *et al.*, 2005).

Hujan deras sering kali memberikan kesempatan bagi *oomycetes* seperti *Phytophthora* untuk menyebabkan penyakit pada tanaman (Bostock *et al.*, 2014), sebab tanah lahan menjadi lebih basah dan optimal untuk pergerakan zoospora ke akar tanaman (Gallup *et al.*, 2006). Penelitian yang dilakukan oleh Hidayah *et al.* (2021) memperlihatkan bahwa insiden penyakit lanas yang tertinggi di Temanggung, yakni sebesar 44%, ditemukan di lahan lembab seperti sawah; berlokasi di Desa Campursari. Penelitian yang dilakukan oleh Vanegas-Villa *et al.* (2020) menunjukkan bahwa suhu lingkungan (22-26)<sup>o</sup>C dan kelembaban relatif (65-70)% telah berhasil menyebabkan infeksi *P. nicotianae* pada tembakau. Derajat keasaman (pH) tanah juga mempengaruhi terjadinya infeksi penyakit lanas, yaitu terjadi optimal di pH > 6,2 (Hidayah *et al.*, 2021).

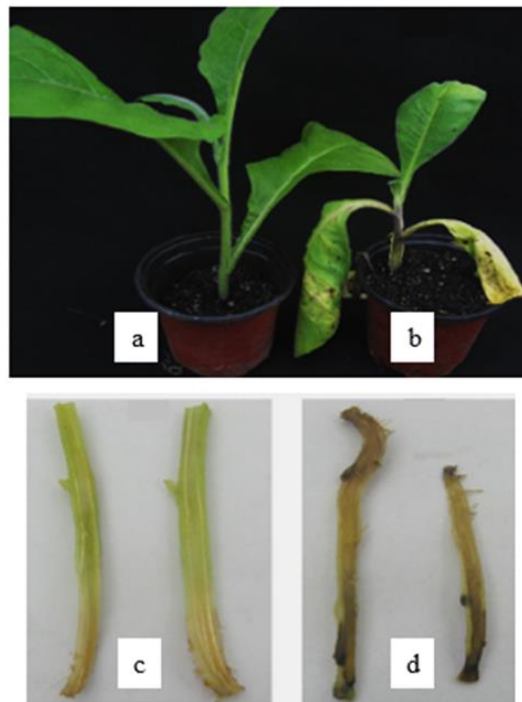
Pendapat serupa disampaikan oleh Shilpa *et al.* (2017), penyakit akibat *P. nicotianae* kerap muncul akibat adanya kondisi lembab dan hangat (25-30)<sup>o</sup>C, dan pada waktu yang cukup lama. Dengan demikian, waktu dimana kondisi lingkungan optimal untuk perkembangan patogen dapat dipertahankan cukup lama menjadi faktor keempat penyebab terjadinya infeksi tanaman. Selain suhu, tanaman *host*, fitopatogen, dan waktu, faktor kelima adalah manusia. Dalam hal infeksi buatan, manusia berperan sebagai faktor penyebab penyakit yaitu pembawa inokulum.

*P. nicotianae* yang tampak memiliki tipikal pertumbuhan berfilamen seperti fungi ini diketahui tidak termasuk dalam Kingdom Fungi, melainkan Kingdom Straminipilia sebab memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat dengan diatom dan alga coklat (Baldauf *et al.*, 2000). Salah satu faktor pembeda *oomycetes* 'fungi' dari *true fungi* adalah bahwa *oomycetes* merupakan organisme diploid, dan tidak memiliki tahap kehidupan sebagai haploid bebas. *Oomycetes* seperti *P. nicotianae* memiliki ukuran genom 50-250 Mb sedangkan *true fungi* berkisar 10-40 Mb. Keduanya memiliki bahan penyusun dinding sel yang berbeda, yakni didominasi selulosa pada *oomycetes*, serta kitin dan kitosan pada *true fungi*. Hifa dan spora dari *oomycetes P. nicotianae* tidak memiliki pigmen warna, sedangkan pigmentasi pada *true fungi* merupakan hal yang sering ditemui. Spora aseksual motil (zoospora) yang dihasilkan oleh *oomycetes* umumnya memiliki dua flagela (*biflagellated*) sedangkan fungi menghasilkan zoospora dengan satu flagela

(*monoflagellated*) (Judelson dan Blanco, 2005).

### ***Ralstonia solanacearum***

*Ralstonia solanacearum* (*Rs*) merupakan patogen yang terkenal menyerang tanaman Solanaceae seperti tomat, lada, terong, tembakau, dan lain-lain di seluruh dunia. Penyakit yang disebabkan oleh patogen ini dikenal sebagai layu bakteri dengan gejala layu daun atau batang, pencoklatan berkas pembuluh, atau bahkan kematian (Grimault, Anais and Prior, 1994) seperti yang terlihat pada Gambar 2.1. Layu bakteri tembakau (TBW), yang disebabkan oleh *R. solanacearum*, adalah penyakit tular tanah yang paling serius pada tanaman tembakau. Sebagian besar negara penghasil tembakau dengan iklim tropis lembab memiliki beban penyakit ini lebih besar sebagaimana kelembapan tinggi dan suhu hangat mendukung kemunculan penyakit pada interaksi kompatibel antara *Rs* dan inang tembakau (Denny, 2006).



**Gambar 3.** Tembakau yang mengalami layu bakteri. a) tembakau *mock-inoculated*; b) tembakau terinokulasi *Rs*; c) bagian vaskular batang tembakau *mock-inoculated*; dan d) bagian vaskular batang tembakau terinokulasi *Rs*.

(Li *et al.*, 2021)

Bakteri *Rs* dibagi menjadi 5 ras berdasarkan kisaran inang: ras 1 menyerang tembakau, tomat,

dan Solanaceae lainnya; ras 2 menyerang pisang (triploid) dan pisang ornamental dari genus *Heloconia*; ras 3 menyerang kentang; ras 4 menyerang jahe, dan ras 5 menyerang murbei. Sementara berdasarkan perbedaan sifat biokimia yaitu kemampuan oksidasi disakarida dan alkohol heksosa, bakteri ini lebih lanjut dibagi ke dalam 5 strain varian juga disebut biovar (Schaad *et al.*, 2001).

### **Penyakit *Black Shank***

Penyakit lanas atau *black shank* merupakan salah satu penyakit tular tanah tembakau polisiklik yang paling destruktif, dan tersebar secara luas di perkebunan tembakau dunia. Penyakit lanas mampu menyerang tembakau di semua usia pertumbuhannya, mulai usia bibit, hingga dewasa. Gejala penyakit yang muncul adalah tanaman layu, klorosis, nekrosis pada akar dan pangkal batang (Gallup *et al.*, 2018), tanaman kerdil, pangkal batang busuk dan tampak berwarna kecokelatan, serta bila dibelah, akan nampak sekat-sekat di empulur (Steede *et al.*, 2017), hingga kematian tanaman (Vontimitta dan Lewis, 2012). Serangan penyakit lanas pada tanaman tembakau usia dewasa yang rentan dapat mengakibatkan gejala layu daun secara mendadak, pembusukan pangkal batang hingga tampak bewarna coklat kehitaman dan berlekuk. Sel *host* (tembakau) dapat mengenali *cellulose-binding elicitin lectin* (CBEL) dari *P. nicotianae* sebagai PAMP (Gaullin *et al.*, 2006). Daun tembakau umumnya masuk dalam proses pemeraman untuk mematangkan daun, namun daun yang terserang penyakit berwarna coklat, dan kering sebelum waktunya sehingga tidak laku dijual.

Waktu inokulasi yang tepat dan jumlah inokulum yang sesuai merupakan dua faktor yang menentukan keberhasilan inokulasi buatan dalam pengujian menentukan ketahanan suatu varietas terhadap patogen. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Hidayah dan Yulianti (2010) menunjukkan bahwa kejadian penyakit lanas benar dipengaruhi umur bibit saat inokulasi. Presentase terbesar terjadinya penyakit lanas adalah saat zoospora *P. nicotianae* konsentrasi 1.350-2400 zoospora/bibit diinokulasikan pada tanaman tembakau varietas H382 usia 5 minggu setelah sebar (mss), yakni sebesar 56,9%. Penelitian lain yang mengevaluasi ketahanan tembakau lokal terhadap penyakit lanas dilakukan oleh Suhara dan Hidayah (2010). Pada penelitian ini, diinokulasikan zoospora *P. nicotianae* dengan kepadatan  $10^6$  zoospora/mL pada 10 galur tembakau usia 2 minggu setelah tanam (mst), dan gejala penyakit diamati selama 1-6 minggu pasca inokulasi.



**Gambar 4.** Gejala penyakit lanas; Daun klorosis, layu, kekerdilan pada tembakau terserang penyakit lanas (A); Sekat di empulur pada batang tanaman A yang dibelah membujur, juga miselium *oomycetes* (B); adanya sekat di empulur batang tembakau sebagai gejala spesifik penyakit lanas/ *black shank* (Hidayah *et al.*, 2021) (C)

### **Inokulasi Penyakit Tanaman secara Buatan**

Inokulasi buatan guna menyebabkan infeksi penyakit pada tanaman dapat dilakukan untuk mempelajari ekspresi gen tanaman merespon kondisi stres biotik, yaitu fitopatogen. Inokulasi umumnya dilakukan dengan jaringan tanaman yang sakit, potongan agar yang telah ditumbuhi koloni fitopatogen, maupun suspensi miselium. Beberapa metode inokulasi buatan untuk *Phytophthora* spp. telah dikembangkan selaras dengan meningkatnya minat penelitian mengenai spesies anggota Kelas *Oomycetes* ini.

Pengaplikasian metode inokulasi buatan dengan larutan *agar-water Phytophthora palmivora* yang dikembangkan oleh Delgadillo-Durán *et al.* (2020) telah berhasil menginfeksi seluruh bibit kakao uji. Persiapan inokulum diawali dengan menumbuhkan *P. palmivora* di media Carrot Agar (CA) selama 15-17 hari pada suhu ruang (25°C). Setelah 17 hari, ditambahkan 15 mL akuades steril dingin ke dalam masing-masing cawan Petri, dan dihomogenkan menggunakan sikat steril. Cawan Petri kemudian diinkubasi di suhu 4°C selama 30 menit, dan suhu ruang dalam durasi waktu yang sama. Zoospora yang berhasil dilepaskan dikuantifikasi dengan *Neubauer chamber*. Sebanyak 7 mL larutan media *agar-water* konsentrasi 0,4% b/v kemudian ditambahkan ke masing-masing cawan Petri berisi zoospora, *swab* steril dimanfaatkan untuk menghomogenkan

suspensi. Campuran media dan cairan zoospora yang telah membentuk struktur seperti gel kemudian diinokulasikan ke bagian abaksial daun tanaman kakao menggunakan *swab* steril.

Metode lain dikembangkan oleh McCorkle *et al.* (2018), diaplikasikan untuk menginfeksi *P. nicotianae* pada tembakau. Persiapan inokulum diawali dengan menumbuhkan *P. nicotianae* hingga ujung hifanya sampai ke tepi Petri, kemudian *oat grains* steril ditempatkan secara merata di permukaannya, dan diinkubasi kondisi gelap, suhu ruang, selama 15 hari. Tembakau diinokulasi dengan cara memasukkan beberapa *oat grains* yang telah ditumbuhi miselium *P. nicotianae* ke dalam tanah pot dengan kedalaman 1,5 cm.

Sementara itu, untuk mempelajari interaksi patogen dengan inangnya, maka perlu dilakukan induksi penyakit buatan (*in vivo*) pada inang yang diuji. Li *et al.* (2021) mempraktikkan metode inokulasi suspensi *Rs* ( $10^8$  CFU/mL,  $OD_{600} = 0.1$ ) menuju akar tembakau (yang memiliki 5-6 helai daun) yang sebelumnya telah dilukai. Dengan cara ini, insiden penyakit dapat mencapai 96,36% pada tembakau rentan di 25 hsi. Yulianti *et al.* (2012) melakukan metode yang sama, hanya saja bibit tembakau diinokulasikan 24 jam sebelum *transplanting* menuju *polybag*. Tingkat keparahan penyakit dari tembakau rentan yang dilaporkan mencapai 56,7% pada 7 minggu setelah inokulasi. Gao *et al.* (2019) juga serupa, namun bibit berumur 30 hari setelah sebar direndam di dalam suspensi bakteri selama 3 jam, kemudian dibilas dan dikeringkan untuk koleksi sampel secara langsung. Pada studi lain oleh Li *et al.* (2017), bibit tembakau berumur 70 hari setelah semai direndam dalam suspensi bakteri selama 30 menit, lalu dipindah menuju tanah dan dirawat di dalam *artificial climate chamber* (30,55 °C dan kelembapan relatif >81,42%). Dari teknik ini, diperoleh insiden sebesar 91.13%. Metode lain yang dinilai akurat untuk studi molekuler adalah infiltrasi daun (inokulum  $10^8$  CFU/mL) pada bagian abaksial menggunakan *syringe* tanpa jarum (Moslemkhani *et al.*, 2016). Metode ini mampu menyebabkan penyakit walau peneliti tidak menunjukkan data jumlah insiden penyakit.

### **Analisis Ekspresi Gen**

Pengukuran ekspresi gen secara kuantitatif merupakan metode yang penting untuk dilakukan guna mempelajari mekanisme seluler dasar dan efek dari berbagai perlakuan terhadap ekspresi gen sel. Pengukuran ini dilakukan dengan mengombinasikan metode *reverse transcription* (RT) dan *polymerase chain reaction* (PCR). Menurut Breljak *et al.* (2005), setidaknya terdapat dua masalah utama dalam mempelajari ekspresi gen menggunakan metode RT-PCR. Masalah pertama

adalah mengenai adanya fase *plateau* pada siklus PCR, yaitu saat laju produksi produk PCR rendah, serta terjadi dalam tingkat yang tidak diketahui sebab reagen PCR yang diperlukan untuk amplifikasi gen target telah habis digunakan. Dalam tahap ini, sampel tinggi konsentrasi gen target awal dapat menghasilkan produk amplikon yang sebanding dengan sampel konsentrasi rendah (Jalali *et al.*, 2011), sehingga memberikan hasil pengukuran yang tidak akurat. Masalah yang kedua adalah kesulitan untuk memastikan jumlah RNA telah sama dalam setiap sampel, sehingga perlu dilakukan amplifikasi dan analisis ekspresi *housekeeping gene* untuk setiap sampel dalam studi ekspresi ini.

Pengembangan metode *real-time* PCR telah memungkinkan dilakukannya kuantifikasi ekspresi gen secara akurat, konsisten, juga cepat (Letchumanan *et al.*, 2014), namun metode *semi-quantitative* PCR yaitu metode amplifikasi gen target dengan PCR yang dilanjutkan visualisasi amplikon dengan elektroforesis masih banyak digunakan dalam studi ekspresi gen tanaman. Hal ini dikarenakan metode *semi-quantitative* PCR dapat dilakukan menggunakan PCR tradisional, dan relatif lebih murah dibanding *real-time* PCR (Tang *et al.*, 2007). Metode *semi-quantitative* PCR juga telah digunakan oleh Martiansyah *et al.* (2018) dalam mempelajari ekspresi gen *HbP11-4* dari pohon karet (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) klon PB 206 dalam merespon stress biotik dan abiotik.

Hasil dari penggunaan metode *semi-quantitative* PCR juga dapat memberikan hasil sebanding dengan hasil penggunaan metode *real-time* PCR. Penelitian sebelumnya yang membandingkan hasil kuantifikasi gen antara metode *real-time* PCR dan *semi-quantitative* PCR dilakukan oleh Breljak *et al.* (2005). Dari hasil penelitiannya, disimpulkan bahwa kedua metode tersebut dapat memberikan hasil yang sebanding, yaitu mRNA APN dalam sel HL-60 yang terstimulasi oleh IFN- $\gamma$  konsentrasi 6 ng/mL meningkat sebesar 200% dibanding kontrol. Sehingga meskipun membutuhkan lebih banyak dana dan tenaga, metode *semi-quantitative* PCR merupakan teknik analisis molekuler yang penting dan berguna dalam analisis sampel, terutama dalam jumlah tidak banyak.

