

**PENGUJIAN KARTU FTA SEBAGAI ALAT SAMPLING DNA JAMUR PATOGEN
DARI BERBAGAI BAGIAN TANAMAN YANG TERINFEKSI**

*Assessing FTA card for fungal pathogen DNA capture from different types
of infected plant material*

Purnamila Sulistyawati

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan

Jl. Palagan Tentara Pelajar Km. 15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta 55582

Telp. (0274) 895954, 896080, Fax. (0274) 896080

Naskah masuk : 15 Agustus 2011 - Naskah diterima : 7 November 2011

ABSTRACT

FTA card offers a simple and fast method for retrieval of DNA samples at room temperature and storage of DNA in the short and long term. This will facilitate the detection and identification of plant pathogens rapidly; increasing the number of samples can be collected, stored and transported in the field, especially from remote locations. The purpose of this study is to investigate the suitability of FTA cards as a new method for sampling DNA from multiple infected of plant tissues such as leaves, bark and roots. The results of this study shows that the FTA card suitable for use as one method of sampling because its quick and accurate. Series of PCR using ITS1F/ITS4 and ITS3/ITS4 primer pairs were done to detect the fungal DNA from the FTA card. Nested PCR has been done using species-specific primers to identify the fungus without cloning. Optimization of methods to maximize the use of FTA cards as a method of sampling and DNA extraction which is simple, fast, accurate and safe for the environment is still needed.

Key Words : DNA Sampling, FTA cards, PCR, Nested PCR

ABSTRAK

Kartu FTA menawarkan metode yang sederhana dan cepat untuk pengambilan sampel DNA pada suhu kamar dan penyimpanan DNA dalam jangka pendek dan panjang. Hal ini akan memudahkan deteksi dan identifikasi patogen tanaman dengan cepat; meningkatkan jumlah sampel dapat dikumpulkan, disimpan dan diangkut di lapangan, terutama dari lokasi terpencil. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menyelidiki kesesuaian kartu FTA sebagai metode baru untuk DNA sampling dari beberapa jaringan tanaman terinfeksi seperti daun, kulit kayu dan akar. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kartu FTA sesuai untuk digunakan sebagai salah satu metode sampling, karena cepat dan akurat. PCR menggunakan pasangan primer ITS1F/ITS4 dan ITS3/ITS4 dilakukan

untuk mendeteksi DNA jamur dari kartu FTA. Nested PCR juga dilakukan menggunakan primer spesies-spesifik untuk mengidentifikasi jamur tanpa melakukan kloning. Optimalisasi metode untuk memaksimalkan penggunaan kartu FTA sebagai salah satu metode sampling dan ekstraksi DNA yang sederhana, cepat, akurat dan aman bagi lingkungan masih diperlukan.

Kata Kunci : DNA Sampling, kartu FTA, PCR, Nested PCR

I. PENDAHULUAN

Beberapa jenis jamur patogen secara khusus menyerang bagian-bagian tertentu dari tanaman seperti biji, akar, batang dan daun. Sebagai contoh, serangan jamur *Ganoderma* sp. dan *Phelinus noxius* yang menyebabkan penyakit busuk akar dan busuk batang pada tanaman *Acacia mangium* (Eyles *et al.*, 2008, Sankaran *et al.*, 2005). Contoh yang lain adalah *Fusarium*; yang kemungkinan merupakan jamur patogen tanaman yang paling penting karena dapat menyebabkan berbagai macam *blights*, busuk akar atau layu pada hampir setiap jenis tanaman ekonomis penting termasuk pohon hutan.

Masalah penyakit tanaman ini dapat diminimalisir dengan melakukan identifikasi penyebab penyakit secara cepat dan akurat. Banyak penyakit tanaman akibat serangan jamur yang tidak menunjukkan gejala yang jelas pada tahap awal infeksi dan diperlukan suatu metode teknologi diagnostik imunologi atau molekul untuk mendeteksi infeksi pada tahap awal tersebut. Identifikasi dari berbagai penyakit tanaman kehutanan dapat dilakukan dengan cara identifikasi morfologi; baik makroskopik dan mikroskopik; selain itu juga dapat difasilitasi dengan menggunakan analisa DNA (Hamelin *et al.*, 1996; Hoff *et al.*, 2004; Maxwell *et al.*, 2005).

Meskipun demikian harus selalu diingat bahwa teknik molekuler pada dasarnya adalah suatu alat pendukung proses identifikasi dan pengaplikasiannya harus melengkapi prosedur diagnostik konvensional dan/atau interpretasi ahli.

