

3. Penguatan Metode Deteksi dan Identifikasi Cendawan *Bipolaris maydis* pada Benih Jagung

Keberadaan cendawan *B. maydis* pada pertanaman jagung di lapangan, dapat menyebabkan penyakit hawar daun dengan potensi penurunan produksi jagung hingga mencapai 50%. Di laboratorium Balai Besar PPMBTPH, cendawan *B. maydis* juga termasuk salah satu cendawan target dalam ruang lingkup akreditasi oleh Komite Akreditasi Nasional (KAN) dan secara periodik harus dilakukan pemeliharaan ruang lingkup dalam siklus akreditasi. Oleh sebab itu, metode pengujian yang tepat di laboratorium untuk mendeteksi dan mengidentifikasi secara dini cendawan tersebut sangat diperlukan, sedangkan metode baku untuk pengujian cendawan target tersebut belum tersedia dalam ISTA *Rules Chapter 7* tahun 2024. Dengan mengetahui jenis patogen penyebab penyakit yang menyerang di lapang melalui hasil uji cendawan terbawa benih di laboratorium, maka informasi tersebut dapat digunakan untuk menentukan teknik pengendalian penyakit yang tepat.

Selama ini, pengujian cendawan pada benih tertentu dilakukan dengan metode *blotter test* yang mengacu pada ISTA *Rules Chapter 7 (Seed Health Testing)*. Namun pada Chapter 7, belum tercantum metode uji secara khusus yang dapat digunakan untuk mendeteksi cendawan target *Bipolaris maydis* pada benih jagung. Berdasarkan ISTA *Rules Metode 7-010: metode deteksi cendawan Bipolaris oryzae* pada benih padi dilakukan dengan prinsip pengujian menggunakan metode *blotter test* yaitu benih diisolasi di atas kertas filter steril dalam cawan petri dandiinkubasi dalam inkubator pada suhu ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 7 hari, dengan pencahayaan lampu NUV (*Near Ultra Violet*) dengan periode gelap dan terang selama 12 jam terang dan 12 jam gelap untuk memicu pertumbuhan cendawan.

Menurut Hanif dan Susanti (2019) dengan mengacu pada ISTA *Rules (1996)* metode standar yang digunakan untuk pengujian yaitu benih jagung diinkubasi selama 12 jam di bawah penyinaran NUV dan 12 jam tanpa penyinaran NUV pada suhu 25°C . Pada hari ke-2 benih diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam. Selanjutnya benih diinkubasi kembali pada suhu 25°C hingga hari ke-14. Namun metode dengan durasi inkubasi selama 14 hari pada saat ini tidak cukup

efektif digunakan karena memakan waktu terlalu lama. Dengan mengacu pada metode deteksi cendawan *B. oryzae* pada benih padi, diperlukan pengkajian melalui kegiatan penguatan metode untuk mengetahui keefektifan metode tersebut bila digunakan untuk deteksi keberadaan cendawan *B. maydis* pada benih jagung. Dengan latar belakang tersebut, maka pada Tahun 2024 dilakukan penguatan metode terkait deteksi cendawan *B. maydis* penyebab penyakit hawar daun pada benih jagung. Tujuan penguatan metode ini untuk mendapatkan metode deteksi dan identifikasi cendawan *B. maydis* pada benih jagung yang tepat dan akurat.

Kegiatan penguatan metode ini dilaksanakan pada Bulan Januari s.d Desember 2024 di laboratorium Balai Besar PPMBTPH. Bahan yang digunakan pada kegiatan ini antar lain benih/ biji, dan daun jagung, serta bahan-bahan lain yang tersedia di laboratorium cendawan seperti: kertas filter steril (*Whatman* No. 91), plastik wrap, alkohol 70%, *shear's solution*, larutan sodium hypochlorite 1%, *lactophenol blue solution*, akuades steril dan spiritus, serta bahan-bahan di laboratorium elektroforesis. Sementara peralatan yang digunakan merupakan peralatan standar yang ada di laboratorium cendawan seperti: autoclave, *medicool*, freezer, laminair air flow, lampu NUV, mikroskop stereo, mikroskop compound, cawan petri, *beaker glass steril* (500 ml) sprayer, bunsen, inkubator, pinset, jarum preparat, *object glass* dan *cover glass*, serta peralatan standar lainnya di laboratorium elektroforesis.

