

KARAKTERISASI SIDIK JARI DNA ISOLAT *Corynespora cassiicola* YANG BERASAL DARI BERBAGAI SENTRA PERKEBUNAN KARET INDONESIA

*Characterization of DNA Finger Printing of Corynespora cassiicola
Isolates from Different Regions of Rubber Plantation*

Fetrina OKTAVIA, M. MUNIR, H. SURYANINGTYAS, dan KUSWANHADI
Balai Penelitian Sembawa, Pusat Penelitian Karet
Jalan Raya Palembang – P. Balai KM 29, PO BOX 1127 Palembang 30001

Diterima tgl. 19 September 2011/Disetujui 15 Oktober 2011

Abstract

One of the important steps to obtain a superior clone resistant to *Corynespora Leaf Fall Disease (PGDC)* is a selection test of resistance of rubber clones to *Corynespora cassiicola* fungi. To obtain a good result, genetic information of *C. Cassiicola* isolates used is needed. DNA finger printing of seven *C. cassiicola* isolates have been done by using RAPD technique. *C. cassiicola* isolates were isolated from rubber clone of GT 1 derived from seven regions of rubber plantation in Indonesia i.e Bengkulu (CBK), Lampung (CLP), West Kalimantan (CKB), Central Java (CJT), South Sumatra (CSS), Jambi (CJB) and North Sumatra (CSU). The result of RAPD analysis by using 15 primers showed that the genetic diversity of seven *C. cassiicola* isolates was high (89.3%). The genetic similarity value amongs the isolates had a variation, of which the highest genetic similarity was found between South Sumatra and Jambi isolates (68.49%), and the lowest was between Lampung and South Sumatra (51.09%). The UPGMA analysis showed that the isolates were separated into four groups. It was concluded that 10 of 15 primers used i.e OPN-04, OPN-05, OPN-11, OPN-12, OPN-19, OPN-20, OPH-04, OPH-09, OPH-12 and OPH-16 could produce a different specific pattern in each of seven isolates. Therefore this technique could be used as an alternative method for the identification of *C. cassiicola* isolates.

Keywords: *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, genetic analysis, RAPD, primer, UPGMA, leaf fall disease

Abstrak

Salah satu tahapan penting untuk mendapatkan klon unggul yang tahan terhadap Penyakit Gugur Daun *Corynespora (PGDC)* adalah uji ketahanan klon-klon karet terhadap serangan jamur *Corynespora cassiicola*. Untuk mendapatkan hasil yang tepat, diperlukan informasi genetik dari isolat *C. cassiicola* yang digunakan. Analisis sidik jari DNA dari tujuh isolat *C. cassiicola* sudah dilakukan dengan menggunakan teknik RAPD. Isolat *C. cassiicola* diisolasi dari klon karet GT 1 di tujuh sentra perkebunan karet di Indonesia yaitu Bengkulu (CBK), Lampung (CLP), Kalimantan Barat (CKB), Jawa Tengah (CJT), Sumatera Selatan (CSS), Jambi (CJB) dan Sumatera Utara (CSU). Hasil analisis RAPD menggunakan 15 primer menunjukkan bahwa keragaman genetik tujuh isolat *C. cassiicola* cukup tinggi (89,3%). Nilai kesamaan genetik antara isolat bervariasi, dimana kesamaan genetik tertinggi ditemukan antar isolat Sumatera Selatan dengan Jambi yaitu (68,49%) dan kesamaan terendah antara isolat Lampung dengan Sumatera Selatan (51,09%). Analisis UPGMA menunjukkan isolat terbagi ke dalam empat kelompok. Dari 15 primer yang digunakan, 10 primer yaitu OPN-04, OPN-05, OPN-11, OPN-12, OPN-19, OPN-20, OPH-04, OPH-09, OPH-12 dan OPH-16 mampu menghasilkan pola spesifik pada masing-masing isolat, sehingga dapat digunakan sebagai metode identifikasi alternatif.