Pengetahuan mengenai resistensi tanaman tembakau lokal terhadap *P. nicotianae* hingga saat ini masih terbatas. Tembakau Beinhart-1000 merupakan salah satu varietas tembakau yang memiliki level ketahanan parsial kuantitatif tertinggi terhadap berbagai ras *oomycetes P. nicotianae*. Ketahanan ini diatur oleh banyak gen (multigen), secara parsial (tidak lengkap), dan penurunan gennya diduga kompleks di alam (Vontimitta dan Lewis, 2012). Penentuan dan deteksi

gen terkait resistensi maupun kerentanan terhadap *P. nicotianae* akan mempercepat proses budidaya varietas baru tembakau, yaitu diharapkan resisten.

Penelitian analisis transkriptomik tanaman tembakau terhadap *P. nicotianae* telah diteliti sebagai uji konfirmasi hasil sekuensing RNA. Tembakau burley varietas TKF 2002 diketahui merupakan salah satu contoh jenis tembakau yang resisten terhadap penyakit lanas, sedangkan TKF 4321 rentan. Inokulasi buatan pada tanaman tembakau TKF 2002 dan TKF 4321 usia 6 minggu dengan cara mencelupkan tanaman ke dalam suspensi kultur murni *P. nicotianae*, dan didapati gejala penyakit mulai muncul pada 3 hari setelah inokulasi. Dari hasil analisis metode RT-PCR, diketahui bahwa pada tembakau TKF 2002, gen *Pathogenesis Related* (PR)1 dan PR4 terekspresi tinggi di awal, yakni di 6-72 jam setelah inokulasi (jsi), sedangkan hal sebaliknya terjadi pada tembakau rentan, TKF 4321, gen PR1 dan gen PR4 terekspresi sedikit di awal waktu inokulasi, namun banyak terekspresi di waktu akhir, yaitu pada 96-120 jsi (Bao *et al.*, 2019). Ekspresi gen PR1 dan gen PR4 berhubungan dengan respon tembakau terhadap hifa biotropik dari *P. nicotianae*, sehingga ekspresi tinggi mulai jam ke-96 pasca inokulasi tidak mampu menyelamatkan tembakau TKF 4321, hal ini diduga sebab *P. nicotianae* telah berubah menjadi nekrotropik saat itu.

Selama interaksi tanaman-patogen, ekspresi gen berubah dan mekanisme pertahanan diaktifkan atau sebaliknya ditekan. Ketika tanaman terkena serangan patogen, interaksi yang kompatibel terjadi melalui kolonisasi tanaman rentan oleh patogen. Sementara yang tidak kompatibel menimbulkan mekanisme pertahanan yang mencegah masuknya patogen, serta pembentukan dan pertumbuhannya dalam tanaman (Moslemkhani *et al.*, 2016). Mekanisme pertahanan inang terhadap *Rs* umumnya terkait dengan penghambatan pertumbuhan dan mobilitas *Rs* pada sistem vaskular (Xue *et al.*, 2020). Melalui studi jaringan, Nakaho *et al.* (2000) menemukan adanya penguatan dinding sel parenkim dan membrane pit pada jaringan xilem serta terjadinya lokalisasi *Rs* pada xilem primer dari batang kultivar tomat yang resisten *Rs*. Keterlibatan penting protein dinding sel sebagai pertahanan terhadap *Rs* sudah dipelajari dalam beberapa penelitian (Dahal *et al.*, 2010; Schacht *et al.*, 2011)



# Pelaksanaan Kegiatan

## I. Waktu dan Tempat Kegiatan

Penelitian ini dilakukan mulai Agustus 2021 hingga Mei 2022 di Laboratorium Bioteknologi Mikroorganisme dan Laboratorium Bioteknologi Purifikasi dan Biologi Molekuler Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya (Surabaya, Jawa Timur). Eksperimen lapangan juga dilakukan di PT. Sadhana (Pasuruan, Jawa Timur) pada September 2021.

## II. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: Beaker glass 50 mL-1000 mL, tabung reaksi, pipet tetes, pipet volume, spektrofotometer UV-Vis, instrumen High Performance Liquid Chromatography (HPLC), kolom C18, set alat ekstraksi soxhlet, corong pisah, rotary evaporator, labu takar 5 mL, oven, waterbath, cawan porselen, evaporator, timbangan analitik, pH meter, spektrofotometer UV-Vis, milipore, kuvet, ayakan mesh, labu takar 5-10 mL, kertas saring, evaporator, mikropipet 1-10  $\mu$ L, mikropipet 10-100  $\mu$ L, plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) F254, chamber, dan TLC Scanner.

Bahan tanaman tembakau yang digunakan dalam penelitian ini dipersiapkan oleh PT Sadhana, terdiri atas varietas Beinhart-1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314. Kultur *Ralstonia solanacearum* dan oomycetes *Phytophthora nicotianae* didapatkan dari Balai Penelitian Tanaman Pemanis dan Serat (Balittas) Malang. Sampel tanah dan isolat patogen diambil dari tanaman terinfeksi penyakit lanas di lahan PT Sadhana yang terletak di Pasuruan, Jawa Timur (-7.765, 112.739). Bahan habis pakai yang digunakan yaitu, nitrogen cair yang dibeli dari PT. Aneka Gas Industri, aluminium foil, rolled oat whole grains (Bob's Red Mill), surgical blade (GEA medical), cawan Petri 90x15mm (NESTscientific. USA), microcentrifuge tubes (Biologix 1,5 mL), PCR tubes (Genfollower 0,2 mL), 1 mL pipet tips (Biologix), 100  $\mu$ L pipet tips (Biologix), 10  $\mu$ L pipet tips (Biologix), media Corn Meal Agar (CMA) (Himedia), media Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck), kit ekstraksi RNA (Favorgen, FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit),  $\beta$ -Mercaptoethanol, Reverse Transcription Kit (SMOBIO RP1400), Master Mix (SMOBIO ExcelTaq™ 5x PCR Master Dye Mix dan ABclonal PowerPol 2x PCR Mix RK20719), sterile water for irrigation (WIDA WITM Unicap), etanol teknis 96%, etanol p.a, buffer Tris Borate EDTA (TBE) 0,5x, ethidium bromide (EtBr), agarosa bubuk (molecular biology grade, GeneDireX), primer PCR

PR1a, PR4, PUB24, PLP2, dan L25 (Macrogen), DNA ladder (SMOBIO ExcelBand™ 50 bp DM1100 dan SMOBIO ExcelBand™ 100 bp DM2100).

### **III. Metodologi Penelitian**

#### **Variabel dan parameter penelitian**

Variabel bebas yang diteliti dalam penelitian ini adalah varietas tanaman tembakau, yaitu Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314. Variabel terikat yang diamati adalah ekspresi relatif PR1, PR4, PLP2, dan PUB24 pada tembakau uji; dengan gen L25 sebagai housekeeping gene. Variabel kontrol di penelitian ini adalah jumlah tanah inokulan yang diberikan sebagai agen infeksi (*Ralstonia solanacearum* dan oomycetes *Phytophthora nicotianae*), umur tembakau tiap varietas, titik waktu sampling, serta kondisi pertumbuhan tembakau yang terdiri atas volume air dalam penyiraman, jumlah dan jenis pupuk, serta lingkungan tumbuh yaitu di greenhouse Laboratorium Tanaman UBAYA.

#### **Persiapan Tembakau**

Tanaman tembakau yang diteliti dalam penelitian ini didapatkan dari PT Sadhana, terdiri atas varietas Beinhart-1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314. Pembibitan tembakau dilakukan dengan menaburkan 0,07 gram benih tembakau secara merata ke atas permukaan tanah basah. Benih yang akan disebar sebelumnya telah dicampur dengan pasir halus sebagai pemisah antar benih, dan penanda sebab warnanya abu-abu sedangkan benih tembakau berwarna cokelat tua hingga hitam. Takaran benih tembakau dengan pasir adalah 0,07 gram benih dicampurkan dengan 3 gram pasir atau 2,33% b/b.

Setelah berusia 14 hari setelah semai (hss), bibit tembakau akan memiliki 3-4 lembar daun, dan siap untuk dipindahkan ke *tray* pembibitan menggunakan pinset. *Tray* penampung bibit sebelumnya telah diisi dengan tanah basah. Untuk membasahi tanah, setiap 0,05 liter tanah (1 lubang *tray*) dibasahi dengan 50 mL air. Seusai penanaman bibit ke *tray*, tanah *tray* perlu dibasahi kembali dengan cara direndamkan dalam wadah berisi air selama 5 menit untuk merekatkan tanah.

Pada usia 60 hss, bibit tembakau dipindahkan ke *polybag* berisi 10 liter media tanam. Media tanam yang digunakan terdiri atas campuran pupuk kompos dan media *mix* dengan perbandingan 5:1. Media *mix* berisi tanah sungai, *cocopeat*, dan arang sekam dengan perbandingan 4:3:2. Satu hari sebelum dicabut untuk dipindahkan, 3-4 daun bibit tembakau yang lokasinya di batang bagian atas, juga berukuran besar atau lebar digunting (*clipping*)

sebanyak 50-75% bagiannya. Pemupukan tembakau dilakukan dengan memberikan 25 mL larutan pupuk KNO<sub>3</sub> konsentrasi 1,5 gram/L ke tanah masing-masing *polybag*. Bibit tembakau yang telah ditanam di *polybag* tersebut dipelihara hingga berusia 144 hss sebelum akhirnya dilakukan perlakuan selanjutnya. Pada penelitian ini digunakan 48 tanaman tembakau, 24 tanaman termasuk dalam kelompok perlakuan, sedangkan sisanya adalah kontrol.

### **Persiapan Inokulum *Phytophthora nicotianae***

Kultur *oomycetes Phytophthora nicotianae* yang diperoleh dari Balittas segera diremajakan di media CMA baru, dilakukan dengan cara menanam 5 *agar plugs* miselium dalam posisi terbalik sehingga miselium berkontak langsung dengan media. Kultur *P. nicotianae* dalam media baru kemudian diinkubasi gelap pada suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) selama 5 hari. Persiapan inokulum yang dilakukan dibagi menjadi dua jenis berdasarkan targetnya. Jenis pertama adalah persiapan dengan tujuan memproduksi zoospora, sedangkan yang kedua adalah tidak hanya terbatas pada zoospora, namun suspensi inokulum secara keseluruhan.

Produksi suspensi zoospora *P. nicotianae* dilakukan dengan memodifikasi metode yang dilakukan oleh Kusvianti *et al.* (2014) dalam menginduksi zoospora *P. capsici*. Induksi diawali dengan mensubkultur *P. nicotianae* di media CMA, kemudian menginkubasi dalam kondisi disinari lampu terus menerus, dan suhu ruang selama 4 hari. Agar berisi biakan yang tumbuh dibagi menjadi 4 bagian. Masing-masing bagiannya dipindahkan ke cawan Petri steril baru, dipotong menjadi blok kecil seukuran  $\pm 1 \text{ cm}^2$ , kemudian ditambahkan 20 mL akuades steril yang mampu menggenangi blok potongan agar. Kondisi tergenang ini didiamkan dalam suhu ruang selama 1 jam. Setelah 1 jam, akuades sebelumnya dibuang, dan diganti dengan 20 mL akuades steril baru. Dalam tujuan menghasilkan sporangium, cawan Petri diinkubasi selama 24 jam dalam kondisi terang, dan suhu ruang. Setelah 24 jam, cawan Petri dimasukkan dalam kulkas bersuhu  $4^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam untuk memberikan *cold shock*. Tindakan pengejut yang bertujuan untuk menginduksi pelepasan zoospora ini dilanjutkan dengan memindahkan cawan Petri ke inkubator bersuhu  $28^{\circ}\text{C}$  selama 1 jam. Cairan suspensi hasil induksi zoospora dituang ke falcon, kemudian ke cawan Petri, dan diamati di bawah mikroskop untuk mendeteksi keberadaan zoospora. Bila zoospora berhasil dilepaskan dalam suspensi, maka konsentrasinya akan dihitung menggunakan *haemocytometer*.

Persiapan suspensi *P. nicotianae* dilakukan dengan memodifikasi metode yang dilakukan oleh Hidayah dan Yulianti (2010) dan Bao *et al.* (2019). Kultur *P. nicotianae* diinkubasi selama 2 minggu dalam media CMA hingga miselium memenuhi seluruh

permukaan agar. Kemudian media agar dimasukkan dalam blender, ditambahkan 70 mL akuades steril, kemudian diblender selama 20 detik. Suspensi *P. nicotianae* diamati di bawah mikroskop, kemudian diletakkan dalam *ice bath* sampai akan digunakan. Dalam uji pendahuluan, cairan suspensi *P. nicotianae* dan cairan hasil induksi zoospora diinokulasikan ke tembakau varietas Dark 302 usia 72 hss dengan cara menuangkannya ke dalam tanah yang telah dilubangi sedalam 5 cm. Kedua cairan tersebut tidak diinokulasikan ke tanaman tembakau uji sebab melalui uji pendahuluan, diketahui tidak mampu menyebabkan penyakit lanas, yaitu tembakau varietas rentan teramati sehat pada pengamatan di waktu 3 minggu setelah infeksi. Kenampakan tembakau pasca inokulasi cairan hasil induksi zoospora dapat diamati pada Lampiran 1. Kondisi tembakau pasca inokulasi teramati sehat, tidak menunjukkan gejala terinfeksi penyakit lanas, memiliki daun yang lebar dan berwarna hijau, batang tegak, juga berwarna hijau.

### **Isolasi Kultur Kandidat *Phytophthora nicotianae* dari Tembakau Sakit**

Kultur kandidat *Phytophthora nicotianae* diisolasi dari batang tanaman tembakau yang mengalami gejala penyakit lanas di lahan PT Sadhana. Metode isolasi kultur merujuk pada metode yang dilakukan oleh Henuk *et al.* (2017) pada penelitiannya yang telah berhasil mengisolasi *Phytophthora citrophthora* dari batang tanaman jeruk. Batang tembakau yang akan diambil dicuci terlebih dahulu dengan air mengalir. Batang tembakau kemudian dibelah, dan disterilisasi permukaannya dengan cara direndam dalam larutan sodium hipoklorit 0,5% selama 30 detik, lalu dibilas menggunakan akuades steril. Bagian dalam batang yang telah dikeringkan kemudian ditempatkan dalam media CMA secara aseptis untuk diinkubasi selama 1-2 hari pada suhu ruang ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ). Satu *agar plugs* miselium berukuran 5 mm x 5 mm yang berhasil tumbuh dari potongan batang kemudian disubkultur dengan cara dipotong pada bagian ujung miselium yang aktif tumbuh, kemudian ditanamkan secara terbalik di media CMA segar sehingga miselium isolat dapat menempel di permukaan media. Tindakan subkultur ini bertujuan untuk memurnikan kultur kandidat *P. nicotianae* dari mikroorganisme kontaminan yang masih tumbuh. Subkultur dilakukan sebanyak 3 kali hingga kultur tampak tumbuh seragam secara penampakan makroskopis dan mikroskopis.

Kultur kandidat *P. nicotianae* diperbanyak dalam media CMA untuk memenuhi kebutuhan sekuensing dan inokulasi buatan pada tanaman tembakau uji. Identifikasi spesies isolat secara molekuler dilakukan oleh Macrogen melalui program *Internal Transcribed Spacer (ITS) Region Sequencing*. Area ITS dari *ribosomal DNA (rDNA)* diamplifikasi menggunakan sepasang primer umum yaitu ITS4 dan ITS5 (White *et al.*, 1990). Sekuens

primer yang digunakan adalah ITS5 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') dan ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Sekuens ITS1-5.8S-ITS2 yang didapatkan kemudian dianalisis menggunakan *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) di *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Zhang *et al.*, 2000). Strain jamur yang memiliki kemiripan sekuens tertinggi dipilih sebagai strain referensi (Genç *et al.*, 2020), yaitu sebesar lebih dari 90%, dan *e-value* 0.0 (Henuk *et al.*, 2017).

Persiapan kultur untuk diinokulasikan secara buatan pada tembakau dilakukan dengan memodifikasi metode yang dilakukan oleh French-Monar *et al.* (2006). Pada mulanya, kultur ditanam di media CMA, lalu diinkubasi gelap selama 5 hari pada suhu ruang. *Rolled oat grains* yang dibutuhkan untuk menumbuhkan kultur disterilisasi dengan cara diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan hingga suhunya mencapai suhu ruang. Setelah itu, 5 *agar plugs* kultur dimasukkan secara aseptis ke dalam toples kecil berisi 25 gram *oat grains*, lalu 10 mL akuades steril ditambahkan untuk meningkatkan kelembaban. Lima toples kultur kecil *oat grains* diinkubasi gelap selama 5 hari pada suhu ruang. Setelah 5 hari, dilakukan peningkatan volume atau skala kultur *oat grains* agar mampu memenuhi kebutuhan inokulasi buatan. Keseluruhan isi dari 5 buah toples kecil kultur *oat grains* yang telah dibuat sebelumnya dipindahkan secara aseptis ke toples berukuran lebih besar dimana di dalamnya telah berisi 250 gram *oat grains* beserta 100 mL akuades steril. Inkubasi kultur besar dilakukan selama 20 hari pada suhu ruang, dan kondisi gelap.