Metode pelaksanaan kegiatan penguatan metode dilakukan dengan tahapan sebagai berikut:

- a. Penentuan provinsi target untuk pengambilan sampel
Sampel diambil dari provinsi Jawa Timur yang merupakan sentra produksi jagung dan beberapa provinsi lain yang terdapat lokasi pertanaman jagung terserang penyakit hawar daun seperti Provinsi Jawa Barat, Lampung dan Kalimantan Timur.
- b. Pengambilan sampel di provinsi target
Pengambilan sampel dilakukan pada pertanaman yang diduga terinfeksi oleh penyakit hawar daun dengan gejala penyakit terdapatnya propagul cendawan target pada jaringan daun. Menurut Hamidson et al (2023), Gejala hawar daun di lapang

ditunjukkan dengan adanya gejala hawar daun (Gambar 1.). Bercak berwarna hitam ketika muncul bercak berbentuk oval kemudian bercak semakin memanjang berbentuk elips dan berkembang menjadi kering disebut hawar. Bercak akan muncul pada daun bawah dan menuju daun atas yang masih muda yang dibantu oleh angin sehingga spora dapat berpindah.



Gambar 1. Gejala penyakit hawar daur (Damanik, 2010)

Sampel berupa contoh biji jagung yang diambil dari tanaman bergejala di masing-masing provinsi target terdiri dari beberapa varietas. Setiap varietas diambil biji jagungnya kurang lebih sebanyak 2 kg disertai daunnya.

Pada kegiatan ini pengambilan sampel jagung dari lapang yaitu varietas NK Sumo dan NK Juara dari Kabupaten Pringsewu Provinsi Lampung, varietas Betras dari Kabupaten Berau Provinsi Kalimantan Timur, serta 3 sampel dari Kabupaten Majalengka (Provinsi Jawa Barat) yaitu varietas Bisi 18, NK dan Pioneer, dimana pengambilan sampel di ketiga Provinsi tersebut dilakukan oleh POPT setempat (Gambar 2.).



Gambar 2. Pengambilan sampel jagung di lapang yang terinfeksi *B. maydis*. A. Pertanaman jagung di Kabupaten Pringsewu, Lampung. B. Pertanaman jagung di Kecamatan Talisayan, Provinsi Kalimantan Timur

Untuk memastikan penggunaan sampel bergejala dari lapang, Tim Balai Besar PPMBTPH juga melakukan pengambilan sampel secara langsung dari lahan bergejala penyakit hawar daun di Kecamatan Cimenyan Kabupaten Bandung (Jawa Barat). Sampel yang diambil berupa sampel daun dan biji jagung dengan varietas Pioneer. Selain itu juga diperoleh sampel benih jagung tanpa perlakuan dari Produsen Benih (PT. BISI) yang biasa beredar di pasaran yaitu varietas Bisi 18. Berdasarkan data hasil penelitian (Simatupang, 2023) terdapat informasi bahwa benih jagung Varietas Bisi 18 terdapat adanya infeksi cendawan *B. maydis*.

c. Persiapan sampel untuk uji laboratorium

Persiapan sampel biji jagung dari lapang yang masih bertongkol dilakukan dengan memipil biji jagung dari tongkolnya. Setelah dipipil kemudian biji jagung dikeringkan dengan cara dijemur di bawah sinar matahari kurang lebih selama 4 jam untuk mengurangi kadar air yang masih terlalu tinggi dan menghilangkan kelembaban karena proses pengiriman. Selain biji jagung juga disiapkan sampel berupa daun dari tanaman yang bergejala hawar daun tersebut (Gambar 3.).