Kata kunci: *Hevea brasiliensis*, *Corynespora cassiicola*, analisis genetik, seleksi klon, RAPD, primer, isolat, UPGMA, penyakit gugur daun

PENDAHULUAN

Salah satu tujuan program pemuliaan tanaman karet adalah menghasilkan klon-klon unggul yang memiliki produksi tinggi dan tahan terhadap penyakit, antara lain terhadap Penyakit Gugur Daun *Corynespora* (PGDC) yang disebabkan oleh jamur *Corynespora cassiicola*. PGDC menyerang tanaman karet pada semua tingkatan umur, baik pada tanaman di pembibitan maupun tanaman menghasilkan. Serangan PGDC mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan dan terjadinya penurunan produksi yang cukup signifikan sehingga secara ekonomi sangat merugikan.

Pengendalian PGDC secara kimiawi dirasakan kurang efektif, karena selain berdampak negatif terhadap lingkungan juga memerlukan biaya yang cukup mahal. Salah satu alternatif yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan cara penanaman klon-klon yang tahan terhadap penyakit tersebut, sehingga seleksi klon-klon karet yang tahan perlu dilakukan.

Proses seleksi resistensi klon terhadap PGDC sudah dimulai sejak tahap awal persilangan, yaitu dengan memilih tetua yang memiliki resistensi tinggi. Seleksi lanjutan dilakukan terhadap genotipe-genotipe baru hasil persilangan dengan cara pengujian di tingkat laboratorium, kebun kayu okulasi/entres sampai tanaman menghasilkan. Dari pengujian ini ditemukan genotipe-genotipe baru yang memiliki produksi tinggi dan tahan terhadap PGDC. Ada kalanya dari pengujian ditemukan suatu genotipe baru tahan terhadap serangan PGDC pada suatu lokasi, namun tidak tahan bila diuji di lokasi yang berbeda. Selain itu tingkat ketahanan suatu klon terhadap serangan PGDC juga berbeda antar daerah. Hal ini diduga terjadi karena adanya perbedaan ras dari isolat *C. cassiicola* yang menyerang.

C. cassiicola memiliki miselium berwarna coklat kegelapan dan merupakan jamur patogen yang termasuk dalam famili *Denticeae* dan genus *Corynespora*. Jamur ini sudah tersebar di lebih dari 70 negara. Jamur ini tidak hanya menyerang tanaman karet, tapi juga tanaman lainnya dimana sudah tercatat lebih dari 280 spesies

tanaman yang meliputi buah-buahan, sayur-sayuran, dan tanaman kehutanan yang terinfeksi jamur tersebut (Farr *et al.*, 2007). Pada tanaman karet, serangan *C. cassiicola* diketahui pertama kali pada tahun 1936 di Sierra Leone, Afrika Barat, dan menyerang perkebunan karet di Indonesia pada tahun 1980. Daerah yang pernah mengalami serangan berat *C. cassiicola* yaitu Sumatera Utara, Sumatera Selatan, Jawa Barat, dan Jawa Tengah (Situmorang *et al.*, 1996).

Salah satu faktor yang mempengaruhi cepatnya penyebaran jamur *C. cassiicola* adalah kemampuan patogen tersebut membentuk ras baru yang lebih virulen (Situmorang *et al.*, 1996). Klon-klon karet akan memberikan reaksi yang berbeda pada masing-masing ras tersebut. Perbedaan ras dari isolat *C. cassiicola* dapat ditentukan dengan melihat perbedaan morfologi koloninya, bentuk dan ukuran konidia, tingkat patogenisitas dan perbedaan genetik (Darmono *et al.*, 1996; Nghia *et al.*, 2008; Shimomoto *et al.*, 2011). Perbedaan secara morfologi memiliki kelemahan, karena adanya faktor pengaruh lingkungan yang dapat menyebabkan perubahan morfologi. Alternatif terbaik adalah dengan melihat perbedaan genetik yang bebas dari pengaruh lingkungan.

Perbedaan genetik antar isolat dapat terjadi karena adanya mutasi, substitusi, insersi, dan delesi pada materi genetik suatu isolat. Analisis perbedaan genetik suatu patogen dapat dilakukan dengan mengamati sidik jari DNA (*DNA finger printing*) dari masing-masing isolat dengan menggunakan marka molekuler. Prinsip dasar dari sidik jari DNA tersebut adalah perbedaan pola-pola *fragment* DNA yang dihasilkan (Weising *et al.*, 2005).