Analisa DNA ini memerlukan suatu teknik sampling dan teknik ekstraksi DNA yang cepat dan akurat. Hal ini dikarenakan banyak lokasi hutan tanaman yang jauh dari fasilitas laboratorium; sedangkan informasi identitas suatu penyakit sangat diperlukan untuk menentukan langkah pengendalian dan pencegahan penyakit tanaman tersebut selanjutnya. Whatman International Ltd dari Flinders Associates Teknologi (Moscoso *et al.*, 2005); telah mematenkan kartu FTA yang dirancang untuk koleksi sampel di lapangan dan penyimpanan pada suhu kamar secara sederhana dan cepat (Crabbe, 2003). Selain itu penggunaan kartu FTA sebagai salah satu metode sampling sesuai dengan prinsip biosekuriti yaitu menyediakan cara yang lebih mudah untuk perpindahan sampel DNA dari satu tempat ke tempat yang lain tanpa resiko akan mencemari atau menyebarkan suatu penyakit tanaman tertentu kepada spesies pohon yang lain. Kartu FTA adalah alternatif yang potensial untuk metode konvensional karena kertas FTA mengandung bahan *chelators*, *denaturants*, dan

perangkap radikal bebas yang mampu menghambat enzim, mikroba dan bahan kimia yang dapat menurunkan DNA atau RNA dalam sampel jamur. Hal ini memungkinkan asam nukleat untuk disimpan pada suhu kamar untuk jangka waktu yang lama pada kartu FTA (Rogers dan Burgoyne, 1997).

Aplikasi kartu FTA untuk sampling DNA jamur yang terkait dengan penyakit tanaman dan hutan ini juga telah dilakukan (Suzuki *et al.*, 2006). Teknik ini tampaknya memiliki potensi untuk memfasilitasi pengambilan sampel DNA jamur khususnya di lokasi terpencil, meskipun beberapa jenis sel jamur mungkin tidak kompatibel. Hal ini karena sel jamur sangat beragam dan beberapa diantaranya mengalami penebalan, kurang rentan terhadap degradasi dan mungkin tidak mudah melepaskan DNA, contoh sel *teliospora* atau *sporocarps*.

Pengujian dilakukan pada bahan tanaman bergejala penyakit yaitu daun, kulit kayu dan akar. Kartu FTA digunakan untuk mengoleksi DNA langsung dari bahan tanaman yang terinfeksi (daun dan akar). Modifikasi, termasuk menggerus bahan dalam buffer sebelum ditetaskan ke kartu FTA diujikan pada material yang lebih keras termasuk biji dan akar. Pengetahuan tentang keterbatasan teknologi kartu FTA akan sangat berguna untuk koleksi DNA jamur patogen langsung dari bahan tanaman yang terinfeksi karena dapat mempercepat langkah-langkah identifikasi dengan menghindari prosedur laboratorium seperti pembuatan kultur dan metode ekstraksi DNA standar. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji kesesuaian teknologi kartu FTA sebagai salah satu cara untuk mengoleksi DNA jamur patogen dari

berbagai bahan tanaman yang terinfeksi penyakit.

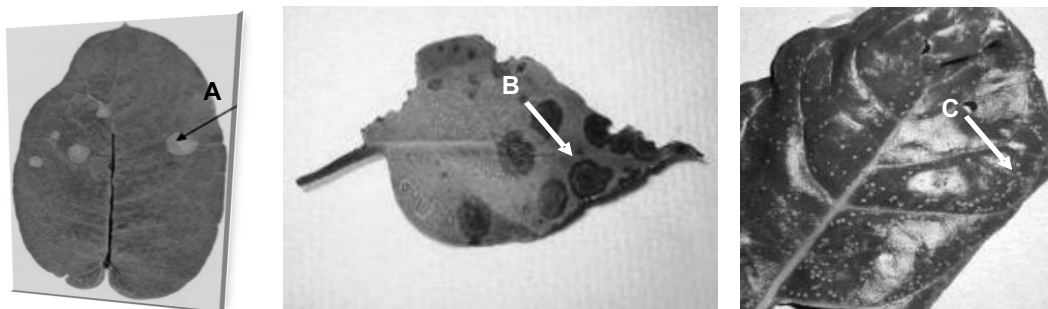
II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