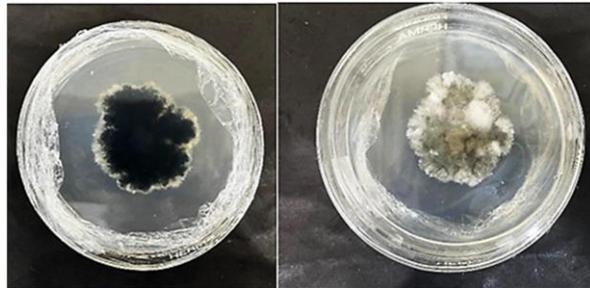


Gambar 3. Sampel dari bagian tanaman yang diduga terinfeksi. A. Daun bergejala hawar. B. Jagung bertongkol terdapat gejala propagul *B. maydis*

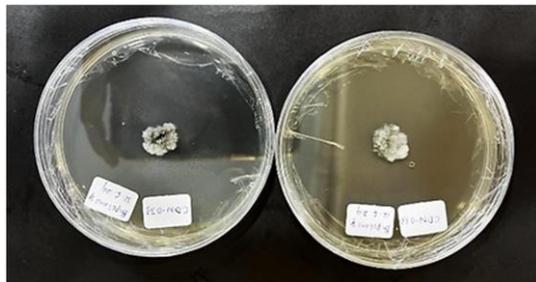
Setelah proses pengeringan, sampel biji jagung selanjutnya dihomogenkan dan dikemas untuk contoh uji pendahuluan di laboratorium dalam deteksi keberadaan cendawan target *B. maydis*.

d. Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan tingkat kontaminasi cendawan target pada contoh benih yang diuji

Pelaksanaan uji pendahuluan bertujuan untuk memastikan apakah benih yang diambil dari lapang terinfeksi oleh cendawan target, dan apabila hasil uji menunjukkan benih yang positif terinfeksi, maka dapat digunakan sebagai bahan uji pada kegiatan penguatan metode. Sebagai acuan pengujian, digunakan isolat murni dari cendawan *Bipolaris maydis* yang berasal dari Balai Besar Uji Standar Karantina Hewan, Ikan dan Tumbuhan (Badan Karantina Indonesia) dan PT. Syngenta. Gambar isolat hasil satu kali pemurnian pada proses peremajaan untuk mendapatkan isolat murni (Gambar 4. dan 5.).



Gambar 4. Isolat murni cendawan *B. maydis*



Gambar 5. Isolat cendawan *B. maydis* umur tiga hari setelah peremajaan

Uji pendahuluan dilakukan oleh beberapa orang analis menggunakan *blotter test* dengan suhu inkubasi 22°C pada hari ke-1, 3 s.d 7 di bawah penyinaran lampu NUV dan inkubasi pada hari ke-2 pada suhu -20°C. Proses pengujian dilakukan dengan mengidentifikasi cendawan target sesuai ciri-ciri morfologinya.

Miselium dari jamur ini adalah hijau gelap, konidiofornya berukuran (60-20 x 6-10 mikron), konidia berukuran (40-150 x

11-27). Miselium dan sporanya dapat bertahan hidup pada sisa tanaman dan biji terinfeksi. Siklus hidup lengkapnya mencapai 60-72 jam. Konidia diterbangkan oleh angin atau terbawa percikan air untuk sampai ke tanaman yang baru. Konidia mempunyai 6-8 sekat (Degefu, 2003). Isolat *B. maydis* yang ditumbuhkan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) berwarna hitam putih keabuan dengan zonasi beraturan dan tidak beraturan. Konidia mulai terlihat setelah 6 hari dan semakin banyak pada 12 hari. Bentuk konidia agak melengkung, ujungnya tumpul, bersekat 3-10 buah (Dickson 1956; Pakki et al. 1997; Shurtleff 1980). Konidiofor terbentuk dalam kelompok, sering dari stroma yang datar, berwarna coklat tua atau hitam. Konidiofor lurus atau lentur, coklat atau coklat tua, dekat ujungnya pucat, halus, panjangnya sampai 700 μm , tebal 5-10 μm . Konidium jelas bengkok, berbentuk perahu, coklat pucat sampai coklat emas tua (Hollyday, 1980).