Analisis molekuler terhadap variasi genetik isolat *C. cassiicola* yang diisolasi dari tanaman karet dari berbagai lokasi sudah banyak dilakukan seperti analisis isolat yang diisolasi dari perkebunan karet di Srilanka dan Australia dengan menggunakan teknik rDNA-ITS dan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Silva *et al.*, 1998), di Malaysia dengan menggunakan teknik RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), rDNA-ITS (Atan dan Hamid, 2003) dan ISSR (Nghia *et al.*,

2008), di Cina dengan menggunakan teknik rDNA-ITS (rDNA-*Internal Transcribed Spacer*) dan ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) (Qi *et al.*, 2009, 2010) serta di Jepang dengan menggunakan teknik RAPD (Shimomoto *et al.*, 2011). Untuk Indonesia, analisis isolat *C. cassiicola* dari beberapa sentra perkebunan karet sudah pernah dilakukan oleh Darmono *et al.* (1996) dan Situmorang (2002) dengan menggunakan teknik RAPD, namun belum terlihat perbedaan genetiknya, sehingga belum dapat digunakan untuk karakterisasi masing-masing isolat. Dengan menggunakan primer yang lebih banyak diharapkan perbedaan genetik antar isolat dapat diperoleh, sehingga dapat dijadikan sebagai alat identifikasi strain isolat yang menyerang suatu klon.

Penelitian ini bertujuan untuk melihat sidik jari DNA tujuh isolat *C. cassiicola* asal klon GT 1 dari beberapa sentra perkebunan karet di Indonesia. Sidik jari tersebut dapat digunakan untuk membedakan masing-masing isolat tersebut sehingga seleksi klon unggul tahan terhadap penyakit gugur daun *Corynespora* dapat dilakukan lebih tepat.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Isolat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Fisiologi, Balai Penelitian Sembawa dari bulan Januari - Juni 2011. Penelitian menggunakan tujuh isolat *C. cassiicola* yang diisolasi dari klon karet GT 1 tahun tanam 2000 di beberapa sentra perkebunan di Indonesia (Tabel 1). Isolat ditumbuhkan dalam media PDA (*Potato Dextrose Agar*) (500 mL ekstrak kentang, 10 g dekstrosa, 15 g agar, 500 ml aquades) selama 10 hari, kemudian diambil 1 potong (0,5 mm) masing-masing biakan dan dimasukkan ke dalam 100 ml media PDA cair (500 mL ekstrak kentang, 30 g sukrosa, 500 ml aquades). Biakan diinkubasi selama 10 hari pada 24°C dan dikocok dengan kecepatan 200 rpm.

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan metode CTAB yang

dimodifikasi oleh Situmorang (2002). Miselia diambil dari isolat dan dicuci dua kali dengan air steril menggunakan penyaring dua lapis kain kasa. Satu gram miselium digerus dengan nitrogen cair. Tepung miselium dimasukkan ke dalam tabung sentrifus berukuran 16 ml yang berisi *buffer* ekstraksi [12,6 ml NaCl 5 M, 2 ml EDTA 0,5 M (pH 8), 5 ml Tris HCl 1 M (pH 8), 10 ml CTAB 10%, 20,4 ml akuabides]. Campuran dikocok dengan vorteks kemudian diinkubasi pada 65°C selama 30 menit. Ke dalam campuran ditambahkan lagi larutan PCI (*Phenol : chloroform : isoamil alkohol* = 25 : 24 : 1), divorteks dan disentrifus dengan kecepatan 11 000 rpm selama 15 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru, kemudian ditambahkan larutan CI (*chloroform : isoamil alkohol* = 24 : 1) dan disentrifus dengan kecepatan 11 000 rpm selama 5 menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke dalam tabung baru kemudian ditambahkan isopropanol dingin, digoyang pelan kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* pada suhu 4°C selama 30 menit. Larutan disentrifus dengan kecepatan 11 000 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan etanol 70% dingin dan disentrifus dengan kecepatan 11 000 rpm selama 15 menit, kemudian dikeringkan. Pelet DNA yang diperoleh dilarutkan dalam 1 ml *buffer* TE [Tris HCl 10 mM (pH 8.0), EDTA 1 mM] dan disimpan pada suhu 4°C.