### **Isolasi *Ralstonia solanacearum***

*Bacterial streaming* terlebih dahulu dilakukan terhadap sampel batang segar dari tembakau yang layu. Proses tersebut merupakan peristiwa keluarnya populasi bakteri dari jaringan tanaman setelah jaringan direndam di dalam air. Bagian batang yang dekat dengan akar tanaman dipisahkan dengan potongan melintang dan dibelah secara membujur. Bagian tersebut diletakkan menghadap bagian dalam *erlenmeyer* berisi air dengan ujungnya yang masuk permukaan air. Batang dibiarkan berada pada posisi terendam selama 10 menit, bila tanaman terinfeksi maka akan keluar untai berwarna putih susu yang jelas dari ujung batang (xilem) yang terpotong.

Air yang mengandung bakteri selanjutnya dihomogenkan dan diambil sebanyak 100 µL untuk disebar pada agar *casein-peptone lecithin polysorbate* (CPLP) *broth* termodifikasi dengan TTC. Inkubasi dilakukan selama 48 jam pada 28 °C. Koloni dengan inti merah muda dan tepi yang kasar berwarna krem adalah tipikal *R. solanacearum* yang virulen. Sementara koloni dengan tepi yang halus dan tidak berwarna krim adalah non-virulen, yang mana tidak

baik sebagai inokulum. Metode *streak* selanjutnya dilakukan secara berulang hingga didapatkan koloni tunggal.

### **Inokulasi Buatan kultur *Phytophthora nicotianae* dan Pengambilan Sampel Tembakau**

Inokulasi buatan dalam penelitian ini diawali dengan mencampurkan secara merata 375 gram kultur *oat grains* dengan 1.926 gram tanah yang diambil dari lahan PT Sadhana, membentuk konsentrasi inokulum sebesar 16,3% b/b. Pembuatan inokulum dengan metode ini mereferensi penelitian yang dilakukan oleh French-Monar *et al.* (2006), namun dengan modifikasi pada bagian persentase tanah banding inokulum, yaitu pada penelitiannya digunakan inokulum 20 gram biji gandum *red winter* yang telah ditumbuhi *P. capsici* selama 21 hari dalam setiap 1 kg tanah pasir; membentuk konsentrasi inokulum sebesar 2% b/b. Tanah yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari sekitar area tumbuh tembakau yang sebelumnya terinfeksi penyakit lanas. Campuran tanah dan kultur *oat grains* kemudian dibagi menjadi 24 bagian, sesuai dengan jumlah tanaman tembakau kelompok kontrol yang akan diinokulasi, yaitu 6 tanaman dari masing-masing varietas. Masing-masing bagian memiliki massa 95 gram.

Inokulasi penyakit dilakukan dengan cara menaburkan, juga mencampurkan tanah media tanam tembakau yang berada di bagian permukaan dengan campuran inokulum. Hanya tembakau perlakuan yang diinokulasi, sedangkan kelompok kontrol tidak. Inokulasi buatan dilakukan pada sore hari di musim hujan dimana kelembaban udara tinggi 75%, sedangkan suhu udara rendah 25,6°C, sehingga mendukung terjadinya infeksi penyakit oleh *Phytophthora nicotianae*. Suhu juga kelembaban udara harian *greenhouse* diukur menggunakan alat *thermometer* dan *hygrometer* digital selama *sampling* daun tembakau, tercatat rata-rata kelembaban udara (78,25±5)%, sedangkan suhu udara (26,2±1,3)°C.

Daun muda tembakau yang tidak mengalami nekrotik tembakau dari masing-masing varietas, baik kelompok kontrol maupun perlakuan diambil pada hari ke-0, 1, 2, 3, dan 9 pasca inokulasi buatan inokulum *P. nicotianae*. Pemilihan titik *sampling* ini merujuk pada hasil penelitian Bao *et al.* (2019) yang menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara respon ekspresi gen tembakau varietas tahan dan rentan pada jam ke-24, 48, 72 pasca inokulasi *P. nicotianae*. *Sampling* pada hari ke-9 dilakukan sebab tembakau Hick Broadleaf yang merupakan varietas rentan telah sekarat, menunjukkan gejala penyakit lanas yang parah.

Sebelum *sampling* daun, disiapkan kantong-kantong *aluminium foil* penampung daun yang dilabel sesuai kode sampel. Bagian dalam kantong *aluminium foil* didinginkan terlebih dahulu dengan cara menuangkan nitrogen cair ke dalamnya. Daun dipetik dan sesegera

mungkin dimasukkan ke dalam kantong *aluminium foil*, lalu ditambahkan nitrogen cair guna membekukan daun. Hal ini dilakukan untuk meminimalisir kerusakan RNA daun yang merupakan biomolekul rentan. Tembakau setiap varietas, baik kelompok perlakuan maupun kontrol yang dipetik daunnya pada titik *sampling* pertama, dikhususkan untuk *sampling* titik tersebut, sehingga tidak diambil pada titik *sampling* berikutnya. Tahap berikutnya, daun ditumbuk hingga menjadi bubuk menggunakan mortar dan pestel yang telah disterilisasi sebelumnya. Penghancuran jaringan daun perlu dilakukan kondisi dingin, dan hingga sehalus mungkin (Yockteng *et al.*, 2013).

### **Inokulasi buatan kultur *Ralstonia solanacearum* dan pengambilan sampel tembakau**

Sebelumnya dilakukan sanitasi terhadap seluruh permukaan area di dalam *greenhouse*. Air kran digunakan untuk menyapu kotoran kasar yang ada, lalu area dibiarkan mengering sejenak. Langkah selanjutnya dengan penyemprotan fungisida dan natrium hipoklorit (NaOCl) 2,4% dengan masing-masing waktu pengaplikasian selama 30 menit. Pembilasan dengan air kran dilakukan di akhir untuk menyingkirkan residu kimia. Inokulasi buatan dilakukan dengan kombinasi melalui akar dan daun. Dari akar, cairan inokulum disuntikkan ke dalam media *polybag* yang berisi tembakau. Inokulum dilepaskan pada kedalaman  $\pm 50$  mm dari permukaan media dan berjarak  $\pm 10$  mm dari tembakau. Sementara melalui daun, cairan inokulum diinfiltrasikan menggunakan *syringe* tanpa jarum pada sisi bagian bawah dari daun muda sehat (kehijauan dan segar) yang terletak pada bagian pucuk tanaman. Inkubasi dilakukan selama 3 hari dengan pengamatan harian terhadap fenotip untuk gejala-gejala yang akan timbul (seperti kelayuan pada daun dan batang yang menghitam). Tembakau yang diinokulasi menggunakan akuades steril berlaku sebagai kontrol.

Kondisi pertumbuhan dijaga pada 28-30°C dan RH 70-80%. Pelipatan bagian *polybag* kearah tanaman dilakukan untuk menutupi sebagian besar permukaan media sehingga kelembapan dapat terjaga. Penyiraman tanaman dilakukan setiap pagi hari menggunakan  $\pm 500$  mL air kran per *polybag*. Pembasahan lantai *greenhouse* dan *misting* di area sekitar tanaman dilakukan setiap siang hari. Koleksi sampel daun dilakukan pada hari ke-0, -1, -2, dan -3 setelah inokulasi. Alat potong steril digunakan untuk memotong tangkai daun.

### **Ekstraksi RNA**

Ekstraksi RNA dilakukan menggunakan kit ekstraksi RNA (Favorgen, FavorPrep™ Plant Total RNA Mini Kit), sesuai petunjuk manual. Sekitar 100 mg bubuk daun tembakau dimasukkan dalam *microtube* 1,5 mL untuk diekstraksi RNA totalnya. Tahap pertama dalam

ekstraksi RNA adalah lisis, dilakukan dengan menambahkan 500  $\mu\text{L}$  buffer FARB dan 5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -*mercaptoethanol* dalam *microtube* sampel, kemudian disuspensi perlahan, dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 5 menit. *Filter mini column* selanjutnya terlebih dahulu diletakkan di atas *microtube* (*collection tube*). Sampel dituangkan ke *Filter mini column* dingin (dalam *ice bath*), lalu disentrifugasi dengan kecepatan penuh ( $\sim 18.000 \times g$ ) selama 3 menit. Cairan yang berhasil melewati *filter mini column* tertampung dalam *collection tube* dan disebut sebagai supernatant hasil tahap lisis.

Tahap kedua adalah pengikatan RNA dalam FARB *mini column*. FARB *mini column* yang akan mengikat RNA ditempatkan di atas *collection tube* baru. Supernatan hasil lisis sampel yang masih berada di *collection tube* lama ditambahkan etanol p.a. 70% sebanyak 1:1 volumenya, yakni 505  $\mu\text{L}$ , dihomogenkan, kemudian dituang ke FARB *mini column*, dan disentrifugasi ( $\sim 18.000 \times g$ ) selama 1 menit. Pada tahap ini, FARB *mini column* dipertahankan, sedangkan supernatan di *collection tube* baru dibuang dalam larutan lisol 10%.

Tahap ketiga adalah pencucian kolom, dilakukan dengan menambahkan sebanyak 500  $\mu\text{L}$  larutan buffer *washing 1* ke dalam FARB *mini column*, kemudian sentrifugasi ( $\sim 18.000 \times g$ ) selama 1 menit. Supernatan hasil pencucian pertama dibuang ke larutan lisol 10%, dan FARB *mini column* ditempatkan kembali di atas *collection tube*. Selanjutnya dilakukan pencucian kedua, 750  $\mu\text{L}$  larutan buffer *washing 2* dimasukkan ke dalam FARB *mini column*, disentrifugasi ( $\sim 18.000 \times g$ ), dan supernatan hasil pencucian kedua kembali dibuang. Tahap pencucian dengan buffer *washing 2* ini dilakukan berturut-turut sebanyak total 2 kali dengan cara yang sama. Setelah tahap pencucian kolom ketiga selesai, FARB *mini column* dikeringkan dengan cara disentrifugasi ( $\sim 18.000 \times g$ ), selama 3 menit untuk menghindari adanya cairan residual yang dapat mengganggu reaksi enzimatik pada tahap berikutnya.

Tahap keempat sekaligus terakhir adalah elusi RNA dari kolom FARB. FARB *mini column* diletakkan di atas *microtube* baru yang akan menampung RNA. Masing-masing *microtube* telah dilabel sesuai identitas sampel dan tanggal pembuatan RNA. Sebanyak 40  $\mu\text{L}$  RNA-se *free* ddH<sub>2</sub>O ditambahkan ke tengah masing-masing membran kolom FARB, kemudian disentrifugasi ( $\sim 18.000 \times g$ ), selama 1 menit. RNA yang telah dielusi kemudian segera diproses menjadi cDNA.

## **Pembuatan cDNA**

Pembuatan rantai *complementary* DNA (cDNA) dari RNA tembakau yang telah diekstraksi pada tahap sebelumnya dilakukan menggunakan metode *reverse transcription*.



Pada penelitian ini digunakan SMOBIO *Reverse Transcription Kit* RP1400 sesuai petunjuk manual. Larutan A dibuat menggunakan masing-masing sampel RNA, sedangkan larutan B dibuat bersama namun dihitung terlebih dahulu kebutuhan untuk semua sampel. Kebutuhan bahan pembuatan larutan B untuk setiap reaksi atau satu sampel RNA adalah 4  $\mu\text{L}$  5X RT Buffer (DTT/dNTPs), 5  $\mu\text{L}$  *DEPC-treated*  $\text{H}_2\text{O}$ , dan 1  $\mu\text{L}$  RTase/RI Enzyme Mix. Larutan A dibuat dengan mencampurkan 9  $\mu\text{L}$  larutan RNA daun tembakau dengan 1  $\mu\text{L}$  *Oligo (dT)/Random Primer Mix* hingga homogen. Tahap pertama yang dilakukan adalah denaturasi, dilakukan dengan menginkubasi tabung berisi larutan A selama 5 menit pada suhu  $70^\circ\text{C}$  menggunakan *thermal cycler*, kemudian memindahkan tabung ke dalam *ice bath* (inkubasi dingin) selama minimal 1 menit.

Tahap kedua adalah sintesis rantai pertama cDNA, dilakukan dengan menggabungkan larutan A, berisi RNA dan primer yang telah terdenaturasi, dan larutan B yang merupakan buffer untuk sintesis cDNA. Setelah inkubasi dingin, sebanyak 10  $\mu\text{L}$  larutan B dimasukkan dalam setiap tabung larutan A, dan dihomogenkan. Tabung berisi campuran kedua larutan kemudian diinkubasi kembali di dalam mesin *thermal cycler* yang telah diatur suhu beserta durasinya, yaitu berturut-turut  $25^\circ\text{C}$  selama 10 menit, dilanjutkan  $50^\circ\text{C}$  selama 50 menit, dan diakhiri tahap terminasi pada suhu  $85^\circ\text{C}$  selama 5 menit. Larutan cDNA tembakau disimpan dalam *freezer*  $-20^\circ\text{C}$  hingga saat akan digunakan.

### **Desain Primer Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Pasangan primer dalam penelitian ini telah digunakan dalam penelitian sebelumnya, yaitu pada analisis transkriptomik tembakau merespon serangan *P. nicotianae* menggunakan metode *real time* PCR oleh Bao *et al.* (2019), Meng *et al.* (2021), dan Li *et al.* (2021). Lokasi penempelan primer ditelusuri melalui *software* SnapGene (<https://www.snapgene.com/>). Perkiraan ukuran amplicon hasil PCR masing-masing gen ditelusuri melalui *webserver* NCBI Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Untuk infeksi dengan *Ralstonia solanacearum*, sampel cDNA dipolimerisasi menggunakan primer-primer spesifik yang menarget gen CYP450, ERF15, dan WRKY11 dengan bantuan instrumen T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Amerika) dan Thermal Cycler, 96 well (BT LabSystems, Amerika). Reaksi berlangsung dalam campuran sebanyak 10  $\mu\text{L}$  yang terdiri dari reagen PowerPol 2X PCR Mix (5  $\mu\text{L}$ ), cDNA (1  $\mu\text{L}$ ), primer forward PCR (1  $\mu\text{L}$ ), primer reverse PCR (1  $\mu\text{L}$ ), dan dd H<sub>2</sub>O (2  $\mu\text{L}$ ). Prosedur reaksi disesuaikan dengan rekomendasi pabrikan yang dimodifikasi oleh peneliti pada bagian durasi waktu ekstensi (dari 5 menit menjadi 1 menit). Gen L25 digunakan sebagai referensi internal sebab memiliki kestabilan tinggi dan fungsi

housekeeping yang unik bagi tembakau sehingga tepat untuk normalisasi (Schmidt dan Delaney, 2010). Proses ini berlangsung dengan triplikasi.

Masing-masing primer di atas diprediksi memiliki perbedaan  $T_m < 3^\circ\text{C}$  antar pasangannya. Pasangan primer juga dianalisis menggunakan *webservice* OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Analisis ini bertujuan memprediksi struktur sekunder dan dimer yang mungkin terbentuk. Pasangan primer yang terpilih dalam penelitian ini memiliki nilai  $\Delta G$  pada struktur sekunder dan dimer lebih besar dari -10 Kcal/mol.

### **Optimasi Suhu *Annealing* Primer dan Siklus PCR**

Suhu *annealing* primer yang disarankan oleh protokol *master mix* berkisar antara 55-65°C (ABclonal), dan 55-68°C (SMOBIO), sehingga diperlukan tahap optimasi suhu *annealing* untuk masing-masing primer. Optimasi suhu *annealing* masing-masing pasangan primer dilakukan dengan membuat campuran reaksi terlebih dahulu. Campuran tersebut terdiri atas 20  $\mu\text{L}$  *master mix* SMOBIO ExcelTaq™ 5x PCR Master Dye Mix, 5  $\mu\text{L}$  primer *forward* (10  $\mu\text{M}$ ), 5  $\mu\text{L}$  primer *reverse* (10  $\mu\text{M}$ ), 3  $\mu\text{L}$  *template* cDNA yang belum diencerkan, dan 60  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O steril. Campuran reaksi yang dibuat dalam 1 *microtube* 1,5 mL tersebut dihomogenkan, kemudian dibagi ke 6-10 tabung PCR berbeda untuk diamplifikasi dengan variasi suhu *annealing*. Tabung PCR kemudian dimasukkan ke dalam mesin PCR yang telah diatur siklus, juga suhu dan durasi untuk setiap tahapannya.