Menurut Hyun et al 2004, *B. maydis* memiliki Sinonim: *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miyake, *Drechslera maydis* (Nisikado & Miyake) Subram & Jain. Konidiofores pada biji timbul tunggal atau berkelompok kecil, lurus sampai lentur, bersepta, licin, genikulatum, coklat sedang sampai tua, panjang sampai 700 μm , tebal 5-10 μm . Konidia melengkung jelas, fusoid dengan hilum agak menonjol, pucat sampai coklat tua, halus, 5- 11-distoseptate, 70-160 \times 15-20.

- e. Pengujian dengan menggunakan metode *blotter test* dan teknik PCR

Pengujian dilakukan oleh beberapa analis di Laboratorium Balai Besar PPMBTPH menggunakan metode blotter test sesuai ISTA pada Chapter 7. Tahapan yang dilakukan pada teknik pengujian blotter test adalah penyiapan cawan petri yang sudah disteril dengan menggunakan autoklaf. Selanjutnya contoh kerja benih jagung sebanyak 400 benih (4 ulangan @ 100 butir) tersebut dimasukkan ke dalam beaker glass steril dan direndam selama 10 menit dalam larutan Sodium Hypochlorite 1%. Kemudian dibilas dengan aquades steril. Benih tersebut diletakkan di atas

3 lembar kertas filter steril Whatmann Nomor 1 yang sudah dilembabkan dengan air steril dan dimasukkan ke dalam cawan petri dengan bantuan pinset steril. Sebanyak 10 benih jagung diletakkan pada tiap cawan petri dan diulang sebanyak 40 kali. Benih jagung diinkubasi selama 12 jam di bawah sinar NUV dan 12 jam tanpa penyinaran NUV (kondisi gelap) pada suhu 25°C. Pada hari ke-2 benih diinkubasi pada suhu -20°C selama 24 jam. Selanjutnya benih diinkubasi kembali pada suhu 25°C hingga hari ke-7. Identifikasi dilakukan pada hari ke-7 (HST) dengan menggunakan mikroskop stereo dan mikroskop compound pada setiap benih. Identifikasi cendawan dilakukan melalui pengamatan morfologi dengan variabel yang diamati yaitu persentase infeksi cendawan yang ditemukan yang dihitung dengan rumus:

$$\text{Rata-rata benih yang terinfeksi} = \frac{\text{Benih yang terinfeksi}}{\text{Benih yang ditabur}} \times 100 \%$$

- f. Konfirmasi hasil identifikasi cendawan *B. maydis* secara morfologi dengan pengujian molekuler di Laboratorium Balai Besar PPMBTPH (metode Sambrook, 1990). Tahapan menggunakan primer universal ITS1F = TCCGTAGGTGAACCTGCGG dan ITS4R = TCCTCCGCTTATTGATATGC, serta visualisasi hasil PCR.

Prosedur pengujian yang dilakukan dari tahap isolasi hingga visualisasi hasil PCR mulai dari: ekstraksi isolasi DNA; visualisasi elektroforesis hasil ekstraksi DNA; amplifikasi DNA dengan PCR; dan visualisasi hasil PCR.

- a. Tahap lebih lanjut dilakukan pengujian RT-PCR untuk mengidentifikasi cendawan target secara kuantitatif berupa data persentase (%) dan secara kualitatif data positif atau negatif cendawan.
- b. Untuk mengkonfirmasi hasil visualisasi pita DNA yang muncul, maka dilakukan uji lanjutan sekuensing ke salah satu laboratorium di Singapura. Dengan sequencing memungkinkan analisis yang lebih mendalam dan spesifik terhadap DNA cendawan, memastikan bahwa hasil deteksi benar-benar

merupakan cendawan *B. maydis* dan bukan kontaminan atau spesies lain.