Amplifikasi PCR

Amplifikasi PCR dilakukan menurut metode William *et al.* (1990) dengan menggunakan 15 primer acak (OPN-04, 05, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 19, 20, OPH-04, 08, 09, 12, dan 16) yang berasal dari OPERON Technology. PCR dilakukan dalam volume 25 L yang terdiri atas 2,5 L DNA *template* 25 ng/L, 2,5 L *buffer* 10X + MgCl₂, 2,5 L dNTP 10 mM, 0,5 L taq DNA *polymerase* 5 U/L, 1 L primer 10 mM dan 18,3 L ddH₂O. Reaksi dilakukan dengan menggunakan mesin PCR T-Personal Biometra (Jerman) dengan kondisi program 45 siklus yang terdiri atas denaturasi selama 1 menit pada suhu 95°C, *annealing* 1 menit pada suhu 53°C dan *extension* selama 2 menit pada suhu 72°C. Siklus terakhir diikuti dengan inkubasi selama 4 menit pada suhu 72°C.

Tabel 1. Daerah asal dan kode isolat yang dianalisis
 Table 1. Origin and code of the analyzed isolates

No	Isolat <i>Isolate</i>	Asal Wilayah <i>Origin</i>	Kode Isolat <i>Isolate Code</i>
1	<i>Corynespora cassiicola</i>	Bengkulu	CBK
2	<i>Corynespora cassiicola</i>	Lampung	CLP
3	<i>Corynespora cassiicola</i>	Kalimantan Barat	CKB
4	<i>Corynespora cassiicola</i>	Jawa Tengah	CJT
5	<i>Corynespora cassiicola</i>	Sumatera Selatan	CSS
6	<i>Corynespora cassiicola</i>	Jambi	CJB
7	<i>Corynespora cassiicola</i>	Sumatera Utara	CSU

Hasil amplifikasi DNA dianalisis dengan menggunakan 1% gel agarose dalam 1X *buffer* TAE (0,04 M Tris-acetic dalam 1 mM EDTA). Gel diwarnai dengan menggunakan ethidium bromide (Sambrook *et al.*, 1989). Selanjutnya gel difoto di bawah UV transiluminator.

Analisis Data RAPD

Analisis keragaman genetik isolat *C. cassiicola* dilakukan dengan membuat skor terhadap pita-pita DNA yang dihasilkan. Berdasarkan hasil penskoran disusun dendrogram dengan menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multi-variate Analysis System* (NTSYS-pc) versi 1.8 (Rohlf, 1993). Koefisien kesamaan genetik dan jarak genetik dianalisis dengan analisis gerombol yang digunakan untuk menentukan matrik jarak genetik berdasarkan metode *Unweighed Pair-Group Averages* (UPGMA). Karakterisasi genetik isolat *C. cassiicola* dilakukan secara visual dengan memperhatikan pola pita DNA yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