Amplikon PCR dianalisis melalui metode elektroforesis di gel agarosa 1,5%. *Annealing* primer pada optimasi siklus dan analisis ekspresi gen dilakukan pada suhu optimal primer. Pemilihan suhu optimal ditentukan dari hasil visualisasi pita pasca elektroforesis, yaitu menunjukkan pita tunggal, ukuran pita sesuai target, intensitas terang lebih tinggi, juga tidak menghasilkan dimer. Penentuan intensitas terang lebih tinggi dilakukan dengan bantuan *software* ImageJ. Optimasi siklus PCR masing-masing gen dilakukan sebagai upaya adaptasi studi perbedaan level ekspresi gen menggunakan metode *semi-quantitative* PCR. Campuran reaksi yang dibuat sama dengan campuran untuk optimasi suhu *annealing* primer, namun untuk optimasi siklus ini digunakan dua sampel, yaitu sampel cDNA varietas Beinhart dan Hick Broadleaf, masing-masing dari *sampling* ketiga pasca inokulasi. Tembakau varietas Beinhart dikenal sebagai varietas tahan terhadap penyakit lanas, sedangkan Hick Broadleaf rentan. Siklus PCR yang dipilih merupakan siklus dimana pita amplikon yang dihasilkan terlihat tunggal, ukurannya sesuai, intensitas terang jelas, dan terlihat perbedaan ekspresi relatif gen oleh varietas rentan dan tahan.

## Analisis Ekspresi Gen

Analisis ekspresi masing-masing gen menggunakan metode PCR yang dilanjutkan elektroforesis. Pada penelitian ini digunakan *master mix* SMOBIO ExcelTaq™ 5x PCR Master Dye Mix dan Abclonal PowerPol 2x PCR Mix RK20719 sesuai petunjuk manual. Komposisi campuran yang digunakan yaitu 1 µL *template* cDNA yang telah diencerkan sebanyak 2x, 0,5 µL primer *forward* (10 µM), 0,5 µL primer *reverse* (10 µM), 2 µL *master mix* SMOBIO ExcelTaq™ 5x PCR Master Dye Mix atau 5 µL *master mix* Abclonal PowerPol 2x PCR Mix RK20719, dan ddH<sub>2</sub>O steril hingga mencapai volume campuran sebesar 10 µL. Tabung berisi campuran reaksi yang telah homogen dimasukkan ke dalam mesin PCR sesuai pengaturan siklus dan suhu teroptimasi. Pada tahap analisis ekspresi gen ini digunakan suhu *annealing* masing-masing primer yang telah teroptimasi.

Setelah PCR selesai, dilakukan elektroforesis untuk semua sampel. Sampel, kontrol negatif, juga DNA *ladder* dimasukkan ke masing-masing sumur gel agarosa 2%, dan arus listrik dari set alat elektroforesis dijalankan. Buffer Tris-borat-EDTA (TBE) 0,5x digunakan sebagai pelarut gel agarosa, juga *running buffer*. Tegangan listrik yang digunakan adalah 100 V. Pita amplikon gen divisualisasi dengan meletakkan gel hasil elektroforesis di bawah sinar UV dari set alat *gel documentation (geldoc)*. Foto hasil tangkapan kamera yang juga terintegrasi dengan set alat *geldoc* disimpan untuk dianalisis intensitasnya secara lebih lanjut. Analisis ekspresi gen untuk masing-masing sampel direplikasi sebanyak tiga kali.

## Perhitungan Ekspresi Relatif Gen

Hasil analisis ekspresi gen menggunakan metode PCR dan elektroforesis menghasilkan data berupa foto pita amplikon berwarna hitam putih dari gel yang diamati di bawah sinar UV. Perhitungan ekspresi relatif gen diawali dengan menganalisis ketebalan atau intensitas pita amplikon menggunakan *software* ImageJ yang telah dikalibrasi, sehingga akan menghasilkan data berupa area puncak. Ketebalan pita amplikon gen uji yaitu *PR1*, *PR4*, *PUB24*, dan *PLP2* dibandingkan dengan gen *housekeeping* yaitu *L25* untuk mendapatkan nilai ekspresi relatif gen uji, sesuai rumus di bawah ini.

$$\text{Ekspresi relatif gen uji} = \frac{\text{Area puncak pita gen uji}}{\text{Area puncak pita gen housekeeping}}$$

## Analisis Sekuens 16S rRNA Hasil Sekuensing

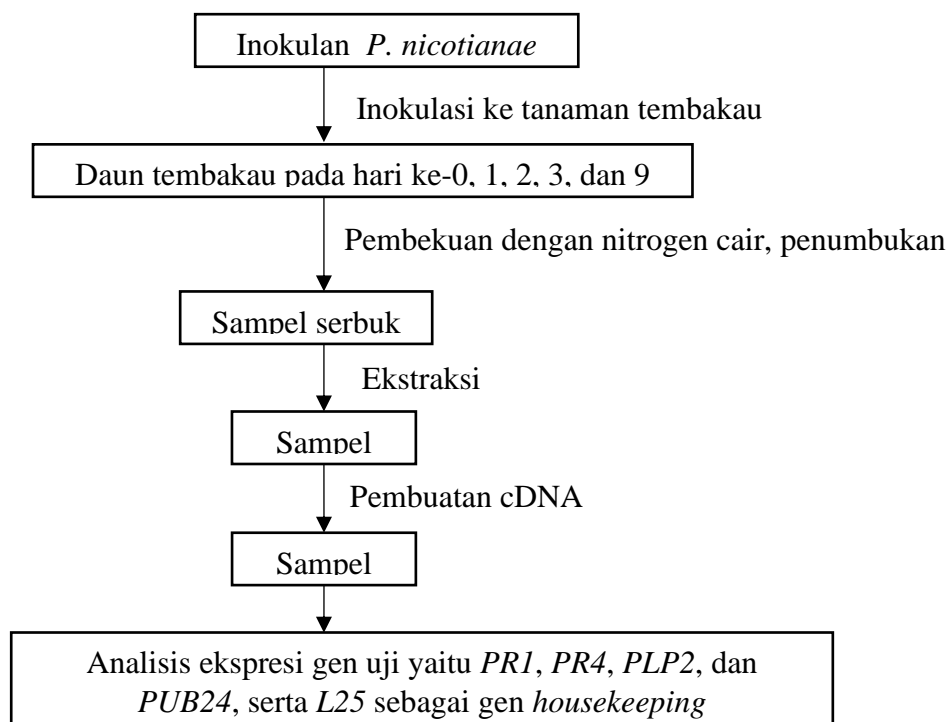
Koreksi sekuens hasil sekuensing dilakukan dengan bantuan *software* SeqMan Pro DNASar. Hasil sekuensing dari kedua primer yaitu primer ITS4 dan ITS5 dimasukkan, lalu

digabungkan melalui menu *Assemble*, dan diamati hasil gabungan (*contig*) yang berhasil diperoleh. Perbaiki nukleotida yang ada di *contig* tersebut diawali dengan membaca keseluruhan sekuens nukleotida hasil sekuensing, dan dilakukan apabila ditemukan ketidaksesuaian antara terbacanya sinyal nukleotida dengan penerjemahan sinyal nukleotida (Theda, 2020).

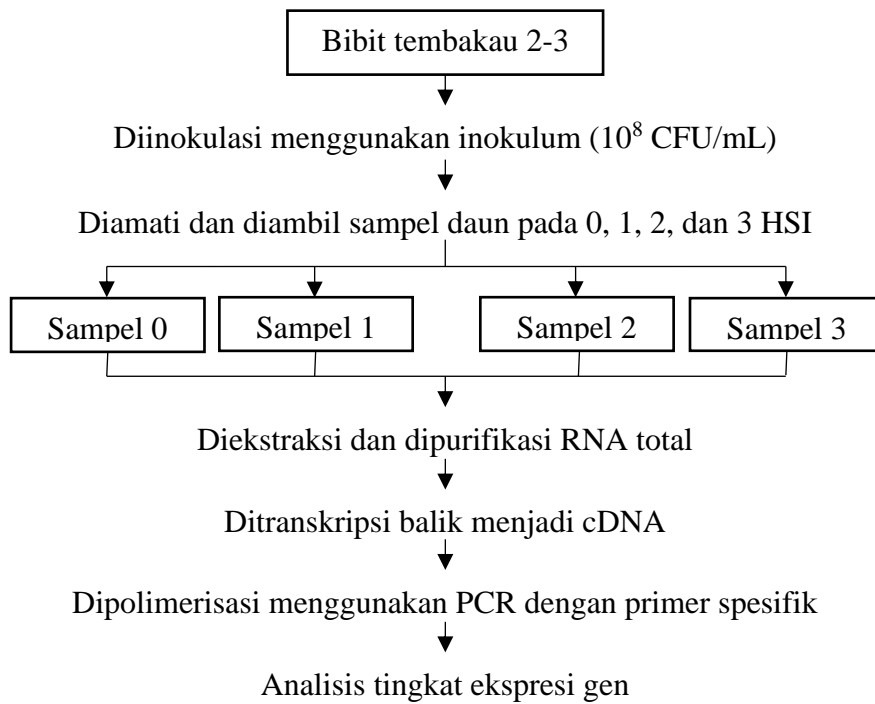
Identifikasi sekuens *contig* dilakukan menggunakan *webserver BLAST Nucleotide (BLASTn)* NCBI yang dapat diakses melalui link, [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_SPEC=GeoBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch). Sekuens nukleotida hasil koreksi kemudian dimasukkan pada bagian kotak putih tempat memasukkan sekuens untuk diuji, kemudian klik pilihan “BLAST” yang ada di bagian bawah laman. Hasil analisis ini akan menunjukkan organisme dengan sekuens nukleotida yang mirip dengan sekuens yang dimasukkan (Chaudhary *et al.*, 2018). Pohon filogenetik yang menunjukkan hubungan antara hasil sekuensing *region ITS* kultur isolat dengan *region ITS Lasiodiplodia pseudotheobromae* dan *Phytophthora nicotianae* dibuat menggunakan *software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 11*. Langkah pertama adalah memasukkan sekuens berupa *FASTA file*, lalu dilakukan *alignment*, dan memilih untuk membuat pohon filogenetik jenis *Neighbor-Joining*. Jenis metode statistik yang diaplikasikan adalah Metode Bootstrap, dengan replikasi sebanyak 1000 kali (Newman *et al.*, 2016).

### Skema Pelaksanaan Penelitian

Percobaan dengan *Phytophthora nicotianae*



Percobaan dengan *Ralstonia solanacearum*



#### IV. Hasil dan Pembahasan Percobaan dengan *Phytophthora nicotianae* Infeksi Penyakit Lanas pada Tembakau

Bagian akar dari tembakau kelompok perlakuan, baik varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, maupun Dark 314 diinokulasi dengan tanah yang berasal dari daerah sekitar perakaran tembakau sakit lanas di lahan PT Sadhana. Kejadian penyakit diamati sejak hari inokulasi (0 hsi), hingga 50 hari berikutnya (50 hsi). Gejala penyakit pertama yang diamati adalah kelayuan mendadak pada 3 dari 6 tanaman tembakau varietas Hick Broadleaf di 3 hsi, sedangkan 3 varietas lain belum menampakkan gejala penyakit lanas. Kondisi sakit ini selanjutnya membawa tembakau pada keadaan sekarat di 9 hsi (Gambar 4.1A), dan berujung kematian pada 20 hsi. Gejala penyakit lanas muncul di seluruh varietas Hick Broadleaf pada 9 hsi, dan kematian seluruhnya terjadi pada 30 hsi.



**Gambar 5.** Penampakan gejala penyakit lanas; Tembakau varietas Hick Broadleaf sekarat, mengalami gejala penyakit lanas yaitu klorosis, busuk batang, dan kelayuan pada 9 hsi(A); Sekat nekrotik dan hifa di pangkal batang tembakau yang dibelah membujur (panah merah), gejala busuk akar dan mahkota akar pada tembakau terinfeksi (panah biru) (B).

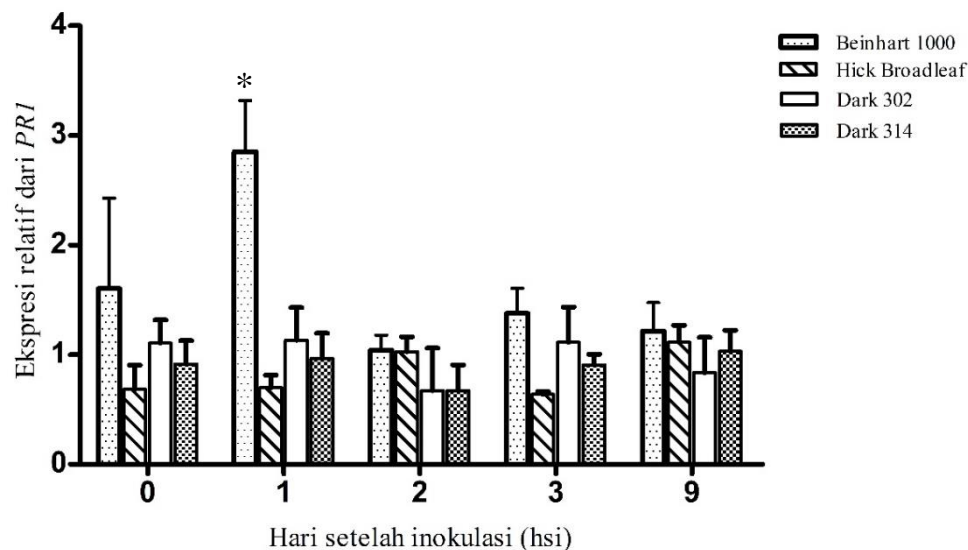
Pada 20 hsi, gejala kelayuan dan busuk pangkal batang diamati terjadi pada seluruh tembakau varietas Dark 302, juga 3 dari 6 varietas Dark 314. Kematian pertama dari tembakau varietas Dark 302 terjadi di 25 hsi, dan seluruhnya pada 40 hsi. Pada 30 hsi, gejala penyakit lanas teramati pada seluruh tembakau varietas Dark 314, serta kematian seluruhnya terjadi pada 50 hsi. Batang bagian bawah tembakau varietas Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314 dibelah untuk mengamati terbentuknya sekat-sekat gejala penyakit lanas (Gambar 4.1B). Kontrasnya, hingga pengamatan di 50 hsi, tembakau varietas Beinhart nampak sehat dan tidak bergejala penyakit, menunjukkan ketahanannya terhadap penyakit lanas. Rangkuman hasil pengamatan kenampakan gejala penyakit pada tembakau uji dapat diamati di Tabel 4.1,

sedangkan foto tembakau varietas Beinhart 1000, Dark 302, dan Dark 314 pada 3 hsi terlampir di Lampiran 14.

**Tabel 1.** Hasil pengamatan kenampakan gejala penyakit lanas pada tembakau

Waktu pengamatan (hsi)	Kenampakan gejala penyakit (%)			
	Beinhart 1000	Hick Broadleaf	Dark 302	Dark 314
0	0	0	0	0
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	50	0	0
9	0	100	0	0
20	0	100	100	50
30	0	100	100	100
50	0	100	100	100

### Analisis Ekspresi Gen PR1

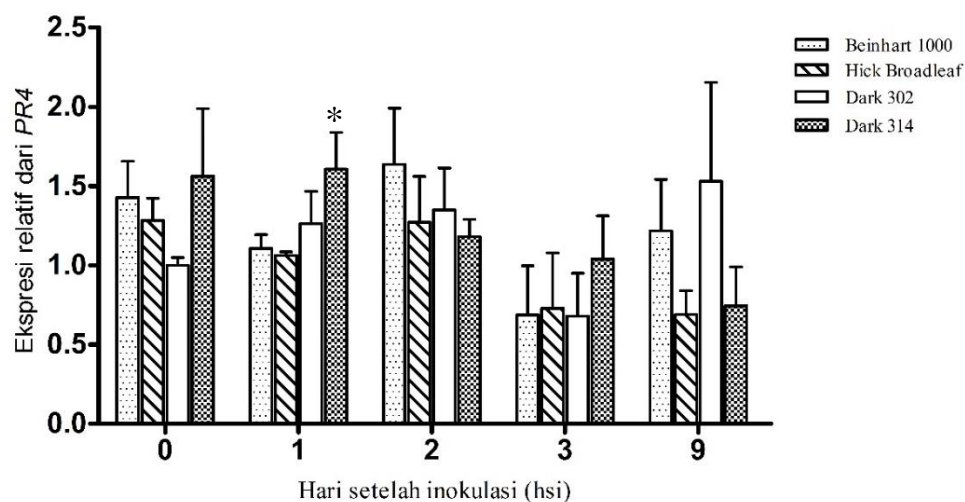


**Gambar 6.** Grafik ekspresi relatif gen PR1 pada tembakau varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, Dark 314. RNA diisolasi pada 0 hari setelah inokulasi (hsi), 1 hsi, 2 hsi, 3 hsi, dan 9 hsi. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari hasil replikasi 3 kali pada penelitian yang dilakukan. Level ekspresi dinormalisasi terhadap *housekeeping gene (L25)* dan ekspresi relatif dari kelompok kontrol. Keterangan: \*  $P < 0.05$ , berbeda signifikan dengan kontrol.