- c. Pada tahap awal penguatan metode, direncanakan untuk melakukan analisis data secara kuantitatif guna mendapatkan hasil yang terukur dan spesifik. Namun, selama proses pengumpulan data, ditemukan beberapa kendala yang menghambat pelaksanaan analisis kuantitatif. Menghadapi kendala tersebut, dilakukan pendekatan analisis dari kuantitatif menjadi kualitatif yaitu menggunakan analisis data secara deskriptif.

Keterbatasan sumber inokulum yang ada di lapang menjadi kendala untuk mendapatkan sampel yang terinfeksi secara alami. Salah satu hasil penelitian tahun 2023 di Desa Tanjung Seteko, Kecamatan Indralaya, Kabupaten Ogan Ilir, penyakit hawar daun (disebabkan oleh jamur *B. maydis*) sering muncul pada tanaman jagung. Menurut hasil penelitian Simatupang (2023), pengujian terhadap sampel yang diambil dari pertanaman jagung yang memiliki tingkat keparahan tertinggi terhadap penyakit hawar daun dengan data tingkat serangan mencapai 30.4% pada tahun 2023 di Kecamatan Talisayan di Kalimantan Timur juga belum menunjukkan hasil yang positif. Pada kegiatan penguatan metode ini, upaya mendapatkan sampel benih/biji jagung yang positif terinfeksi penyakit hawar daun telah dilakukan dengan bantuan POPT di daerah setempat dan pengambilan langsung pada lahan pertanaman jagung bergejala.

Hasil uji pendahuluan terhadap sampel jagung dari lapang dan pasaran dengan menggunakan *blotter test* di laboratorium cendawan Balai Besar PPMBTPH sebagaimana pada Tabel 1. berikut.

Tabel 1. Hasil deteksi dan identifikasi cendawan *B. maydis* pada benih jagung dan daun yang bergejala hawar dengan *blotter test*

No	Kode Contoh	Varietas	Asal Sampel/Bentuk	Analisis	Hasil Uji
1	709	NK Sumo	Pringsewu/Lampung	Hn	Negatif (-)
2	710	NK Sumo	Pringsewu/Lampung	Mk	Negatif (-)
3	711	NK Sumo	Pringsewu/Lampung	Ny	Negatif (-)
4	806	NK Juara	Pringsewu/Lampung	Mk	Negatif (-)
5	807	NK Sumo	Pringsewu/Lampung	Sy	Negatif (-)
6	808	Betras	Berau Kalimantan Timur/Biji	Nd	Negatif (-)
7	809	Bisi 18	Jawa Timur/Biji	Ng	Negatif (-)
8	810	-	Arsip bahan uji profisiensi Ta. 2023	Vn	Negatif (-)
9	2125	Pioneer	Majalengka/Daun	Hn	Positif (+)
10	2126	NK	Majalengka/Biji	Mk	Negatif (-)
11	2127	Bisi 18	Majalengka/Biji	Ng	Negatif (-)
12	2128	Pioneer	Majalengka/Biji	Vn	Negatif (-)
13	2129	Pioneer	Bandung/Biji	Sy	Negatif (-)

Berdasarkan hasil pengujian diketahui bahwa seluruh sampel benih/biji jagung yang diambil dari lapang dan pasaran tidak terdeteksi cendawan target *B. maydis*, hanya sampel daun jagung varietas Pioneer asal Majalengka yang menunjukkan hasil positif terdeteksi cendawan target.

Dengan melihat gejala di lapang yang diduga benih terserang penyakit hawar daun, ternyata metode *blotter test* yang digunakan belum dapat mendeteksi cendawan target sampel berupa benih sehingga perlu optimasi dengan memodifikasi suhu inkubasi dan pemilihan penggunaan jenis media kultur.