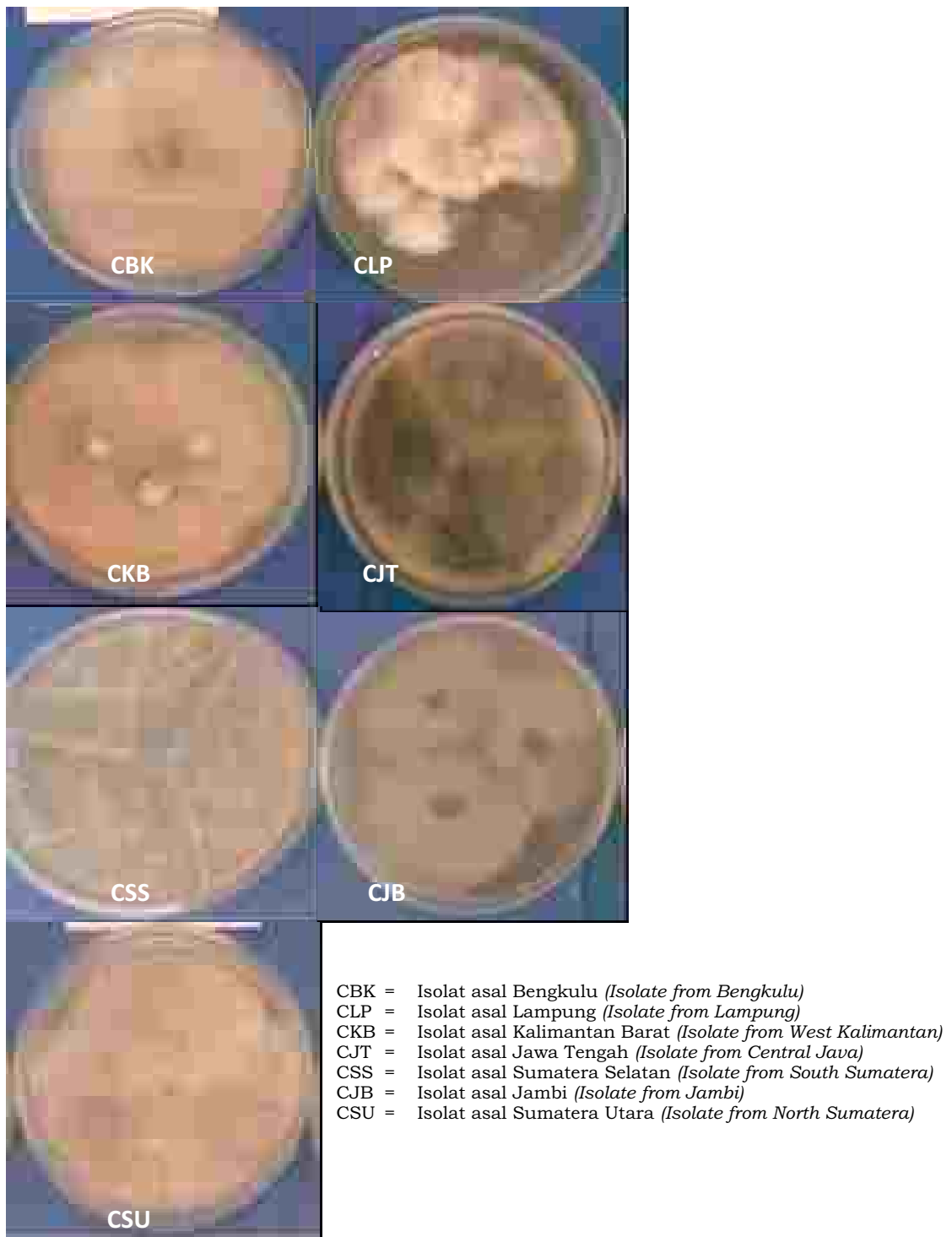
Identifikasi Morfologi

Salah satu cara untuk mengidentifikasi isolat *C. Cassiicola* adalah dengan melihat perbedaan morfologi koloni yang dihasilkan. Dari tujuh isolat yang dianalisis, ditemukan perbedaan pada bentuk, tekstur, dan warna miselium dari masing-masing isolat. Pada isolat CBK dan

CSU, koloni miselium berbentuk bulat dengan pinggiran rata, tekstur miselium seperti kapas (*cottony*), dan berwarna putih. Meskipun bentuk dan tekstur miselium sama dengan isolat CBK dan CSU, warna isolat CKB, CJB dan CJT berbeda, dimana isolat CKB berwarna putih agak gelap, CJB gelap kehitaman dan CJT awalnya berwarna putih dan menjadi gelap seiring dengan bertambahnya umur kultur. Isolat CSS berbentuk bulat dengan pinggiran rata, tekstur miselium *stelite*, warna miselium pada awal inokulasi putih dan seiring bertambahnya umur kultur isolat, warna koloni miselium menjadi gelap atau hitam. Berbeda dengan bentuk keenam isolat lainnya, bentuk isolat CLP tidak beraturan, tekstur seperti kapas dan berwarna putih (Gambar 1).