Perbandingan relatif ekspresi gen PR1 secara temporal dapat diamati pada gambar 4.2. Pada tembakau varietas Beinhart, terjadi peningkatan ekspresi secara signifikan pada 1 hsi yakni mencapai 285% lebih tinggi dari kontrol, dimana fenomena ini tidak diamati pada 3 varietas lain. Pada 2 hsi terjadi penurunan ekspresi pada Beinhart 1000, namun ekspresinya meningkat kembali pada 3 hsi dan 9 hsi. Ekspresi *PR1* di 3 hsi dan 9 hsi pada Beinhart tetap

lebih tinggi dibandingkan 3 varietas lain, walaupun tidak signifikan terhadap kontrol. Menariknya, pada 3 hsi, yaitu hari munculnya gejala kelayuan pertama kali pada varietas rentan, yaitu Hick Broadleaf, teramati ekspresi *PR1* sedikit, bahkan terendah diantara 3 varietas lain, yaitu 64% dari kontrol. Peningkatan secara signifikan *PR1* pada 1 hsi merupakan respon ketahanan Beinhart 1000 terhadap infeksi penyakit lanas, dimana diketahui bahwa *PR1* merupakan *downstream marker* dari respon pertahanan yang dikontrol oleh jalur persinyalan asam salisilat (Attard *et al.*, 2010).

#### Analisis Ekspresi Gen *PR4*



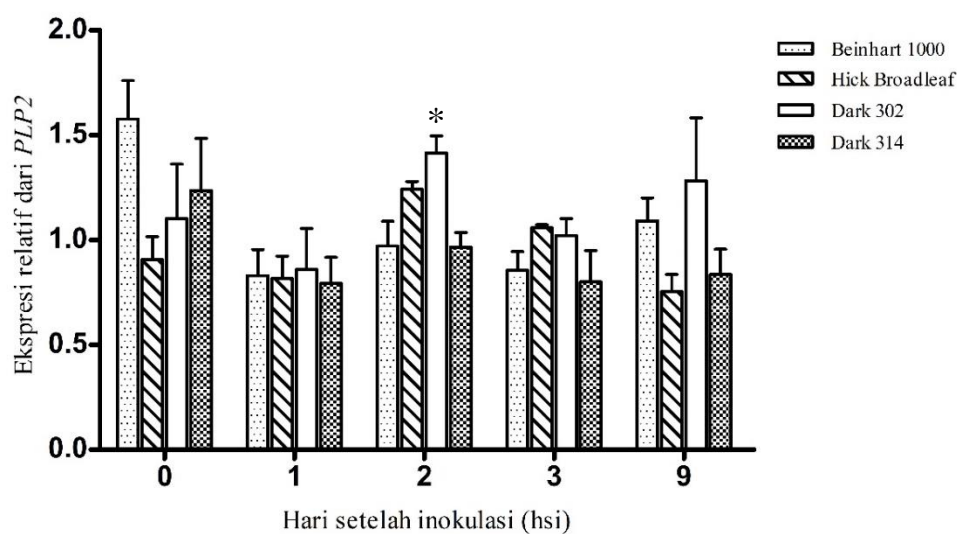
**Gambar 7.** Grafik ekspresi relatif gen *PR4* pada tembakau varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, Dark 314. RNA diisolasi pada 0 hsi, 1 hsi, 2 hsi, 3 hsi, dan 9 hsi. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari hasil replikasi 3 kali pada penelitian yang dilakukan. Level ekspresi dinormalisasi terhadap *housekeeping gene* (*L25*) dan ekspresi relatif dari kelompok kontrol. Keterangan: \*  $P < 0.05$ , berbeda signifikan dengan kelompok kontrol.

Perbandingan relatif ekspresi gen *PR4* secara temporal dapat diamati pada gambar 4.3. Peningkatan ekspresi secara signifikan terhadap kelompok kontrol terjadi pada tembakau varietas Dark 314 pada 1 hsi, yaitu meningkat sebesar 161% dibandingkan kontrol. Menariknya, varietas Beinhart 1000 menunjukkan pola ekspresi yang berbeda, yaitu meningkat pada 2 hsi, meskipun tidak signifikan terhadap kontrolnya. Pada praktik di lapangan, varietas Dark 314 merupakan varietas yang medium tahan, sehingga data peningkatan signifikan *PR4* ini menunjukkan adanya strategi pertahanan yang berbeda antara Beinhart dan Dark 314. Peningkatan *PR4* berkaitan dengan peran *PR4* sebagai *downstream marker* dari respon pertahanan yang dimediasi oleh jalur persinyalan asam jasmonat dan etilen (Attard *et al.*, 2010), sedangkan *PR1* yang meningkat drastis pada varietas Beinhart



1000 merupakan *downstream marker* dari jalur asam salisilat; kedua jalur ini diketahui memiliki efek antagonis. Secara umum, tanaman akan mengaktifkan jalur pertahanan asam salisilat bila menghadapi patogen biotropik, dan asam jasmonat/etilen saat memerangi patogen nekrotropik (Glazebrook, 2005); menariknya, *Phytophthora nicotianae* merupakan organisme hemibiotropik. Pada varietas rentan yaitu Hick Broadleaf, dan medium rentan (berdasarkan praktik lapangan) yaitu Dark 302 tidak terjadi peningkatan signifikan *PR1* dan *PR4* (Gambar 4.2 dan Gambar 4.3).

### Analisis Ekspresi Gen PLP2

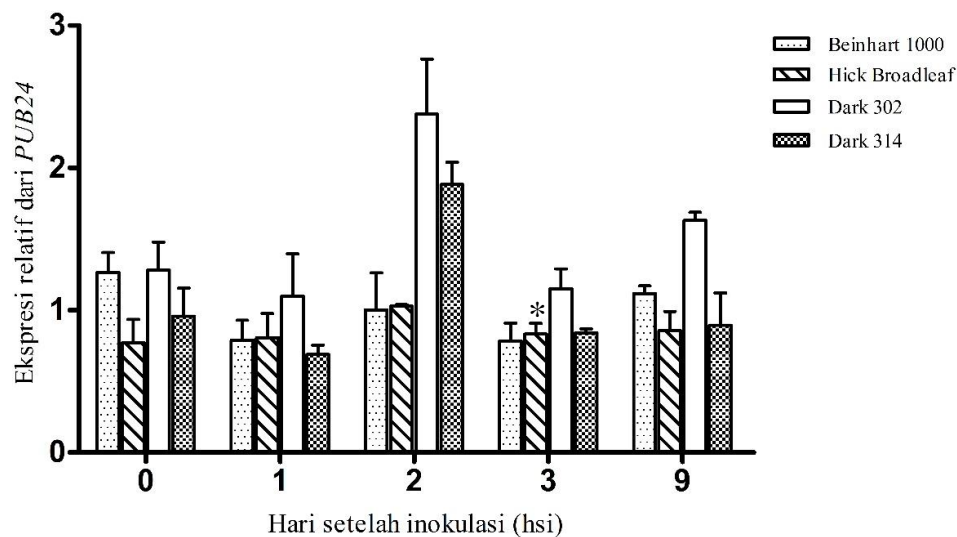


**Gambar 8.** Grafik ekspresi relatif gen PLP2 pada tembakau varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, Dark 314. RNA diisolasi pada 0 hsi, 1 hsi, 2 hsi, 3 hsi, dan 9 hsi. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari hasil replikasi 3 kali pada penelitian yang dilakukan. Level ekspresi dinormalisasi terhadap *housekeeping gene* (*L25*) dan ekspresi relatif dari kelompok kontrol. Keterangan: \*  $P < 0.05$ , berbeda signifikan dengan kontrol. Perbandingan relatif ekspresi gen PLP2 secara temporal dapat diamati pada gambar 4.4. Peningkatan ekspresi secara signifikan terhadap kelompok kontrol terjadi pada tembakau varietas Dark 302 pada 2 hsi, yakni sebesar 124% lebih tinggi dari kontrolnya. Menariknya, varietas rentan yaitu Hick Broadleaf, dan medium rentan yaitu Dark 302 seirama dalam mengekspresikan gen terkait kerentanan yaitu *PLP2* secara lebih tinggi dibandingkan varietas Beinhart dan Dark 314 pada 2 hsi.

### Analisis Ekspresi Gen PUB24

Perbandingan relatif ekspresi gen PUB24 secara temporal dapat diamati pada gambar 4.5. Peningkatan ekspresi secara signifikan terhadap kelompok kontrol terjadi pada tembakau varietas Hick Broadleaf pada 3 hsi, yakni sebesar 83% lebih besar dari kontrol. Penampakan

morfologis gejala penyakit lanas yang teramati selaras dengan peningkatan ekspresi gen terkait kerentanan ini adalah kelayuan mendadak pada 3 dari 6 tanaman tembakau uji varietas Hicks Broadleaf. Meskipun tidak signifikan terhadap kontrol, namun peningkatan ekspresi *PUB24* oleh tembakau varietas Dark 302 telah teramati mulai 1 hsi, dilanjutkan meningkat drastis pada 2 hsi, mencapai 238% lebih tinggi dibanding kontrol, dan masih terekspresi tinggi hingga 9 hsi.



**Gambar 9.** Grafik ekspresi relatif gen *PUB24* pada tembakau varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, Dark 314. RNA diisolasi pada 0 hsi, 1 hsi, 2 hsi, 3 hsi, dan 9 hsi. *Error bars* menunjukkan standar deviasi dari hasil replikasi 3 kali pada penelitian yang dilakukan. Level ekspresi dinormalisasi terhadap *housekeeping gene (L25)* dan ekspresi relatif dari kelompok kontrol. Keterangan: \*  $P < 0.05$ , berbeda signifikan dengan kelompok kontrol.

### Hasil Sekuensing Kultur Isolat dari Lahan PT Sadhana

Primer dalam sekuensing ini merupakan primer umum yang didesain untuk mengamplifikasi sub-unit kecil 18S, seluruh area ITS4 dan ITS5, bagian 5,8S, dan beberapa bagian dari sub-unit besar 28S rDNA pada spesies fungi (White *et al.*, 1990). Sekuensing yang dilakukan telah menghasilkan urutan nukleotida sampel. Analisis hasil sekuensing yang dilakukan oleh MacroGen menunjukkan adanya kemiripan sekuens antara kultur isolat dengan *Lasiodiplodia pseudotheobromae* yaitu memiliki identitas kemiripan sekuens sebesar 99%, *e-value* 0.0, dan *coverage* 96% (Gambar 4.6). Koreksi sekuens hasil sekuensing telah dilakukan dengan bantuan aplikasi SeqMan Pro DNASTar. Urutan nukleotida *contig* terdapat di Lampiran 3, dan gambar hasil BLASTn dapat diamati di Tabel 4.2. Hasil ini menunjukkan bahwa melalui identifikasi molekuler atau sekuensing, kultur isolat kandidat bukanlah *Phytophthora nicotianae*, melainkan *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.

## ITS region service report

Order Number : HC00469078  
 Sample name : P\_N\_Sadhana\_10\_4\_22\_contig\_1

### Information

#### Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
ITS5	5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'	ITS5	5' (TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) 3'
ITS4	5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'	ITS4	5' (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
KX244815.1	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	571	8	557	96	1011	0.0	549/550	99

Kingdom	Family	Genus	Species
Eukaryota	Botryosphaeriaceae	<i>Lasiodiplodia</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>

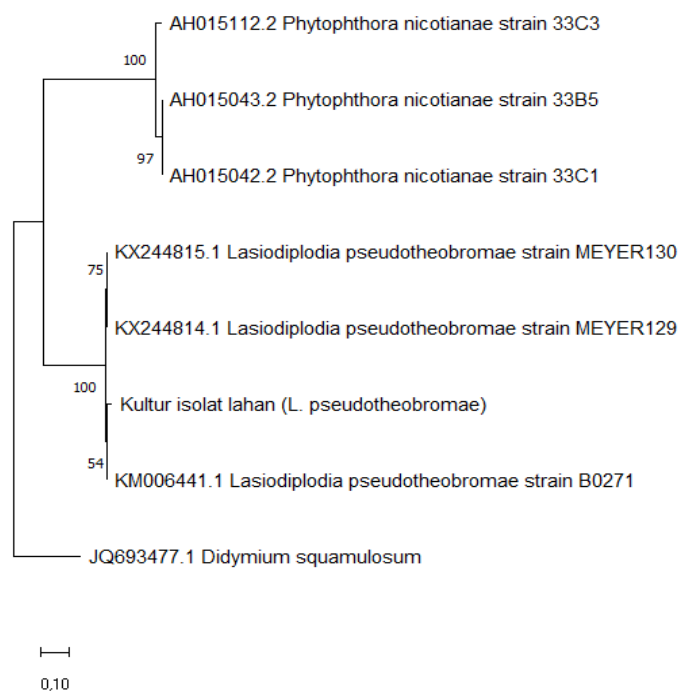


**Gambar 10.** Hasil sekuensing isolat dari batang tembakau sakit di PT Sadhana Sejahta ini belum ada laporan mengenai infeksi antara *L. pseudotheobromae* pada tembakau. Diduga agen patogen dominan dalam campuran tanah dan *infested oat* sehingga mampu menyerang tembakau uji adalah spora *P. nicotianae*, sedangkan *L. pseudotheobromae* yang telah dikenal sebagai organisme endofit, yaitu mampu tumbuh dalam jaringan tanaman tanpa menimbulkan gejala penyakit (Stone *et al.*, 2000) ini terisolasi saat mengambil sampel dari batang tembakau sakit.

**Tabel 2.** Hasil analisis sekuens *contig* melalui BLASTn

<i>Subject</i>				<i>Score</i>	<i>Percent</i>
<i>Accession</i>	<i>Description</i>	<i>Length</i>	<i>Coverage</i>	<i>E-value</i>	<i>Identity</i>
KX244814.1	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	571	97%	0.0	98.56%
KM006441.1	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	544	95%	0.0	98.91%
OM322824.1	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	567	96%	0.0	98.56%

Pohon filogenetik yang membandingkan kekerabatan antara kultur isolat lahan dengan organisme hasil sekuensing yakni *L. pseudotheobromae* dan organisme target yakni *P. nicotianae* dapat diamati pada Gambar 4.7. Hasil perhitungan jarak genetik yang menunjukkan skor hubungan kekerabatan antar spesies terdapat pada Tabel 4.3. Hasil penelusuran melalui pohon filogenetik sekuens *region* ITS ini menunjukkan bahwa kultur isolat lahan memiliki hubungan kekerabatan yang lebih dekat pada *L. pseudotheobromae* dibandingkan *P. nicotianae* sebab tampak berada di cabang yang sama dengan *L. pseudotheobromae*. Analisis jarak genetik menunjukkan rata-rata skor kekerabatan antara kultur isolat lahan dengan *P. nicotianae* adalah 0.6533 sedangkan dengan *L. pseudotheobromae* 0.0194. Angka skor yang lebih kecil tersebut berarti kekerabatan antara kultur isolat dengan *L. pseudotheobromae* lebih dekat, yaitu perbedaan urutan sekuensnya lebih sedikit, dalam hal ini setidaknya terdapat 2 basa berbeda di tiap 100 basa yang dianalisis.