Hasil pengujian dengan *blotter test* pada sebagian besar sampel jagung terlihat adanya pertumbuhan beberapa cendawan saprofit seperti *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. dan cendawan lain *Fusarium* sp. (Gambar 6). Pengujian benih jagung yang terinfeksi *B. maydis* dengan metode *blotter test* belum dapat ditarik kesimpulan mengingat data beberapa perlakuan belum lengkap. Perlu dilakukan perbandingan dengan metode agar dan molekuler (*Real Time PCR*) untuk mendeteksi *B. maydis* pada benih jagung. Menurut Sreebub et al (2019), bahwa patogen yang bersifat seed borne berada pada bagian internal seperti: *B. maydis* dan *Colletotrichum graminicola* direkomendasikan menggunakan agar test pada suhu 22-25°C dengan penyinaran NUV selama 12 jam terang dan 12 jam gelap.



Gambar 6. Pertumbuhan cendawan saprofit menutupi sebagian besar permukaan benih

Pengujian dengan teknik PCR menggunakan primer universal ITS1 dan ITS4 dilakukan untuk mengkonfirmasi hasil uji laboratorium sebelumnya (*blotter test*) pada sampel yang sama. Sebagai kontrol positif digunakan pula sampel berupa isolat dari cendawan target. Primer universal ITS1 dan ITS4 digunakan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi cendawan (fungi) melalui analisis daerah Internal Transcribed Spacer (ITS) dari DNA ribosomal (rDNA). Daerah ITS ini sangat bervariasi antar spesies cendawan, sehingga sangat berguna untuk identifikasi spesies secara molekuler. Kombinasi primer ITS1 dan ITS4 memungkinkan amplifikasi seluruh daerah ITS (ITS1, 5.8S, dan ITS2), yang kemudian dapat dianalisis untuk mengidentifikasi spesies cendawan yang ada dalam sampel.

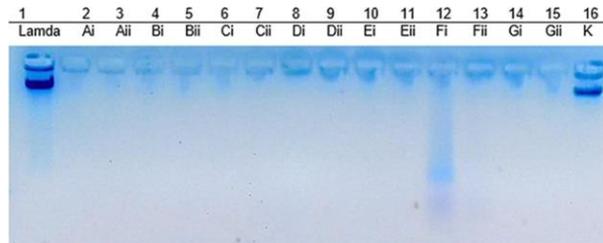
Tabel 2. Rekapitulasi hasil uji kualitas dan kuantitas ekstraksi contoh uji

No	Kode Contoh	Jenis Tan/ Varietas/ Kode	Asal/ Jenis Contoh	Hasil Uji Kualitas Kuantitas DNA		
				Visualisasi DNA	Kemurnian DNA	Konsentrasi DNA (ug/ul)
1	1818 / F	Jagung/Pioneer/F(i)	Majalengka/Daun	Ada	1,5	77,91
		Jagung/Pioneer/F(ii)	Majalengka/Daun	Ada	1,7	37,99
2	1819 / A	Jagung/NK/A(i)	Majalengka/Biji	Ada	1,4	44,2
		Jagung/NK/A(ii)	Majalengka/Biji	Ada	1,2	45,34
3	1820 / B	Jagung/BISI 18/B(i)	Majalengka/Biji	Ada	1,1	45
		Jagung/BISI 18/B(ii)	Majalengka/Biji	Ada	1	40,25
4	1821 / C	Jagung/Pioneer/C(i)	Majalengka/Biji	Ada	1	28,73
		Jagung/Pioneer/C(ii)	Majalengka/Biji	Ada	1,2	67,17
5	1822 / D	Jagung/Pioneer/D(i)	Bandung/Biji	Ada	1,3	58,18
		Jagung/Pioneer/D(ii)	Bandung/Biji	Ada	1	85,02
6	1823 / E	Jagung/NK Juara/E(i)	Lampung/Biji	Ada	1,1	11,72
		Jagung/NK Juara/E(ii)	Lampung/Biji	Ada	1,2	101,7
7	1824 / G	Isolat-/G(i)	Barantin	Ada	1,7	71,64
		Isolat-/G(ii)	Barantin	Ada	1,8	60,15

Sesuai data pada Tabel 2. diatas, selain sampel nomor 1824 kode G(ii) tingkat kemurnian DNA pada semua sampel yang diuji kurang dari 1,8. Hasil ekstraksi dengan rasio 1,8-2,0 merupakan DNA dengan

kemurnian yang bersih atau tidak terkontaminasi dengan residu protein.