Perbedaan morfologi antar ketujuh isolat yang diamati tidak berhubungan dengan kedekatan asal geografis, seperti isolat CSS dan CJB yang secara geografis cukup dekat, namun memiliki perbedaan pada tekstur miselium atau CKB dan CSU yang secara geografis cukup jauh tetapi memiliki kesamaan pada bentuk, tekstur dan warna *miselum*. Hal yang sama juga dilaporkan oleh Darmono *et. al* (1996), dimana perbedaan morfologi isolat *C. cassiicola* tidak berhubungan dengan asal klon dan geografis.

Salah satu permasalahan yang dihadapi pada identifikasi isolat berdasarkan perbedaan morfologi adalah perubahan warna miselium akibat perubahan waktu kultur. Hal ini merupakan salah satu kelemahan identifikasi



Gambar 1. Morfologi koloni tujuh isolat *C. cassiicola*
Figure 1. Morphology of colony of seven *C. cassiicola* isolates

berdasarkan morfologi karena adanya pengaruh lingkungan yang dapat mengakibatkan perubahan.

Identifikasi Molekuler

Keragaman genetik isolat *C. cassiicola*

Hasil analisis RAPD tujuh isolat *C. cassiicola* yang diisolasi dari klon karet GT 1 dari tujuh sentra perkebunan karet di Indonesia yang diuji dengan 15 primer acak terpilih menunjukkan bahwa polimorfisme DNA ketujuh isolat tersebut cukup tinggi yaitu 89,3% (Tabel 2). Tingginya polimorfisme DNA yang dihasilkan menunjukkan bahwa keragaman genetik ketujuh isolat tersebut cukup tinggi. Polimorfisme merupakan gambaran amplifikasi yang diperoleh dari perbedaan fragmen DNA yang diamati dan diskor sebagai ada tidaknya perbedaan sekuen, sehingga menunjukkan adanya variasi (Oktavia *et al.*, 2009). Jumlah pita DNA yang dihasilkan oleh masing-masing primer berkisar 5 - 14 pita yang berukuran 150 - 10 000 bp (Tabel 2). Setiap pita DNA mewakili karakter molekuler yang bersifat spesifik karena merupakan hasil pelipatgandaan satu potongan DNA, namun pita tersebut tidak dapat secara otomatis dianggap berasosiasi dengan sifat tertentu kecuali jika dapat dibuktikan dengan hasil analisis keterpautan (Darmono *et al.*, 1996).

Dari dendrogram yang disusun berdasarkan polimorfisme pita-pita DNA yang dihasilkan terlihat bahwa pada kesamaan genetik 66% terbentuk 4 kelompok isolat dimana kelompok pertama terdiri dari isolat yang berasal dari Bengkulu (CBK), kelompok kedua terdiri dari isolat Lampung (CLP) dan Sumatera Utara (CSU), kelompok ketiga terdiri dari isolat Kalimantan Barat (CKB), Sumatera Selatan (CSS) dan Jambi (CJB), serta kelompok keempat terdiri dari isolat Jawa Tengah (CJT).

Matrik kesamaan genetik menunjukkan proporsi pita DNA yang sama-sama dimiliki oleh masing-masing isolat. Proporsi kepemilikan pita DNA ini akan menentukan persentase kesamaan genetik antar isolat. Kesamaan genetik tertinggi ditemukan antar

isolat Sumatera Selatan dan Jambi yaitu 0,6849 (68,49%) dan kesamaan terendah antara isolat Lampung dan Sumatera Selatan yaitu 0,5109 (51,09%) (Tabel 3). Dari hasil analisis tersebut terlihat bahwa tingkat kesamaan genetik masing-masing isolat tidak semuanya tergantung kepada kedekatan lokasi geografis (Gambar 2). Hal yang sama juga ditemukan pada analisis isolat *C. cassiicola* dari sentra perkebunan karet di Malaysia dan Cina.