**Gambar 11.** Pohon filogenetik kultur isolat lahan dibandingkan dengan *L. pseudotheobromae* dan *P. nicotianae*

Identifikasi spesies kultur isolat lahan PT Sadhana dilakukan dengan metode *internal transcribed spacer (ITS) region sequencing* yang mengamplifikasi bagian rDNA yaitu ITS 1-5,8 S-ITS 2 dari kultur isolat. Metode ini dipilih sebab bagian ITS merupakan bagian *non-coding* dari rDNA yang sangat bervariasi seiring dengan laju evolusi yang berbeda antar spesies, sehingga memungkinkan untuk melakukan identifikasi hingga tingkat spesies.

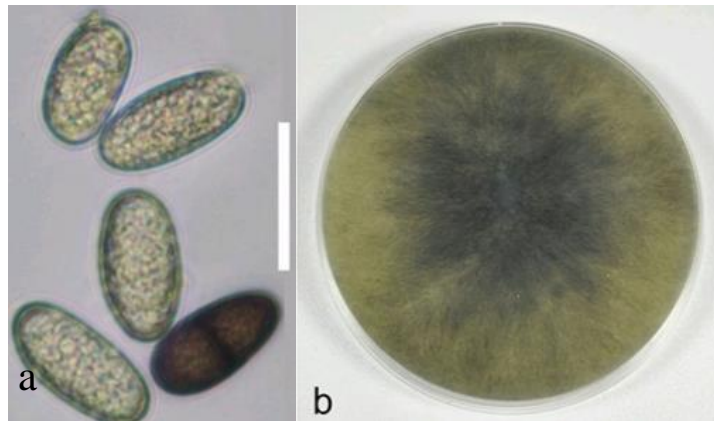
Sekuensing *region* ITS oleh MacroGen menggunakan metode sekuensing Sanger. Di metode sekuensing Sanger modern, telah digunakan sistem otomatis yaitu *capillary electrophoresis system* (CES) yang dilengkapi dengan *charged coupled device* (CCD) sehingga memungkinkan dilakukannya separasi fragmen DNA fluoresens dalam kapiler yang mendeteksi sinyal fluoresens.

Hasil sekuensing yang didukung dengan analisis pohon filogenetik menunjukkan bahwa spesies dari kultur isolat adalah *Lasiodiplodia pseudotheobromae*. Namun melalui hasil pengamatan kejadian penyakit, gejala penyakit yang ditimbulkan di tembakau uji dalam penelitian ini tidak sesuai dengan gejala penyakit akibat serangan *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, yaitu *dieback* pada batang dan cabang, pecahan pada kulit kayu dan kebusukan berbentuk irisan pada pohon berkayu (Dong *et al.*, 2020) (Gambar 5), serta *gummosis* (Bautista-Cruz *et al.*, 2019). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* dapat menginfeksi tanaman subtropis dan tropis, beberapa di antaranya adalah *Mangifera indica* (Kwon *et al.*, 2017), *Celtis cinensis* (Liang *et al.*, 2019), dan *Tectona grandis* (Dong *et al.*, 2020).

Sporangia dari *P. nicotianae* berbentuk *ovoid*, papila, dan *hyaline*, sedangkan *L. pseudotheobromae* memiliki konidia berbentuk *sub-ovoid* hingga *ellipsoid* namun menjadi bersekat juga berwarna cokelat saat matang, juga berbentuk *hyaline*. Secara makroskopis, miselium kultur *L. pseudotheobromae* berbentuk seperti kapas, *sparse*, *hyaline*, bersekat, berwarna putih keabuan namun menjadi berwarna abu-abu gelap setelah inkubasi lebih dari satu minggu; 10 hari (Dissanayake *et al.*, 2015). Miselium *P. nicotianae hyaline*, tidak bersekat, dapat membentuk sporangiofor, dan berwarna putih (Shilpa *et al.*, 2017).



**Gambar 12.** Gejala infeksi *L. pseudotheobromae* pada pohon Jati (*Tectona grandis*); pecahan pada kulit kayu dan kebusukan pada pangkal batang pohon (A); perubahan warna menjadi kehitaman pada bagian dalam kulit kayu pohon Jati (B dan C); *dieback* pada ranting (D dan E); kultur *Lasiodiplodia pseudotheobromae* usia 7 hari pada media Malt Extract Agar (MEA) (F) (Dong *et al.* (2020)



**Gambar 13.** Kultur *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; Konidia *Lasiodiplodia pseudotheobromae* muda dan dewasa atau matang (A); kultur *L. pseudotheobromae* di media *Potato Dextrose Agar* (PDA) usia inkubasi 10 hari (Dissanayake *et al.*, 2015)

## V. Hasil dan Pembahasan Percobaan dengan *Ralstonia solanacearum*

### Verifikasi patogenitas inokulum melalui uji virulensi

*Bacterial streaming* dilakukan untuk secara cepat membedakan layu bakteri dari layu vaskular yang disebabkan oleh patogen jamur. Bagian pembuluh (xilem) yang terekspos dengan air melepaskan wujud untaian putih berwarna putih susu yang kasat mata. Untaian ini merupakan kandungan mikroba dan polisakarida eksternal yang larut dalam air.

**Tabel 3.** Hasil uji biovar *Ralstonia solanacearum*

Sumber karbon	Sumber inokulum		Biovar I	Biovar II	Biovar III	Biovar IV	Biovar V
	Balittas	Sadhana					
Dekstrosa	+	-	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	-	-	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	-	+	+	-
Laktosa	+	-	-	+	+	-	+
Maltosa	+	+	-	+	+	-	+

(Schaad *et al.*, 2001)

Keterangan: + = dapat menggunakan sumber karbon

- = tidak dapat menggunakan sumber karbon

Dari penanaman pada media selektif, kedua sumber inokulum dari Balittas dan PT. Sadhana memberikan kenampakan koloni tunggal berbentuk lingkaran dengan inti merah muda dan tepi yang kasar serta berwarna krem mengkilap yang basah (Lampiran 2). Ciri ini mengindikasikan koloni yang virulen dan baik untuk inokulasi (Juma, 2018). Pengamatan mikroskopis dan pewarnaan Gram memperlihatkan bentuk sel batang lurus berukuran kecil



dan Gram negatif (Lampiran 3). Kedua sumber inokulum kemudian diberi singkatan nama: *RsB* (dari Balittas) dan *RsS* (dari PT. Sadhana).

Konfirmasi biokimia menunjukkan bahwa kedua sumber inokulum memproduksi asam dari glukosa, namun hanya *RsB* yang mampu menghasilkan gas. Dalam laporan oleh Pawaskar *et al.* (2014), *R. solanacearum* memberikan hasil positif pada uji glukosa dan juga pada produksi gas sebagaimana merupakan bakteri aerobik. Dari uji sukrosa, *RsB* positif produksi asam dan gas yang menjadi indikasi penguat ciri *R. solanacearum*. Sementara itu, *RsS* tidak mampu menggunakan sukrosa.

Melalui uji tipe biokimia (biovar), *RsB* mampu menggunakan seluruh gula dan alkohol heksosa yang diujikan sebagai sumber karbon sementara *RsS* tidak memfermentasi dekstrosa, laktosa, dan sorbitol, serta negatif produksi gas pada senyawa uji lainnya (Tabel 3.). Berdasarkan hasil ini, *RsB* kemungkinan besar berasal dari biovar 3. Di sisi lain, *RsS* belum dapat dipastikan berkenaan dengan status biovar yang dimiliki. Berdasarkan hasil analisis kekerabatan dengan metode *neighbour-joining*, similaritas yang relatif tinggi terhadap 16S rRNA dari *R. solanacearum* tembakau (secara umum diklasifikasikan dalam ras 1) ditunjukkan oleh kedua isolat yaitu Balittas 1 dan Sadhana 1. Untuk lebih dalam mengetahui, analisis dilanjutkan dengan komparasi terhadap ras yang terkait inang tanaman lain yaitu ras 2 (*Musaceae*) dan ras 3 (kentang). Lampiran 6 menunjukkan kedekatan kedua isolat kepada perwakilan ras 2 dibandingkan ras lainnya. Patogenitas ras 2 sangat terbatas pada famili *Musaceae* dan belum pernah dilaporkan menginfeksi kultivar tembakau.

#### **Insiden penyakit pada tembakau terinokulasi**



**Gambar 14.** Tembakau Hick Broadleaf pasca inokulasi (7 hsi) menggunakan isolat Sadhana: kontrol (kiri) dan terinokulasi (kanan)

Beberapa uji coba infeksi telah dilakukan pada waktu yang berbeda menggunakan dua sumber inokulum yang telah diidentifikasi sebelumnya. Tembakau muda berumur 10 minggu

setelah sebar / 3 minggu setelah pemindahan menuju tanah digunakan sebab respon imun yang dimiliki matang dan berada pada kondisi fisiologis yang ideal. Inokulasi dengan isolat Sadhana tidak memberikan kemunculan gejala layu bakteri setelah 7 hari. Fisik tembakau masih berada pada bentuk segar, daun dan batang yang hijau, seperti pada Gambar 4.1. Sementara dengan inokulum dari Balittas, insiden penyakit belum muncul secara fenotip setelah 3 hari (Gambar 4.2.), bahkan bila inkubasi telah dilanjutkan hingga 7 hari. Kejadian ini dapat menggambarkan fenomena resistansi non-host yang mungkin melibatkan *Rs* ras 2 dan tembakau uji sebagai non-host. Namun demikian tidak teramati adanya ciri khas seperti respon hipersensitif/HR (nekrosis) terutama pada area inokulasi. Ini dapat dijelaskan dari kemungkinan bahwa konsentrasi patogen tidaklah cukup untuk menginduksi elisitasi gejala HR dan sebaliknya justru memicu kejadian “*priming*” yang memperkuat pencegahan HR (Carolina, 2016).



**Gambar 15.** Tembakau Hick Broadleaf, Beinhart-1000, Dark-314, dan Dark-302 (kiri-kanan) pasca inokulasi (3 hsi) menggunakan isolat Balittas

Proses pelukaan sebelum inokulasi telah didemonstrasikan oleh beberapa peneliti dan terbukti meningkatkan penetrasi patogen ke dalam jaringan tanaman (Li *et al.*, 2021). Tetapi dalam penelitian ini, opsi pelukaan bukan menjadi alternatif sebagaimana pelukaan itu sendiri secara khusus dilaporkan memicu produksi etilen yang memengaruhi ekspresi *ERF* (Nishiuchi *et al.*, 2002). Kejadian ini juga teramati pada penelitian lain terkait aktivasi gen keluarga *WRKY* dan *CYP450* melalui pelukaan (Wang *et al.*, 2014; Koo, Cooke and Howe, 2011). Maka pelukaan hanya akan menghasilkan bias pada ekspresi gen sehingga menjadi tidak representatif terhadap kondisi infeksi.

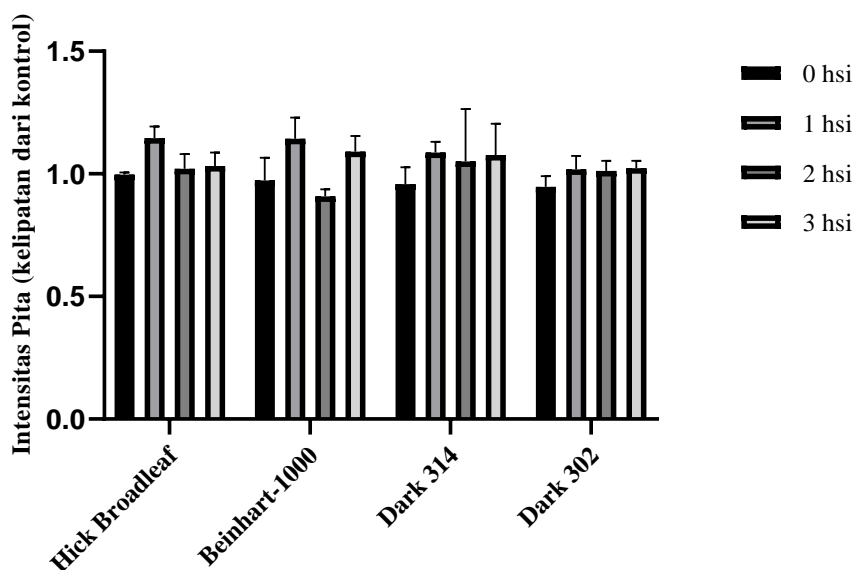
Koleksi sampel berupa daun lebih dipilih dibandingkan akar karena terdapat laporan yang mengatakan bahwa sampel akar memberikan keterulangan pola ekspresi yang rendah (Kiba *et al.*, 2007). Gen terkait serangan patogen sebagian besar akan terekspresi pada bagian akar dalam laju yang tidak stabil sehingga daun mungkin akan lebih alami dalam menggambarkan interaksi *Rs*-tembakau. Daun muda juga menjadi pilihan untuk memperoleh kualitas RNA



yang tinggi dan jumlah kontaminan yang minimal. Sebagaimana pada jaringan yang lebih tua, dinding sel menjadi lebih sulit untuk dihancurkan dan keberadaan potensial dari senyawa-senyawa metabolit sekunder dapat menghambat proses ekstraksi materi genetik dari sel sehingga menurunkan perolehan RNA.

### Ekspresi relatif dari gen-gen terkait ketahanan terhadap *R. solanacearum*

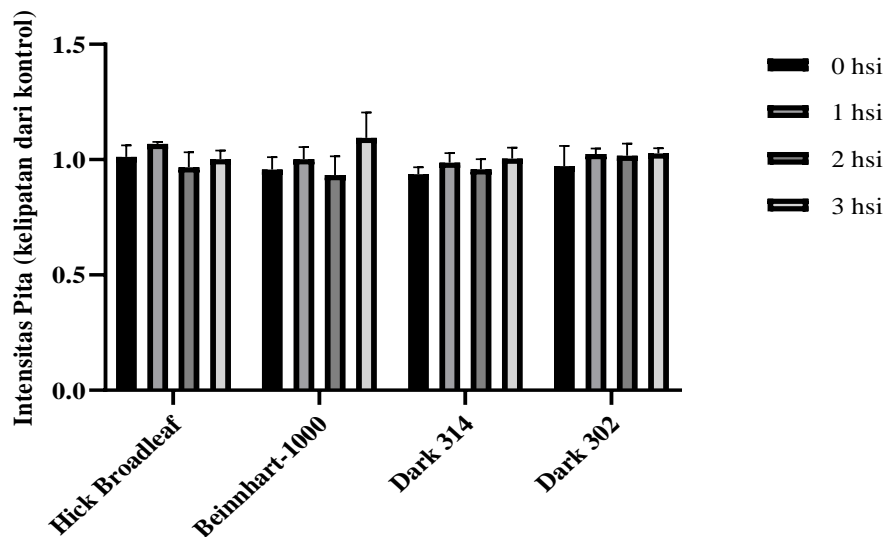
Berikut diagram ekspresi relatif gen *ERF15* dari varietas tembakau uji pada beberapa waktu inkubasi penyakit:



**Gambar 16.** Ekspresi relatif gen *ERF15*  
Keterangan: hsi = hari setelah inokulasi

*Ethylene response factors (ERF)* merupakan faktor transkripsi yang spesifik pada tanaman dan salah satu yang memiliki keluarga terbesar. Zhang *et al.* (2015) menemukan bahwa ekspresi berlebih *ERF15* yang dipicu oleh infeksi *P. syringae* pv. *tomato* and *Botrytis cinerea* secara signifikan meningkatkan resistensi pada *Arabidopsis*. Dalam penelitian ini, perubahan ekspresi gen *ERF15* tidak terjadi di antara periode waktu inkubasi penyakit pada setiap varietas tembakau uji. Gao *et al.* (2019) menyampaikan adanya respon transkripsi dini dari gen-gen terkait jalur flavonoid pada *N. tabacum* terinfeksi *Rs* setelah 3 jam inokulasi rendam. Laporan ini menunjukkan bahwa *ERF15* bisa menjadi salah satu lini depan dalam respon dini tembakau terhadap *Rs*. Fakta ini diperkuat oleh referensi lain dari Pan *et al.* (2021) dan Li *et al.* (2021) yang juga mengamati perbedaan ekspresi *ERF15* yang mencolok pada tembakau resisten *Rs* yang diuji.