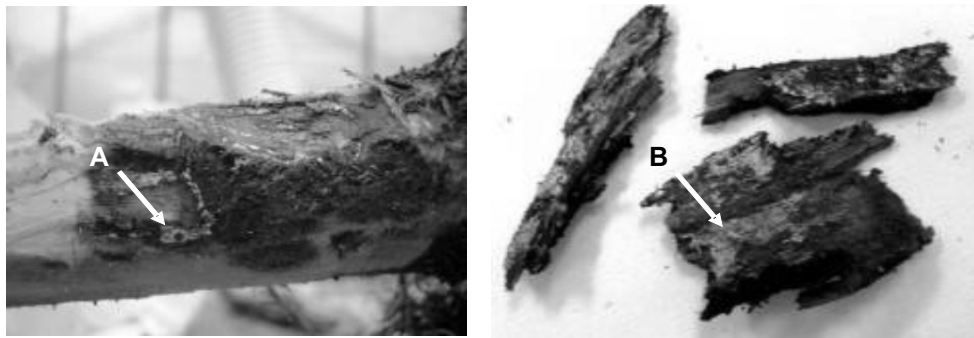
Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun, kulit kayu dan akar (Tabel 1). Daun *Eucalyptus globulus* dengan bintik-bintik karakteristik *Mycosphaerella* sp. (Gambar 1A) dan daun *Eucalyptus obliqua* yang terinfeksi *Aulographina eucalypti* (Gambar 1B); daun *Beta vulgaris* (silverbeet) terinfeksi dengan *Uromyces betae* (Gambar 1C); spesimen herbarium *Pinus radiata* jarum terinfeksi *Cyclaneusma* spp.; dan beberapa bilah rumput *Arrhenatherium elatius* var. *bulbosum* terinfeksi jamur karat. Sampel kulit kayu (Gambar 2A) diambil dari pohon yang mati oleh *Armillaria* dan sampel akar berasal dari akar pohon *Eucalyptus nitens* (Gambar 2B) yang telah diinokulasi dengan *Armillaria luteobubalina*. Ekstraksi DNA menggunakan metode *glassmilk* (Glen *et al.*, 2002) dari spesimen yang sama juga dilakukan sebagai pembanding. Sebagai kontrol positif untuk spesies-spesifik PCR digunakan isolat murni *Mycosphaerella cryptica* dan *Mycosphaerella nubilosa*.

Tabel 1. Daftar Sampel dan Metode Ekstraksi/Sampling yang digunakan

No.	Kode	Sampel	Metode Ekstraksi DNA
1	Euc A1	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA
2	Euc A2	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi
3	Euc A3	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Ekstraksi DNA metode glassmilk
4	Euc B1	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>A. eucalypti</i>)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA
5	Euc B2	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>A. eucalypti</i>)	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi
6	Euc B3	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>A. eucalypti</i>)	Ekstraksi DNA metode glassmilk
7	Sb1	Jamur karat (<i>U. betae</i>) pada <i>B. vulgaris</i>	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA
8	Sb2	Jamur karat (<i>U. betae</i>) pada <i>B. vulgaris</i>	Ekstraksi DNA metode glassmilk
9	Gr1	Jamur karat daun rumput (<i>A. elatius</i> var. <i>bulbosum</i>)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA
10	Gr2	Jamur karat daun rumput (<i>A. elatius</i> var. <i>bulbosum</i>)	Ekstraksi DNA metode glassmilk
11	Pn1	Daun Pinus	Daun kering digerus dalam buffer ekstraksi ditetaskan pada kartu FTA
12	Pn2	Daun Pinus	Ekstraksi DNA metode glassmilk
13	Ro1	Akar <i>E. nitens</i>	Akar digerus dalam buffer ekstraksi ditetaskan pada kartu FTA
14	Ro2	Akar <i>E. nitens</i>	Ekstraksi DNA metode glassmilk
15	Kk1	Miselium dari bag. bawah kulit kayu pohon	Miselium ditekan kuat-kuat di kartu FTA
16	Kk2	Miselium dari bag. bawah kulit kayu pohon	Ekstraksi DNA metode glassmilk



Gambar 1. A. Daun *Eucalyptus globulus* dengan bintik-bintik karakteristik *Mycosphaerella* sp.
B. Daun *Eucalyptus obliqua* yang terinfeksi *Aulographina eucalypti*
C. Daun *Beta vulgaris* (silverbeet) terinfeksi dengan *Uromyces betae*



Gambar 2 A. Akar *Eucalyptus nitens* memperlihatkan miselium warna putih karena infeksi *Armillaria* sp.
B. Kulit kayu yang terinfeksi *Armillaria luteobubalina*