Berdasarkan visualisasi elektroforesis hasil isolasi ekstraksi DNA terlihat bahwa sebagian besar sampel menunjukkan adanya pita DNA, dimana diperoleh DNA dengan kemurnian kurang dari 1,8 (Gambar 7.).



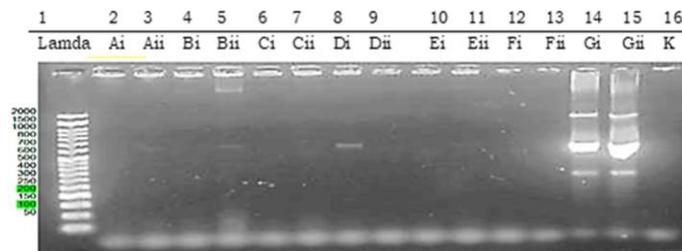
Gambar 7. Visualisasi hasil ekstraksi isolasi DNA jagung sampel Nomor 1818-1824

Tabel 3. Hasil uji PCR identifikasi keberadaan cendawan pada sampel dengan primer ITS1 dan ITS4

No	Kode Contoh	Jenis Tan/Varietas/Kode	Asal/Jenis Contoh	Hasil Identifikasi	Keterangan
1	1818 / F	Jagung/Pioneer/F(i)	Majalengka/Daun	Negatif	Primer spesifik yang digunakan adalah ITS1F = TCCGTAGGTGAACC TGCGG untuk <i>forward</i> dan ITS4R = TCCTCCGCTTATTGA TATGC untuk <i>reverse</i> dengan panjang produk 600 bp.
		Jagung/Pioneer/F(ii)	Majalengka/Daun	Negatif	
2	1819 / A	Jagung/NK/A(i)	Majalengka/Biji	Negatif	
		Jagung/NK/A(ii)	Majalengka/Biji	Positif	
3	1820 / B	Jagung/BISI 18/B(i)	Majalengka/Biji	Negatif	
		Jagung/BISI 18/B(ii)	Majalengka/Biji	Positif	
4	1821 / C	Jagung/Pioneer/C(i)	Majalengka/Biji	Negatif	
		Jagung/Pioneer/C(ii)	Majalengka/Biji	Negatif	
5	1822 / D	Jagung/Pioneer/D(i)	Bandung/Biji	Negatif	
		Jagung/Pioneer/D(ii)	Bandung/Biji	Positif	
6	1823 / E	Jagung/NK Juara/E(i)	Lampung/Biji	Negatif	
		Jagung/NK Juara/E(ii)	Lampung/Biji	Negatif	
7	1824 / G	Isolat/-G(i)	Barantin	Positif	
		Isolat/-G(ii)	Barantin	Positif	

Berdasarkan Tabel 3. di atas dapat disimpulkan hasil PCR dengan primer ITS1 dan ITS4 positif terdeteksi jamur (cendawan) pada contoh G (isolat) dan smear positif pada contoh A, B dan D yang menunjukkan adanya pita DNA pada 600 bp. Pada contoh C, E dan F tidak ada visualisasi pita DNA cendawan. Dimana contoh C, E dan

F juga merupakan sampel jagung bergejala yang diduga terserang penyakit hawar daun di lapang.



Gambar 8. Visualisasi hasil PCR deteksi *B. maydis* dengan primer universal ITS1/ ITS4 pada sampel nomor 1818 s.d 1824 dengan panjang produk amplifikasi sekitar 600 bp

Hasil PCR dengan primer ITS 1 dan ITS 4 terlihat visualisasi hasil PCR positif cendawan antagonis pada contoh G (isolat) dan smear positif pada contoh B dan D yang menunjukkan adanya pita DNA pada 600 bp. Pada contoh A, C, E dan F tidak ada visualisasi pita DNA cendawan patogen. Dimana contoh A, C, E dan F juga merupakan sampel jagung bergejala yang diduga terserang penyakit hawar daun di lapang (Gambar 8.).