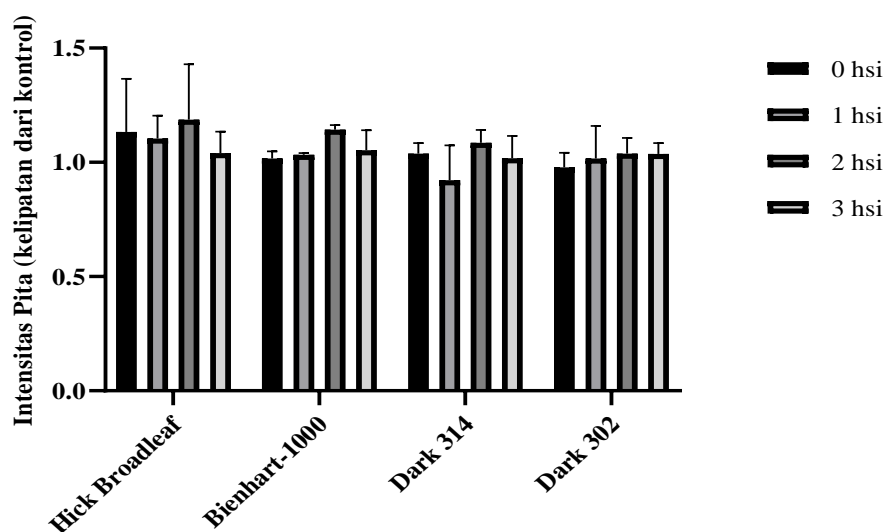
Berikut diagram ekspresi relatif gen *WRKY11* dari varietas tembakau uji pada beberapa waktu inkubasi penyakit:



**Gambar 17.** Ekspresi relatif gen *WRKY11*  
Keterangan: hsi = hari setelah inokulasi

*WRKY* adalah salah satu keluarga besar protein regulator dalam metabolisme tanaman terkait resistensi terhadap patogen. Wang *et al.* (2021) dalam studinya membuka pengetahuan bahwa *WRKY11* terlibat sebagai aktivator dalam regulasi positif gen-gen terkait flavonoid seperti MYB12, FLS, GT5, dan UFGT yang menyebabkan peningkatan pertahanan tembakau terhadap cekaman biotik. Gambar 4.3. tidak menunjukkan perubahan pada ekspresi gen *WRKY11* dari waktu ke waktu. Dalam penelitiannya, Li *et al.* (2021) juga mendapatkan bahwa infeksi layu bakteri pada varietas resisten akan memicu akumulasi flavonoid yang akan menghambat kolonisasi *Rs* dalam jaringan dan memperkuat resistensi.

Berikut diagram ekspresi relatif gen *CYP450* dari varietas tembakau uji pada beberapa waktu inkubasi penyakit:



**Gambar 4.5.** Ekspresi relatif gen *CYP450*  
Keterangan: hsi = hari setelah inokulasi

*Cytochrome P450 (CYP450)* menjadi keluarga enzim yang terbesar pada tanaman yang terlibat pada biosintesis banyak metabolit sekunder pertahanan. Terdapat studi yang membuktikan *CYP450* mengalami penurunan ekspresi terhadap infeksi *Rs* pada kelembapan tanah yang tinggi (Huang *et al.*, 2021). Dikatakan pula bahwa dalam kondisi tersebut produksi hormon giberelin menjadi naik dan memiliki korelasi dengan meningkatnya kerentanan tanaman terhadap *Rs*. Sementara Li *et al.* (2021) melaporkan adanya peningkatan secara signifikan dari ekspresi *CYP450* pada 3 dan 7 hsi yang mengindikasikan keterlibatan positif gen ini dalam pertahanan terhadap *Rs*. Gambar 4.4. tidak menunjukkan adanya perubahan ekspresi *CYP450* sehingga peran gen tersebut belum dapat terlihat pada eksperimen ini.

Secara garis besar, pada penelitian ini, ekspresi gen *ERF15*, *WRKY11*, dan *CYP450* tidak mengalami perubahan. Hal ini dapat disebabkan oleh sebuah faktor yaitu kompatibilitas interaksi patogen-inang. Berdasarkan hasil identifikasi molekuler, patogen yang diuji tidak memiliki kekerabatan yang dekat dengan *Ralstonia solanacearum* ras 1 yang virulen terhadap tembakau. Bila ditinjau dari konsep *disease-triangle*, maka mustahil terjadi suatu interaksi yang mengarah pada timbulnya reaksi penyakit oleh inang ketika terdapat ketidakcocokan komponen molekuler dengan patogennya. Konsep ini dapat menjelaskan fenomena ketidakhadiran fenotip gejala layu bakteri pada tembakau yang terinokulasi.

## Kesimpulan dan Saran

### Kesimpulan

1. Dari hasil pengamatan profil ekspresi gen, diketahui bahwa terdapat perbedaan ketahanan tembakau varietas Dark 302 dan Dark 314 terhadap oomycetes *P. nicotianae*. Pada 1 hsi, varietas Dark 314 mengekspresikan PR4 mencapai 161% lebih tinggi dan secara signifikan terhadap kontrol, sedangkan Dark 302 tidak. Kontrasnya, Dark 302 mengekspresikan gen terkait kerentanan yaitu PLP2 yang beda secara signifikan terhadap kontrol yakni 124% lebih tinggi. Profil gen memberikan dasar molekuler kerentanan Dark 302 terhadap penyakit lanas dibandingkan Dark 314.
2. Terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen pada tembakau varietas Beinhart 1000, Hick Broadleaf, Dark 302, dan Dark 314 dalam merespon infeksi oomycetes *Phytophthora nicotianae*. Tembakau varietas resisten, Beinhart 1000, mengekspresikan PR1 secara relatif sebesar 285% lebih tinggi secara signifikan dibandingkan kontrol. Tembakau varietas Dark 314 mengekspresikan PR4 secara relatif sebesar 161% lebih tinggi secara signifikan terhadap kontrol. Tembakau varietas Dark 302 mengekspresikan PLP2 secara relatif sebesar 124% lebih tinggi secara signifikan dibanding kontrol, dan tembakau varietas rentan, Hick Broadleaf, mengekspresikan PUB24 secara relatif sebesar 83% dari ekspresi kontrol.
3. Seiring berjalan waktu infeksi, dinamika ekspresi gen terus terjadi dan mempengaruhi pertahanan tembakau disamping perlawanan *P. nicotianae*. *PR1*, *PR4*, *PLP2*, dan *PUB24* hanyalah 4 dari sekian banyak gen yang terlibat dalam pertahanan tembakau. Mekanisme ketahanan dan kerentanan tembakau yang diberikan dari hasil penelitian ini adalah berupa dugaan berdasarkan teoritis, sehingga perlu diteliti lebih lanjut hingga ke tingkat proteomik. Lama waktu infeksi menunjukkan gen terekspresi secara temporal dan dinamika ekspresi masing-masing gen uji berpengaruh pada perkembangan kondisi patologis.
4. Pada kondisi eksperimen ini, ekspresi gen *ERF15*, *WRKY11*, dan *CYP450* tidak mengalami perubahan selama periode infeksi dengan *Ralstonia solanacearum*.
5. Ketahanan dari tembakau uji terhadap infeksi *Ralstonia solanacearum* belum dapat diukur dari fenotip yang terjadi dan hasil analisis genotip.

## Saran

1. Perlu dilakukan penelitian mengenai perbedaan level ekspresi gen tembakau dalam merespon infeksi *P. nicotianae* menggunakan kultur murni oomycetes *P. nicotianae*.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai kadar protein yang dihasilkan dari gen dalam penelitian ini yakni *PR1*, *PR4*, *PLP2*, dan *E3 PUB4* pada tembakau ketika merespon infeksi *P. nicotianae*.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang juga melibatkan pengukuran kadar asam salisilat, atau asam jasmonat, atau etilen, atau ROS seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) untuk mempelajari mekanisme dan hubungan antara ekspresi *PR1*, dan *PR4* pada tembakau dalam merespon infeksi oleh *P. nicotianae* secara lebih komprehensif.
4. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk membuktikan dugaan aktivitas ribonuklease RNA patogen *P. nicotianae* oleh *PR4* tembakau.
5. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan titik sampling lebih banyak (lebih dari 9 hsi).
6. Uji pendahuluan terkait profil infeksi oleh *Ralstonia solanacearum* penting dilakukan secara lebih komprehensif untuk mengenal pola migrasi, dan patogenitas.
7. Verifikasi mikrobiologis terhadap sampel daun dari tembakau terinokulasi untuk memastikan keberadaan patogen.
8. Langkah kuantifikasi perpustakaan cDNA dapat ditambahkan untuk memperoleh komposisi reaksi PCR yang tepat.
9. Metode pengukuran ekspresi menggunakan *real time* PCR perlu diaplikasikan untuk hasil yang lebih akurat dan efisien.
10. Bila aplikatif, penggunaan *artificial climate/growth chamber* patut dipertimbangkan untuk kondisi lingkungan yang lebih tepat dan terkontrol.

## Daftar Pustaka

- Agrios, G.N. (2005). *Plant Pathology Fifth Edition*. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Ruella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E., dan Ryals, J. (1993). Increase tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 7327-7331.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I., dan Doolittle, W.F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Sciences*, 290, 972-977. doi: 10.1126/science.290.5493.972.
- Bao, Y., Ding, N., Qin, Q., Wu, X., Martinez, N., Miller, R., Zaitlin, D., Li, D., dan Yang, S. (2019). Genetic mapping of the gene conferring disease resistance to black shank in tobacco. *Mol Breeding*, 39(122), 1-10. <https://doi.org/10.1007/s11032-019-1036-x>.
- Bostock, R.M., Pye, M.F., Roubtsova, T.V. (2014). Predisposition in plant disease: Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 52, 517-549. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-172902.
- Badan Pusat Statistik (BPS). (2020). Produksi Tanaman Perkebunan (Ribuan Ton), 2019-2021. Retrieved from <https://www.bps.go.id/indicator/54/132/1/produksi-tanaman-perkebunan.html>
- Breljak, D., Ambriovic-Ristov, A., Kapitanovic, S., Cacev, T., dan Gabrilovac, J. (2005). Comparison of Three RT-PCR Based Method for Relative Quantification of mRNA. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 379-388.
- Chaudary, S. (2018). *Incidence, Distribution, and Epidemiology of Phytophthora Diseases of Citrus in Texas and Their Interaction with Huanglongbing Retrieved from Texas A&M University Libraries*. <https://oaktrust.library.tamu.edu/handle/1969.1/174478> .
- Delgadillo-Durán, P., Soto-Suárez, M., Rodriguez-Polanco, L., Carrero-Gutierrez, M., Torres-Rojas, E., dan Yockteng, R. (2020). A new method for the inoculation of *Phytophthora palmivora* (Butler) into cacao seedlings under greenhouse conditions. *Plant Methods*, 16(114): 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13007-020-00656-8>.
- Erwin, D.C., dan Ribeiro, O.K. (1996.) *Phytophthora diseases worldwide*. USA: APS Press. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-17-0295-RE>.
- French-Monar, R.D., Jones, J.B., Ozores-Hampton, M., dan Roberts, P.M. (2006). Survival of Inoculum of *Phytophthora capsici* in Soil Through Time Under Different Soil Treatment. *Plant Disease*, 91, 293-298. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0593>
- Gallup, C.A., Sullivan, M.J., dan Shew, H.D. (2006). Black shank of tobacco. *Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2006-0717-01.
- Gallup, C.A., McCorkle, K.L., Ivors, K.L., dan Shew, D. (2018). Characterization of the black shank pathogen, *Phytophthora nicotianae*, across North Carolina tobacco production areas. *Plant Disease*, 102, 1108-1114.
- Gaullin, E. (2006). Cellulose Binding Domains of a *Phytophthora* Cell Wall Protein are Novel Pathogen-Associated Molecular Patterns. *Plant Cell*, 18(7), 1766-1777. doi: 10.1105/tpc.105.038687.
- Giesbrecht, M.B., Hansen, E.M., dan Mitin, P. (2011). Histology of *Phytophthora ramorum* in *Notholothocarpus densiflorus* bark tissue. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 41, 89-100.
- Gimenez-Ibanes, S., Boter, M., Ortigosa, A., García-Casado, G., dan Solano, R. (2017). Novel players fine-tune plant trade-offs. *Essay Biochem.*, 58, 83.
- élazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic

- pathogens. *Annu. Rev. Phthopathol.*, 43, 205-227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923.
- Hammond-Kosack, J.E., dan Jones, J.D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8(10), 1773-1791. doi: [10.1105/tpc.8.10.1773](https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1773).
- Henuk, J.B.D., Sinaga, M.S., dan Hidayat, S.H. (2017). Morphological and molecular identification of fungal pathogens causing gummosis disease of *Citrus* spp. in Indonesia. *Biodiversitas*, 18(3), 1100-1108. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d180330>.
- Hidayah, N., dan Djajadi. (2009). Sifat-sifat tanah yang mempengaruhi perkembangan patogen tular tanah pada tanaman tembakau. *Perspektif*, 8, 74-83. DOI: [10.21082/p.v8n2.2009.%p](https://doi.org/10.21082/p.v8n2.2009.%p)
- Hidayah, N., dan Yulianti, T. (2010). Pengaruh waktu inokulasi dan jumlah inokulum terhadap patogenisitas *Phytophthora nicotianae* pada bibit tembakau. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat, dan Minyak Industri*, 2(2), 75-80. DOI: [10.21082/bultas.v2n2.2010.75-80](https://doi.org/10.21082/bultas.v2n2.2010.75-80)
- Hidayah, N., Yulianti, T., Wijayanti, K.S., Supriyono, Andhika, Y., dan Djajadi. (2021). Distribution of black shank disease on Temanggung tobacco and environmental factors affecting disease development. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 637, 1-7. doi:10.1088/1755-1315/637/1/012024
- Hou, L.X., Gao, C., Che, Y.M., Zhao, F.G., dan Liu, X. (2012). Gene cloning and expression analysis of pathogenesis-related protein 1 in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology Communications*, 48(1), 57-62.
- Hwu, F.Y., Lai, M.W., dan Liou, R.F. (2017). *PpMIDI* Plays a Role in the Asexual Development and Virulence of *Phytophthora parasitica*. *Front. Microbiol.*, 8(610), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00610>.
- Jackson, S.L. and Hardham, A.R. (1996). A transient rise in cytoplasmic free calcium is required for the induction of cytokinesis in zoosporangia of *Phytophthora cinnamomi*. *Eur. J. Cell Biol.*, 69, 180– 188.
- Jalali, S.A.H., Nikbakht, G., Mahboobi Sofiani, N., Jalali, S.M.A. (2011). Optimization of semi-quantitative RT PCR analysis for CPT 1 gene expression in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal for Fisheries Sciences*, 10(4), 749-752.
- Judelson, H.S., dan Blanco, F.A. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nature Reviews: Microbiology*, 3, 47-59. doi:10.1038/nrmicro1064.
- Kamoun, S. (2006). A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44, 41–60. doi: 10.1146/annurev.phyto.44.070505.143436.
- Kazan, K. dan Gardiner, D.M. (2017). Targeting pathogen sterols: Defence and counterdefense? *PLOS Pathogens*, 13(5), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006297>.
- Kebdani, N., Pieuchot, L., Deleury, E., Panabières, F., Le Berre, J.Y., dan Gourgues, M. (2010). Cellular and molecular characterization of *Phytophthora parasitica* appressorium-mediated penetration. *New Phytologist*, 185, 248-257. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03048.x.
- Kusvianti, D., Widodo, dan Prijono, D. (2014). Pengendalian Penyakit Busuk Pangkal Batang Lada dengan Ekstrak Pinang, Gambir, Sirih, dan Kapur Sirih. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 10(4), 103-111. DOI: 10.14692/jfi.10.4.103.
- Kwon, J.H., Choi, O., Kang, B., Lee, B., Park, J., Kang, D.W., Han, I., dan Kim, J. (2017). Identification of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing mango dieback in Korea. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 39(2), 241-245. <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1329231>.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffman, L., Fritig, B., Legrand, M., dan Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198, 267-284. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0129.x.