B. Metode

Persiapan sampling menggunakan kartu FTA

Miselium yang terdapat di bagian akar dan bawah kulit kayu dikorek menggunakan pisau skalpel steril. Kumpulan miselium kemudian diusapkan dan ditekan-tekan pada kartu FTA hingga terjadi perubahan warna pada bagian yang ditemplei bagian tanaman tadi sebagai tanda bahwa kartu FTA telah mengikat DNA dari patogen tersebut. Hal yang sama dilakukan untuk sampel daun *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus obliqua*, *Beta vulgaris*, dan rumput *Arrhenatherium elatius* var. *bulbosum* dengan terlebih dulu memisahkan bagian yang terinfeksi jamur. Sampel duplikat diambil sebagai pembandingan dengan melakukan pencampuran antara bagian tanaman yang terinfeksi dan buffer ekstraksi *glassmilk*. Semua sampel termasuk akar dan daun pinus kering, digerus menggunakan mortar dan pestle kemudian dicampur dengan buffer ekstraksi sebanyak 200 uL; dan diinkubasi pada suhu kamar selama 1 jam. Setelah itu campuran buffer dan sampel diteteskan pada kartu FTA. Semua kartu dikeringkan pada suhu kamar. Tahapan selanjutnya adalah melakukan purifikasi DNA untuk sampel DNA yang telah terikat di kartu FTA.

Metode ekstraksi DNA glassmilk

Ekstraksi DNA menggunakan metode *glassmilk* (Glen *et al.*, 2002) digunakan sebagai metode ekstraksi DNA dasar untuk sampel jamur dan daun. Semua sampel ditimbang sebanyak 20-30 mg, digerus menggunakan mortar dan pestle (Pellet Pestle Kontes Motor) lalu dimasukkan ke dalam tabung *microcentrifuge* ukuran 1,5 mL. Buffer ekstraksi (Raeder dan Broda, 1985) ditambahkan (250 uL) dan sampel diinkubasi dalam penangas air (Grant Instrumen Cambridge Ltd Tipe 20) pada suhu 65°C selama 1 jam. Setelah itu sampel disentrifugasi (Sigma 1-13 B. Braun Biotech International) pada kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit. Tahapan selanjutnya adalah menyiapkan tabung *microcentrifuge* ukuran 1,5 mL yang bersih. Sebanyak 7 uL *glassmilk* (Boyle dan Lew, 1995), 800 uL NaI 1g/mL (BDH Kimia Australia) dan 200 uL supernatan ditambahkan dimasukkan ke dalam tabung dan dicampur sampai rata menggunakan Vortex (Yellowline TTS 2-Fisher Biotech Australia). Setelah itu tabung diinkubasi pada es selama 15 menit dan dicampur sesekali. Sampel disentrifugasi selama 10 detik, supernatan dibuang dan pelet disuspensikan dalam 800 uL larutan pencuci. Sampel disentrifugasi lagi

selama 10 detik, supernatan dibuang dan pelet kembali disuspensikan menggunakan larutan Etanol 100% (Univar-Ajax Finechem Australia, Analytical Grade) sebanyak 800 uL. Sampel disentrifugasi 10 detik, supernatan dibuang dan tabung dibalik untuk dikeringkan. Pelet kemudian disuspensikan dalam TE buffer sebanyak 25 uL dan diinkubasi pada suhu 45°C selama 10 menit sebelum disentrifugasi pada kecepatan 14.000 rpm selama 1-2 menit. Supernatan dipindahkan ke tabung 1,5 mL dan pengenceran 1/20 dilakukan sebelum sampel digunakan untuk PCR.

PCR

PCR dilakukan rangkap tiga menggunakan primer ITS yaitu ITS1 F, CTTG GTCA TTTA GAGG AAGT AA (Gardes and Bruns, 1993); ITS3, GCAT CGAT GAAG AACG CAGC dan ITS4, TCCT CCGC TTATT GATA TGC (White *et al.*, 1990). Nested PCR menggunakan primer

spesifik untuk *Mycosphaerella cryptica* dan *M. nubilosa* dilakukan menurut Glen dkk. (2007).

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

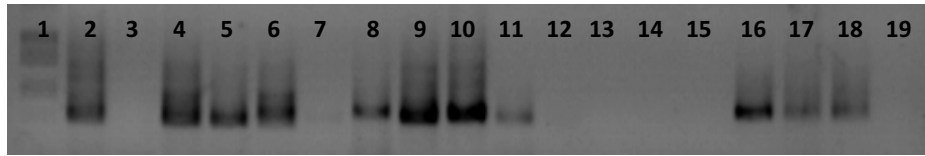
A. Hasil

DNA jamur berhasil diamplifikasi dari semua sampel daun yang diambil menggunakan metode pengambilan dengan kartu FTA. Sampel daun pinus yang terinfeksi *Cyclaneusma* sp dan akar *E. nitens* yang terinfeksi *Armillaria luteo-bubalina* digerus dan dicampur dengan buffer ekstraksi sebelum ditetaskan pada kartu FTA (Tabel 2). Tabel 2 memperlihatkan proporsi hasil PCR positif menggunakan primer spesifik jamur (F) dan primer general (G). Triplikasi PCR menggunakan primer spesifik jamur ITS1-F/ITS4 dan duplikasi menggunakan primer general ITS3/ITS4 dilakukan pada semua sampel DNA baik yang menggunakan kartu FTA, kartu FTA dan buffer serta metode *glassmilk*. DNA jamur berhasil diamplifikasi dari 3 kali ulangan

Tabel 2. Proporsi hasil PCR positif menggunakan primer spesifik jamur (F) dan primer general (G).