Berdasarkan hasil pengujian tidak ditemukannya pita DNA pada ukuran panjang produk target yang sesuai dalam penggunaan primer ITS pada ukuran 600 bp karena masih memerlukan kondisi optimum dari waktu, suhu, dan konsentrasi reagent uji dalam amplifikasi (Kitt PCR, primer, cetakan DNA).

Pengujian *Real Time* PCR (qPCR) dilakukan karena memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan PCR konvensional yaitu dapat untuk melakukan pengukuran kuantitatif DNA dalam sampel secara langsung selama proses amplifikasi, sedangkan PCR konvensional biasanya hanya memberikan hasil kualitatif atau semi-kuantitatif. *Real Time* PCR dapat memberikan hasil lebih cepat karena tidak memerlukan langkah tambahan seperti elektroforesis gel untuk analisis produk PCR. Selain itu *Real Time* PCR memiliki sensitivitas dan akurasi yang lebih tinggi dalam mendeteksi jumlah DNA yang sangat kecil.

Hasil pengujian RT PCR diketahui dari 6 sampel yang diuji menunjukkan hasil negatif. Jika dilihat dari pola pattern terhadap kontrol positif yakni isolat pada sampel G. Namun, kondisi sampel kemungkinan memiliki potensi gejala positif jika dilihat dari nilai *cycle threshold* (cq) yang muncul. Diperlukan pengenceran bertingkat terhadap sampel G (PC/Isolat) untuk mengetahui *limited of detection* primer ITS sehingga mampu menentukan *true* positif dari DNA target (Tabel 4.).

Tabel 4. Hasil uji RT PCR berdasarkan nilai cq

Well	Colour	Cq	Efficiency	Efficiency R ²	Result
Unnamed					
24		-	-	-	Excluded
CA1					
1		36.17	0.64	0.99288	$\bar{x} = 36.17 \sigma = 0.00$
CB1					
2		35.28	0.94	0.99953	$\bar{x} = 35.28 \sigma = 0.00$
CC1					
3		34.35	0.96	0.99970	$\bar{x} = 34.35 \sigma = 0.00$
CD1					
4		33.76	0.94	0.99974	$\bar{x} = 33.76 \sigma = 0.00$
CE1					
25		37.07	0.80	0.99991	$\bar{x} = 37.07 \sigma = 0.00$
CF1					
26		34.16	0.86	0.99971	$\bar{x} = 34.16 \sigma = 0.00$
G1					
27		16.48	0.89	0.99956	$\bar{x} = 16.48 \sigma = 0.00$

Kesimpulan dari kegiatan penguatan metode ini:

- Metode *blotter test* dengan menggunakan suhu inkubasi $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pada hari ke-1, 3 s.d 7 di bawah penyinaran lampu NUV dan pada suhu -20°C pada hari ke-2 belum dapat mendeteksi cendawan *B. maydis* pada benih jagung
- Hasil negatif pada *blotter test* pada benih jagung perlu dilakukan optimasi kembali walaupun pengujian pada daun yang bergejala hawar menunjukkan hasil positif *B. maydis*.
- Beberapa faktor yang berpengaruh dalam pengujian *blotter test* antara lain: distribusi infeksi yang berbeda, limit deteksi, sensitivitas metode *blotter test*, kondisi inkubasi yang tidak optimal, dan keberadaan cendawan dalam kondisi dorman.
- Konfirmasi dengan teknik PCR dan uji lanjut dengan sequencing memberikan hasil yang lebih akurat dalam memastikan keberadaan *B. maydis* pada benih.

Adapun rekomendasinya adalah bahwa mempertimbangkan faktor-faktor tersebut, diperlukan pengkajian lebih lanjut menggunakan berbagai metode deteksi dan kondisi inkubasi yang berbeda untuk memastikan hasil yang akurat dalam identifikasi cendawan pada benih.