- La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M., Heitz, T. (2005). A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44(5), 810-825. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02578.x.
- La Camera, S., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., Roby, D., dan Heitz, T. (2009). The Arabidopsis Patatin-Like Protein 2 (PLP2) Plays an Essential Role in Cell Death Execution and Differentially Affects Biosynthesis of Oxylipins and Resistance to Pathogens. *MPMI*, 22(4), 469-481.
- Letchumanan, V., Chan, K.G., dan Lee, L.H. (2014). *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques. *Frontiers in Microbiology*, 5(705), 1-13. doi: [10.3389/fmicb.2014.00705](https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00705).
- Li, Y., Wang, L., Sun, G., Li, X.H., Chen, Z.G., Feng, J., dan Yang, Y. (2021). Digital gene expression analysis of the response to *Ralstonia solanacearum* between resistant and susceptible tobacco varieties. *Sci Rep*, 11, 3887 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82576-8>
- Liang, L., Li, H., Zhou, L., dan Chen, F. (2019). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes stem canker of Chinese hackberry in China. *Journal of Forestry Research*, 31, 2571-2580.
- Linden, K.J., dan Callis, J. (2020). The ubiquitin system affects agronomic plant traits. *J. Biol. Chem.*, 295(40), 13940-13955. DOI10.1074/jbc.REV120.011303.
- Liu, H., Liu, B., Lou, S., Bi, H., Tang, H., Tong, S., Song, Y., Chen, N., Zhang, H., Jiang, Y., dan Liu, J. (2021). CHYR1 ubiquitinates the phosphorylated WRKY70 for degradation to balance immunity in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 230(3), 1095-1109. <https://doi.org/10.1111/nph.17231>
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., dan Cunningham, K.W. (2000). A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol Cell Biol.*, 20(18), 6686-6694. doi: 10.1128/MCB.20.18.6686-6694.200.
- Ludowici, V.A., Zhang, W., Blackman, L.M., dan Hardham, A.R. (2013). *Phytophthora nicotianae*. Dalam: *Phytophthora nicotianae – a global perspective*, (K. Lamour, ed) CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK, 113-123.
- Martiansyah, I., Amanah, D.M., dan Putranto, R.A. (2018). Semi-quantitative RT-PCR analysis of transcripts encoding protease inhibitor in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg latex. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental*, 183, 1-9. doi :10.1088/1755-1315/183/1/012004.
- Mazumder, M., Das, S., Saha, U., Chatterjee, M., Bannerjee, K., dan Basu, D. (2013). Salicylic acid-mediated establishment of the compatibility between *Alternaria brassicicola* and *Brassica juncea* is mitigated by abscisic acid in *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 70, 43–51. doi:10.1016/j.plaphy.2013.04.025.
- McCorkle, K.L., Drake-Stowe, K., Lewis, R.S., dan Shew, D. (2018). Characterization of *Phytophthora nicotianae* resistance conferred by the introgressed *Nicotiana rustica* region, Wz, in flue-cured tobacco. *Plant Disease*, 102, 309-317. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0339-RE>
- Meng, Y., Zhang, Q., Ding, W., Shan, W. (2014). Review: *Phytophthora parasitica*: a model oomycete plant pathogen. *Mycology*, 5(2), 43-51. doi: [10.1080/21501203.2014.917734](https://doi.org/10.1080/21501203.2014.917734)
- Meng, H., Sun, M., Jiang, Z., Liu, Y., Sun, Y., Liu, D., Jiang, C., Ren, M., Yuan, G., Yu, W., Feng, Q., Yang, A., Cheng, L., dan Wang, Y. (2021). Comparative transcriptome analysis reveals resistant and susceptible genes in tobacco cultivars in response to infection by *Phytophthora nicotianae*. *Scientific Reports Nature*, 11(809), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80280-7>
- Mukherjee, A.K., Carp, M.J., Zuchman, R., Ziv, T., Horwitz, B.A., dan Gepstein, S. (2010). Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. *J. Proteomics*, 73, 709-720. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2009.10.005>
- Naidoo, R., Ferreeira, L., Berger, D.K., Myburg, A.A., dan Naidoo, S. (2013). The identification



- and differential expression of *Eucalyptus grandis* pathogenesis-related genes in response to salicylic acid and methyl jasmonate. *Frontiers in Plant Science*, 4(43), 1-9. DOI: [10.3389/fpls.2013.00043](https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00043)
- Newman, L., Amanda, L.J., dan Duffus, C.L. (2016). Using the Free Program MEGA to Build Phylogenetic Trees from Molecular Data. *The American Biology Teacher*, 78(7), 608-612. DOI:[10.1525/abt.2016.78.7.608](https://doi.org/10.1525/abt.2016.78.7.608).
- Panabières, F., Ali, G.S., Allagui, M.B., Dalio, R.J.D., Gudmestad, N.C., Kuhn, M., Guha Roy, S., Schena, L., dan Zampounis, A. (2016). Review: *Phytophthora nicotianae* disease worldwide: new knowledge of a long-recognised pathogen. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(1), 20-40. DOI:[10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-16423](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-16423)
- Pavan, S., Jacobsen, E., Visser, R.G.F., Bai, Y. (2010). Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broadspectrum resistance. *Mol Breed.*, 25(1), 1-12. DOI: [10.1007/s11032-009-9323-6](https://doi.org/10.1007/s11032-009-9323-6)
- Peng, C., Zhang, A., Wang, Q., Song, Y., Zhang, M., Ding, X., Li, Y., Geng, Q., dan Zhu, C. (2020). Ultrahigh-activity immune inducer from Endophytic Fungi induces tobacco resistance to virus by SA pathway and RNA silencing. *BMC Plant Biology*, 20(169), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02386-4>.
- Pfeufer, E. (2020). Black shank to tobacco. *Plant Pathology Fact Sheet (PPFS-AG-T-06) University of Kentucky*.
- Pieterse, C.M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., dan Van Wees, S.C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 28, 489-521. doi: [10.1146/annurev-cellbio-092910-154055](https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154055).
- Portz, R.L., Fleischmann, F., Koehl, J., Fromm, J., Ernst, D., Pascholati, S.F., dan Osswald, W.F. (2011). Histological, physiological, and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. *Forest Pathology*, 41(3), 202-211. DOI:[10.1111/j.1439-0329.2010.00667.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2010.00667.x).
- Oßwald, W., Fleischmann, F., Rigling, D., Coelho, A.C., Cravador, A., Diez, J., Dallo, R.J., Jung, M.H., Pfanz, H., Robin, C., Sipos, G., Solla, A., Cech, T., Chambery, A., Diamandis, S., Hansen, E., Jung, T., Orlikowski, L.B., Parke, J., Prospero, S., dan Werres, S. (2014). Strategies of attack and defense in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology*, 44(3), 169-190. <https://doi.org/10.1111/efp.12096>.
- Santos, A. F. dos, Luz, E. D. M. N. and Souza, J. T. 2005. *Phytophthora nicotianae*: agente etiológico da gomose da acácia-negra no Brasil. *Fitopatologia Brasileira (Impresso)* (Cessou em 2007. Cont. ISSN 1982-5676 Tropical Plant Pathology (Impresso) 30: 81-84. <https://doi.org/10.1590/s0100-41582005000100015>
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, E.N., Kim, K.D., Hwang, B.K., Islam, R., dan Shin, J.S. (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Rep.*, 24(4), 216-224. DOI: [10.1007/s00299-005-0928-x](https://doi.org/10.1007/s00299-005-0928-x).
- Schneiter, R., dan Di Pietro, A. (2013). The CAP protein superfamily: function in sterol export and fungal virulence. *BioMol Concepts*, 4(5), 519-525. doi: [10.1515/bmc-2013-0021](https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0021).
- Schorneck, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., Segretin, M.E., Bos, J., Haas, B.J., Zody, M.C., Nusbaum, C., Win, J., Thines, M., Kamoun, S. (2009). Ten things to know about oomycete effectors. *Molecular Plant Pathology*, 10(6), 795-803. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00593.x>
- Shilpa, Kaur, R., Sharma, M., dan Adarsh, M. N. (2017). Isolation, identification of *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and screening of tomato parental lines for buckeye rot resistance. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(1), 562-567. DOI: [10.31018/jans.v9i1.1230](https://doi.org/10.31018/jans.v9i1.1230).
- Shim, J.S., Jung, C., Lee, S., Min, K., Lee, Y., Choi, Y., Lee, J.S., Song, J.T., Kim, J.K., dan

- Choi, Y.D. (2013). Atmyb44 regulates wrky70 expression and modulates antagonistic interaction between salicylic acid and jasmonic acid signaling. *Plant J.*, 73(3), 483-495. doi: 10.1111/tj.12051.
- Steede, W.T., Ma, J.M., Eickholt, D.P., Drake-Stowe, K.E., Kernodle, S.P., Shew, H.D., Danehower, D.A., dan Lewis, R.S. (2017). The Tobacco Trichome Exudate Z-abienol and Its Relationship with Plant Resistance to *Phytophthora nicotianae*. *Plant Disease*, 101(7), 1214-1221. doi: 10.1094/PDIS-10-16-1512-RE.
- Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). *An Overview of Endophytic Microbes: Endophytism Defined*. Dalam: Bacon, C.W. and White, J.F., Eds., *Microbial Endophytes*, Marcel Dekker, New York, 3-29.
- Suhara, C., dan Hidayah, N. (2020). Resistensi galur-galur tembakau kasturi terhadap *Phytophthora nicotianae*, *Ralstonia solanacearum*, dan *Cucumber Mosaic Virus*. *Buletin Tanaman Tembakau, Serat, dan Minyak Industri*, 12(1), 22-33. DOI: [10.21082/btسم.v12n1.2020.22-33](https://doi.org/10.21082/btسم.v12n1.2020.22-33)
- Sullivan, M.J., Melton, T.A., dan Shew, H.D. (2005). Fitness of races 0 and 1 of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Plant Dis.*, 89, 1220-1228. DOI: [10.1094/PD-89-1220](https://doi.org/10.1094/PD-89-1220).
- Sullivan, M.J., Melton, T.A., dan Shew, H.D. (2005). Managing the race structure of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* with cultivar rotation. *Plant Dis.*, 89, 1285-1294. <https://doi.org/10.1094/PD-89-1285>.
- Tang, R., Dodd, A., Lai, D., McNabb, W.C., dan Love, D.R. (2007). Validation of zebrafish (*Danio rerio*) reference genes for quantitative real-time RT-PCR normalization. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 39(5), 384-390. doi: [10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x](https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2007.00283.x).
- Theda, J.A. (2020). Isolasi dan Skrining *In Vitro* Bakteri Pemacu Pertumbuhan Tanaman dari Area Rizosfer dan Endofit Tanaman Jagung (*Zea mays* L.). Skripsi. Universitas Surabaya, Surabaya.
- Trujillo, M., Ichimura, K., Casais, C., dan Shirasu, K. (2008). Negative Regulation of PAMP-Triggered Immunity by an E3 Ubiquitin Ligase Triplet in Arabidopsis. *Current Biology*, 18(18), 1396-1401. DOI 10.1016/j.cub.2008.07.085.
- Trujillo, M. (2018). News from the PUB: plant U-box type E3 ubiquitin ligases. *Journal of Experimental Botany*, 69(3), 371-384. DOI: [10.1093/jxb/erx411](https://doi.org/10.1093/jxb/erx411).
- Tyler, B.M. (2006). *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00373.x>.
- Vanegas-Villa, D.M., Navarro-Alzate, R.A., Afanador-Kafuri, L., Gutierrez-Monsalve, J.A., Morales-Osorio, J.G., Uribe-Soto, S.I., dan Gaviria-Gutierrez, B.M. (2020). Effect of interaction between *Phytophthora nicotianae* and *Meloidogyne* spp. on the productivity and quality of tobacco plants (*Nicotiana tabacum*). *Nematology*, 0(0), 1-14. DOI: [10.1163/15685411-bja10021](https://doi.org/10.1163/15685411-bja10021).
- van Jaarsveld, E., Wingfield, M.J., dan Drenth, A. (2002). Evaluation of Tobacco Cultivars for Resistance to Races of *Phytophthora nicotianae* in South Africa. *Journal of Phytopathology*, 150, 456-462. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2002.00766.x>.
- van Loon, L.C., dan van Strien, E.A. (1999). Mini review: The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85-97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>.
- van Loon, L.C., Rep, M., dan Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135-162. doi: [10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425](https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425).
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., van der Heijden, W.H.W., Wendehenne, D., dan Pugin, A. (2009). Early Responses of Tobacco Suspension Cells to Rhizobacterial Elicitors of Induced Systemic Resistance. *MPMI*, 21(12), 1609-1621. doi:10.1094 / MPMI -21-12-

- van Schie, C.C.N., dan Takken, F.L.W. (2014). Susceptibility genes 101: How to be a good host. *The Annual Review of Phytopathology*, 52, 551-581. DOI: [10.1146/annurev-phyto-102313-045854](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045854).
- van West, P., Appiah, A.A., Gow, N.A.R. (2003). Review: Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 99-113. doi:10.1016/S0885-5765(03)00044-4.
- Verma, V., Ravindran, P., dan Kumar, P.P. (2016). Plant-hormone mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology*, 16 (86): 1-10. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>
- Villanueva-Alonzo, H.J., Us-Camas, R.Y., López-Ochoa, L.A., Robertson, D., Guerra-Peraza, O., Minero-Garcia, Y., dan Moreno-Valenzuela, O.A. (2013). A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for *NPR1* silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters*, 35(5), 811-823. DOI: [10.1007/s10529-013-1146-1](https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1).
- Vontimitta, V., dan Lewis, R.S. (2012). Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart-1000. *Mol. Breeding*, 29, 89-98. <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9528-8>.
- Walker, C.A., dan van West, P. (2007). Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 21, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.02.001>
- Wangorsch, A., Scheurer, S., Blanca, M., Blanca-Lopez, N., Somoza, M.L., dan Martin-Pedraza, L. (2022). Allergenic Properties and Molecular Characteristics of PR-1 Proteins. *Frontiers in Allergy*, 3, 824717, 1-8. doi: 10.3389/falgy.2022.824717
- Wasternack, C., dan Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction, and action in plant stress response, growth, and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of Botany*, 111(6), 1021-1058. doi: 10.1093/aob/mct067.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., dan Taylor, J.W. (1990). *Amplifications and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. Halaman 315-322 dalam PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press.
- Yang, J., Duan, G., Li, C., Liu, L., Han, G., Zhang, Y., dan Wang, C. (2019). The Crosstalks Between Jasmonic Acid and Other Plant Hormone Signaling Highlight the Involvement of Jasmonic Acid as a Core Component in Plant Response to Biotic and Abiotic Stresses. *Front. Plant Sci.*, 10(1349), 1-12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01349>.
- Yockteng, R., Almeida, A.M.R., Yee, S., Andre, T., Hill, C., dan Specht, C.D. (2013). A method for extracting high-quality RNA from diverse plants for next-generation sequencing and gene expression analysis. *Applications in Plant Sciences*, 1(12), 1-6. doi: [10.3732/apps.1300070](https://doi.org/10.3732/apps.1300070).
- Zander, M., Chen, S., Imkampe, J., Thurow, C., dan Gatz, C. (2012). Repression of the *Arabidopsis thaliana* jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by tga-interacting glutaredoxins depends on their c-terminal alwl motif. *Mol. Plant*, 5(4), 831-840. DOI: <https://doi.org/10.1093/mp/ssr113>.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7(1-2), 203-214. doi:10.1089/10665270050081478

## Lampiran

### Lampiran Penggunaan Dana Penelitian dan Bukti Kuitansi/ Bon/ Nota pengeluaran

No.	Tanggal	Keterangan	Total (Rp.)	Pajak (Rp.)
1	06-03-2022	PCR tube rack	118.600	-
2	20-09-2021	Isolat Balittas	415.000	-
3	12-02-2022	Liquid N <sub>2</sub> 5 Liter	60.000	6.000
4	20-01-2022	Liquid N <sub>2</sub> 10 Liter	120.000	12.000
5	18-01-2022	Liquid N <sub>2</sub> 10 Liter	120.000	12.000
6	19-10-2021	Liquid N <sub>2</sub> 10 Liter	120.000	12.000
7	06-03-2022	Rak tabung PCR	59.000	-
8	16-08-2021	Murashige & Skoog Media 10L	2.240.000	224.000
9	16-08-2021	Microtips White (Rack+Box) 5x	861.520	86.152
10	16-08-2021	Microtips Yellow (Rack+Box) 5x	861.520	86.152
11	16-08-2021	Microtips Blue (Rack+Box) 5x	880.880	88.088
12	16-08-2021	Aesculap AG x2	933.800	93.380
13	31-08-2021	Plant total RNA Mini Kit	3.300.000	330.000
14	31-08-2021	ExcelRT Reverse Trancription kit	3.600.000	360.000
15	31-08-2021	Excel Taq 2x Fast Q-PCR mix	3.700.000	370.000
16	08-09-2021	Primer set	3.017.000	301.700
		<b>Total</b>	<b>20.407.320</b>	<b>1.981.472</b>
		<b>Grand Total</b>		<b>22.388.792</b>