Kode	Sampel material	Jumlah Sampel	Kartu FTA		Kartu FTA + Buffer Ekstraksi		Glassmilk	
			F	G	F	G	F	G
EucA	Daun <i>Eucalyptus</i> (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	3	3/3	2/2	2/3	2/2	3/3	2/2
EucB	Daun <i>Eucalyptus</i> (terinfeksi <i>Aulographina eucalypti</i>)	3	3/3	2/2	2/3	1/2	2/3	1/2
Sb	Jamur karat (<i>U. betae</i>) pada <i>B. vulgaris</i>	2	2/2	2/2	TD ¹	TD	2/2	2/2
Gr	Jamur karat (undet.) daun rumput (<i>A. elatius</i> var. <i>bulbosum</i>)	2	2/2	2/2	TD	TD	2/2	2/2
Pn	Daun Pinus	2	TD	TD	1/2	1/2	1/2	1/2
Ro	Akar <i>E. nitens</i>	2	TD	TD	1/2	1/2	1/2	2/2
Kk	Miselium dari bag. bawah kulit kayu	2	2/2	2/2	TD	TD	2/2	2/2

¹TD berarti tidak dilakukan.

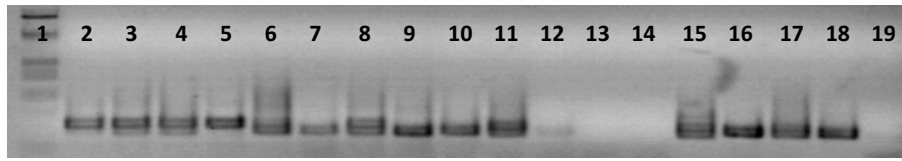


Gambar 3. Amplifikasi PCR dari salah satu ulangan menggunakan primer ITS1F/4. Kiri ke kanan: 1. DNA size marker; 2. Euc A1; 3. Euc A2; 4. Euc A3; 5. Euc B1; 6. Euc B2; 7. Euc B3; 8. Sb1; 9. Sb2; 10. Gr1; 11. Gr2; 12. Pn1; 13. Pn2; 14. Ro1; 15. Ro2; 16. Kk1; 17. Kk2; 18. Positif kontrol; 19. Negatif kontrol.

Tabel 3. Keseluruhan hasil amplifikasi sampel menggunakan primer ITS1F/4 dan ITS3/4

Sampel		Metode Ekstraksi DNA	Hasil PCR ¹					
Kode	Detil		ITS1 /ITS4			ITS3 / ITS4		
			1	2	3	1	2	
Euc A1	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	P	P	P	P	
Euc A2	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	N	P	P	P	P	
Euc A3	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Mycosphaerella</i> sp.)	Ekstraksi DNA metode glassmilk	P	P	P	P	P	
Euc B1	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Aulographina eucalypti</i>)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	P	P	P	P	
Euc B2	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Aulographina eucalypti</i>)	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	P	P	N	P	N	
Euc B3	Daun Eucalyptus (terinfeksi <i>Aulographina eucalypti</i>)	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	P	P	P	N	
Sb1	Jamur karat (<i>U. betae</i>) pada <i>B. vulgaris</i>	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	P	P	P	P	
Sb2	Jamur karat (<i>U. betae</i>) pada <i>B. vulgaris</i>	Ekstraksi DNA metode glassmilk	P	P	P	P	P	
Gr1	Jamur karat daun rumput (<i>A.elatius</i> var. <i>bulbosum</i>)	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	P	P	P	P	
Gr2	Jamur karat daun rumput (<i>A.elatius</i> var. <i>bulbosum</i>)	Ekstraksi DNA metode glassmilk	P	P	P	P	P	
Pn1	Daun Pinus	Daun kering digerus dalam buffer ekstraksi ditetaskan pada kartu FTA	N	N	P	N	P	
Pn2	Daun Pinus	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N	P	N	P	
Ro1	Akar <i>E. nitens</i>	Daun kering digerus dalam buffer ekstraksi ditetaskan pada kartu FTA	N	N	P	N	P	
Ro2	Akar <i>E. nitens</i>	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	P	N	P	P	
Kk1	Miselium dari bag. bawah kulit	Miselia ditekan kuat-kuat di kartu FTA	P	P	N	P	P	
Kk2	Miselium dari bag. bawah kulit kavu	Ekstraksi DNA metode glassmilk	P	P	P	P	P	

¹ P mengindikasikan amplifikasi fragmen pada $\pm 500 - 600$ bp untuk primer ITS1F/4 dan ± 300 bp untuk primer ITS3/4; N mengindikasikan tidak adanya amplifikasi fragmen.



Gambar 4. Amplifikasi PCR dari salah satu ulangan menggunakan primer ITS3/4. Kiri ke kanan: 1. DNA size marker; 2. Euc A1; 3. Euc A2; 4. Euc A3; 5. Euc B1; 6. Euc B2; 7. Euc B3; 8. Sb1; 9. Sb2; 10. Gr1; 11. Gr2; 12. Pn1; 13. Pn2; 14. Ro1; 15. Ro2; 16. Kk1; 17. Kk2; 18. Positif kontrol; 19. Negatif kontrol.

PCR menggunakan primer ITS1F/ITS4 dan ITS3/ITS4 untuk semua sampel daun. Hal yang berbeda terjadi pada sampel akar dan kulit kayu; tidak semua ulangan yang dicobakan mendapatkan hasil PCR yang positif. Detil dari seluruh hasil PCR disajikan pada Tabel 3.

Spesies spesifik dan Nested PCR

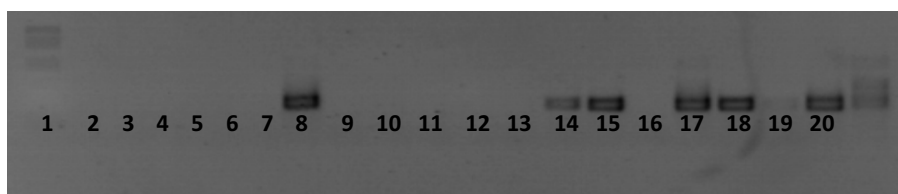
Nested PCR menggunakan primer spesifik untuk *Mycosphaerella cryptica* dan *M. nubilosa* dilakukan pada sampel daun *Eucalyptus*. Produk PCR pertama yang menggunakan primer ITS1-F/ITS4 digunakan dalam Nested PCR sebagai template DNA sebanyak 5 µl dari 1/5 dilusi yang dikombinasikan dengan primer McrypF/McrypR and MnubF/MnubR (Glen *et al.*, 2007). Hanya positif kontrol yang teramplifikasi menggunakan MnubF/MnubR (Tabel 4), tetapi beberapa hasil

positif didapatkan dari primer McrypF/McrypR (Tabel 4, Gambar 5).

B. Pembahasan

DNA jamur dari sampel daun, kulit kayu dan akar telah berhasil diamplifikasi menggunakan primer ITS1F/ITS4. Beberapa hasil negatif kemungkinan dikarenakan rendahnya kualitas dan kuantitas target DNA jamur patogen yang terikat ke kartu FTA. Selain itu kemungkinan juga adanya hambatan PCR; yang bisa jadi merupakan substansi yang menghambat proses PCR yang terdapat pada penebalan dinding sel jamur.

Daun, kulit kayu dan akar adalah bahan kompleks yang mengandung banyak mikro-organisme dan senyawa penghambat PCR dan keberhasilan mengikat DNA jamur dengan kartu



Gambar 5. Amplifikasi dari nested PCR menggunakan primer McrypF/McrypR pada sampel daun *Eucalyptus* di kartu FTA. Kiri ke kanan: 1. DNA marker; 2. Euc A1.1; 3. Euc A1.2; 4. Euc A1.3; 5. Euc A2.1; 6. Euc A2.2; 7. Euc A2.3; 8. Euc A3.1; 9. Euc A3.2; 10. Euc A3.3; 11. Euc B1.1; 12. Euc B1.2; 13. Euc B1.3; 14. Euc B2.1; 15. Euc B2.2; 16. Euc B2.3; 17. Euc B3.1; 18. Euc B3.2; 19. Euc B3.3; 20. Positif kontrol (DNA dari isolat murni *M. cryptica*).

Tabel 4. Daftar sampel daun *Eucalyptus* untuk nested PCR

Kode	Deskripsi	Metode ekstraksi DNA	Hasil PCR*	
			McrypF/ McrypR	MnubF/ MnubR
Euc A1.1	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	N	N
Euc A1.2	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	N	N
Euc A1.3	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
Euc A2.1	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	N	N
Euc A2.2	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	N	N
Euc A2.3	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
Euc A3.1	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	N
Euc A3.2	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	N	N
Euc A3.3	Daun <i>Eucalyptus</i> A	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
Euc B1.1	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	N
Euc B1.2	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	N	N
Euc B1.3	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
Euc B2.1	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	N
Euc B2.2	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	P	N
Euc B2.3	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
Euc B3.1	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun ditekan kuat-kuat pada kartu FTA	P	N
Euc B3.2	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Daun digerus dicampur dengan buffer ekstraksi	P	N
Euc B3.3	Daun <i>Eucalyptus</i> B	Ekstraksi DNA metode glassmilk	N	N
T2	<i>Mycosphaerella cryptica</i>	DNA tersedia	P	NT
T5	<i>Mycosphaerella nubilosa</i>	DNA tersedia	NT	P

* P mengindikasikan amplifikasi fragmen pada $\pm 500 - 600$ bp untuk primer McrypF/ McrypR dan primer MnubF/ MnubR. N mengindikasikan tidak adanya amplifikasi fragmen.

FTA sedikit bermasalah. Selain itu juga perlu diketahui bahwa bahan tanaman mengandung inhibitor PCR sehingga memerlukan prosedur khusus untuk meminimalkan komponen inhibitor tersebut (Pandey *et al.*, 1996, Tsai dan Olson, 1992). PCR inhibitor atau kuantitas DNA rendah harus diuji dalam penelitian yang lebih lanjut (misalnya dengan memasukkan IAC plasmid) dalam rangka untuk menyelidiki penyebab tidak teramplifikasinya DNA target.

Ketidakteraturan distribusi DNA target pada bagian tanaman yang terinfeksi juga bisa menjadi penyebab sedikit dan atau gagalnya kartu FTA mengikat DNA jamur tersebut. Ketika kartu FTA digunakan untuk pertama kalinya dengan jenis jaringan tertentu yang terinfeksi maka jumlah titik pengumpulan jaringan (seperti di tepi lesi) dapat ditentukan dengan melakukan serangkaian sampling. Ini akan membantu dengan masalah yang terlibat dalam sampel,

misalnya ketidakseragaman distribusi sel jamur dalam suatu bagian tanaman.

Nested PCR yang dilakukan dalam penelitian ini akan berguna bila terdapat DNA target berkualitas dan kuantitas rendah sehingga tidak teramplifikasi pada satu kali PCR menggunakan primer jamur universal. Penggunaan primer yang spesifik seperti dalam PCR untuk *Mycosphaerella* spp., memungkinkan untuk memperoleh *template* DNA dengan kuantitas dan kualitas yang lebih baik sehingga dapat diverifikasi sekuensing tanpa melakukan kloning. Beberapa sampel yang tidak memberikan produk positif pada PCR menggunakan primer ITS1F/ITS4 ternyata memberikan hasil positif pada PCR menggunakan primer ITS3/ITS4. Meskipun demikian, produk positif dari PCR primer ITS3/ITS4 belum tentu merupakan produk dari DNA jamur mengingat pasangan primer tersebut bukan primer yang secara spesifik mengidentifikasi spesies jamur.

Meskipun metode sampling dan ekstraksi DNA jamur patogen menggunakan kartu FTA dari jaringan tanaman terinfeksi masih memerlukan perbaikan, hasil positif menunjukkan bahwa DNA jamur patogen dapat diperoleh dengan relatif mudah secara langsung dari bagian tanaman terinfeksi dengan menekan bagian terinfeksi tersebut kuat-kuat ke kartu FTA. Perbaikan yang perlu dilakukan untuk mengoptimalkan pengikatan DNA target ke kartu FTA bukan berarti meniadakan kegunaan kartu FTA itu sendiri. Beberapa hal bisa dilakukan seperti misalnya penggunaan IAC plasmid untuk menentukan penyebab kegagalan PCR; menghancurkan sejumlah kecil bahan dalam tabung mikrosentrifuge berisi buffer ekstraksi sebelum

diaplikasikan ke kartu, pengenceran larutan sebelum aplikasi ke kartu, pengenceran dari DNA target yang terikat di kartu; menggunakan DNA polimerase yang berbeda; pengambilan sampel pada wilayah target yang berbeda, penggunaan primer yang berbeda yang secara khusus menargetkan kelompok jamur atau spesies; nested PCR atau kloning dan sekuensing. Pendekatan yang diambil akan tergantung pada prioritas yang diperlukan untuk deteksi atau identifikasi serta berapa banyak keuntungan penggunaan FTA untuk mengefisienkan biaya penelitian.

IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa kartu FTA berhasil mengikat DNA jamur patogen langsung dari bagian tanaman yang terinfeksi yaitu daun, kulit kayu dan akar. Optimalisasi metode untuk pengaplikasian pengambilan sampel perlu dilakukan demi memaksimalkan penggunaan kartu FTA sebagai salah satu metode pengambilan sampel dan ekstraksi DNA yang sederhana, cepat, akurat dan aman untuk lingkungan.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari serangkaian penelitian yang dilakukan penulis dalam menyelesaikan pendidikan S2 di University of Tasmania, Hobart, Australia dengan beasiswa dari John Allwright Fellowship. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Dr. Caroline Mohammed dan Dr. Morag Glen sebagai pembimbing tesis, seluruh rekan peneliti dan teknisi di kantor CSIRO Forestry di Hobart

Tasmania Australia, School of Agricultural Science University of Tasmania, Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan Yogyakarta terutama rekan-rekan Laboratorium Genetika Molekuler yang telah memberikan fasilitas dan membantu dalam melaksanakan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Boyle, J. S. & Lew, A. M. (1995). *An Inexpensive Alternative to Glassmilk for DNA Purification*. TIG, 11.
- Crabbe, M. J. C. (2003) A Novel Method for The Transport and Analysis of Genetic Material from Polyps and Zooxanthellae of Scleractinian Corals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **57**: 171-176.
- Eyles, A., Beadle, C., Barry, K., Francis, A., Glen, M. & Mohammed, C. (2008). Management Of Fungal Root-rot Pathogens In Tropical *Acacia mangium* Plantations. *Forest Pathology*, **Volume 38**, pages 332-355.
- Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS Primers With Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Applications to The Identification of Mycorrhiza and Rusts. *Molecular Ecology*, pg. 113-118.
- Glen, M., Smith, A. H., Langrell, S. R. H. & Mohammed, C. L. (2007) Development of Nested Polymerase Chain Reaction Detection of *Mycosphaerella* spp. and Its Application to the Study of Leaf Disease in *Eucalyptus* Plantations. *Phytopathology* **97**: 132-144.
- Glen, M., Tommerup, I. C., Bougher, N. L. & O'Brien, P. A. (2002). Are Sebacinaceae Common and Widespread Ectomycorrhizal Associates of *Eucalyptus* Species in Australian Forests? *Mychorriza*, **12**: 243-247.
- Hamelin, R. C., Berube, P., Gignac, M. & Bourassa, M. (1996). Identification of Root Rot Fungi in Nursery Seedlings by Nested Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **Vol. 62**, p. 4026-4031.
- Hoff, J. A., Klopfenstein, N. B., Tonn, J. R., McDonald, G. I., Zambino, P. J., Rogers, J. D., Peever, T. L. & Carris, L. M. (2004). Roles of Woody Root-Associated Fungi in Forest Ecosystem Processes: Recent Advances in Fungal Identification. Research Paper. RMRS-RP-47. Fort Collins, CO, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.
- Maxwell, A., Jackson, S. L., Dell, B. & Hardy, G. E. S. J. (2005). PCR-identification of *Mycosphaerella* Species Associated with Leaf Diseases of *Eucalyptus*. *Mycological Research*, **109**: p. 992-1004.
- Moscoso, H., Raybon, E. O., Thayer, S. G. & Hofacre, C. L. (2005). Molecular Detection and Serotyping of Infectious Bronchitis Virus from FTA(R) Filter Paper. *Avian Diseases*, **49**: 24-29.
- Pandey, R. N., Adams, R. P. & Flournoy, L. E. (1996) Inhibition of Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) by Plant Polysaccharides. *Plant Molecular Biology Reporter*, **14**: 17-22.

- Raeder, U. & Broda, P. (1985). Rapid Preparation of DNA from Filamentous Fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 17-20.
- Rogers, C. & Burgoyne, L. (1997). Bacterial Typing: Storing and Processing of Stabilized Reference Bacteria for PCR Without Preparing DNA-An Example of An Automated Procedure. *Analytical Biochemistry*, 247.
- Sankaran, K. V., Bridge, P. D. & Gokulapalan, C. (2005). Ganoderma Diseases of Perennial Crops In India-An Overview. *Mycopathologia*, **Volume 159**, pg. 143-152.
- Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K. I. & Kashiwagi, Y. (2006). High-throughput Genotyping of Filamentous Fungus *Aspergillus oryzae* Based on Colony Direct Polymerase Chain Reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **102**: 572-574.
- Tsai, Y. L. & Olson, B. H. (1992). Rapid Method for Separation of Bacterial DNA from Humic Substances in Sediments for Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 2292 - 2295.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Analysis of Phylogenetic Relationships by Amplification and Direct Sequencing of Ribosomal RNA Genes. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, New York, Academic Press.