Sidik Jari DNA Isolat *C. cassiicola* untuk Identifikasi Ras

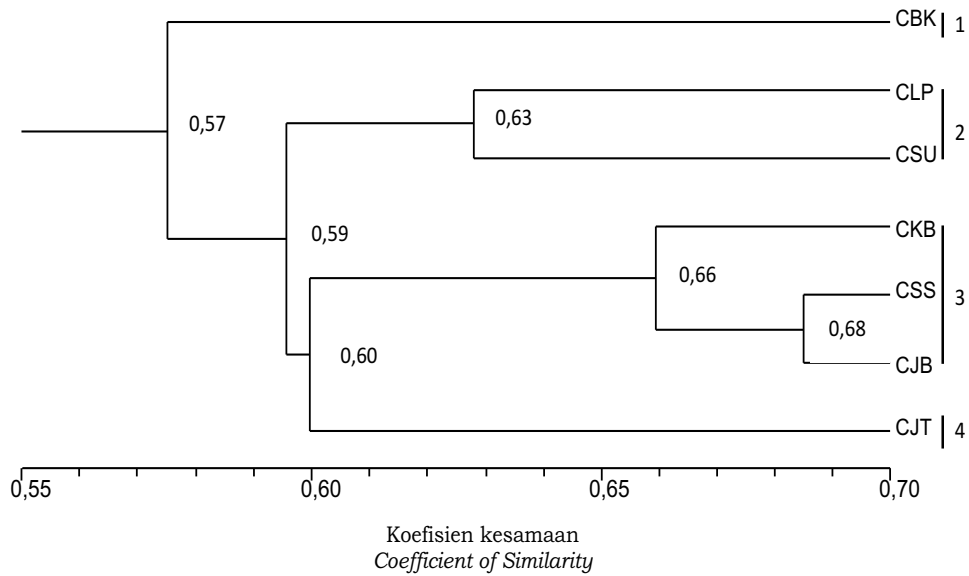
Identifikasi isolat *C. cassiicola* secara molekuler memberikan hasil yang lebih tepat dibandingkan dengan identifikasi secara morfologi, karena identifikasi DNA tidak dilakukan terhadap produk-produk hasil genom dan tidak terpengaruh oleh kondisi lingkungan. Berdasarkan sidik jari DNA yang dihasilkan dari hasil analisis RAPD, maka isolat dapat dibedakan satu sama lain.

Dari 15 primer yang digunakan untuk analisis sidik jari DNA 7 isolat *C. cassiicola*, 10 primer mampu menghasilkan pola pita DNA yang spesifik pada masing-masing isolat, sementara 5 primer lainnya hanya menghasilkan 2 - 5 pola pita. Primer yang memberikan pola pita spesifik yaitu OPN-04, OPN-05, OPN-11, OPN-12, OPN-19, OPN-20, OPH-04, OPH-09, OPH-12 dan OPH-16. Kesepuluh primer tersebut dapat digunakan untuk membedakan isolat *C. cassiicola* yang berasal dari Bengkulu, Lampung, Kalimantan Barat, Jawa Tengah, Sumatera Selatan, Jambi dan Sumatera Selatan.

Gambar 3 menunjukkan hasil amplifikasi DNA tujuh isolat *C. cassiicola* yang menghasilkan pola spesifik pada masing-masing isolat dengan menggunakan 10 primer. Jumlah pita DNA yang dihasilkan dari amplifikasi masing-masing primer bervariasi, dimana pada primer OPN-04 berkisar 4 - 8 pita (Gambar 3A), OPN-05 2-6 pita per isolat (Gambar 3B), OPN-11 2-9 pita per isolat (Gambar 3C), OPN-12 2 - 4 pita (Gambar 3D), OPN-19 3 - 7 pita (Gambar 3E), OPN-20 7 - 10 pita (Gambar 3F), OPH-04 4 - 5 pita (Gambar 3G), OPH-09 4 - 9 pita (Gambar 3H), OPH-12 2 - 7 pita (Gambar 3I) dan OPH-16 2 - 6 pita (Gambar 3J).

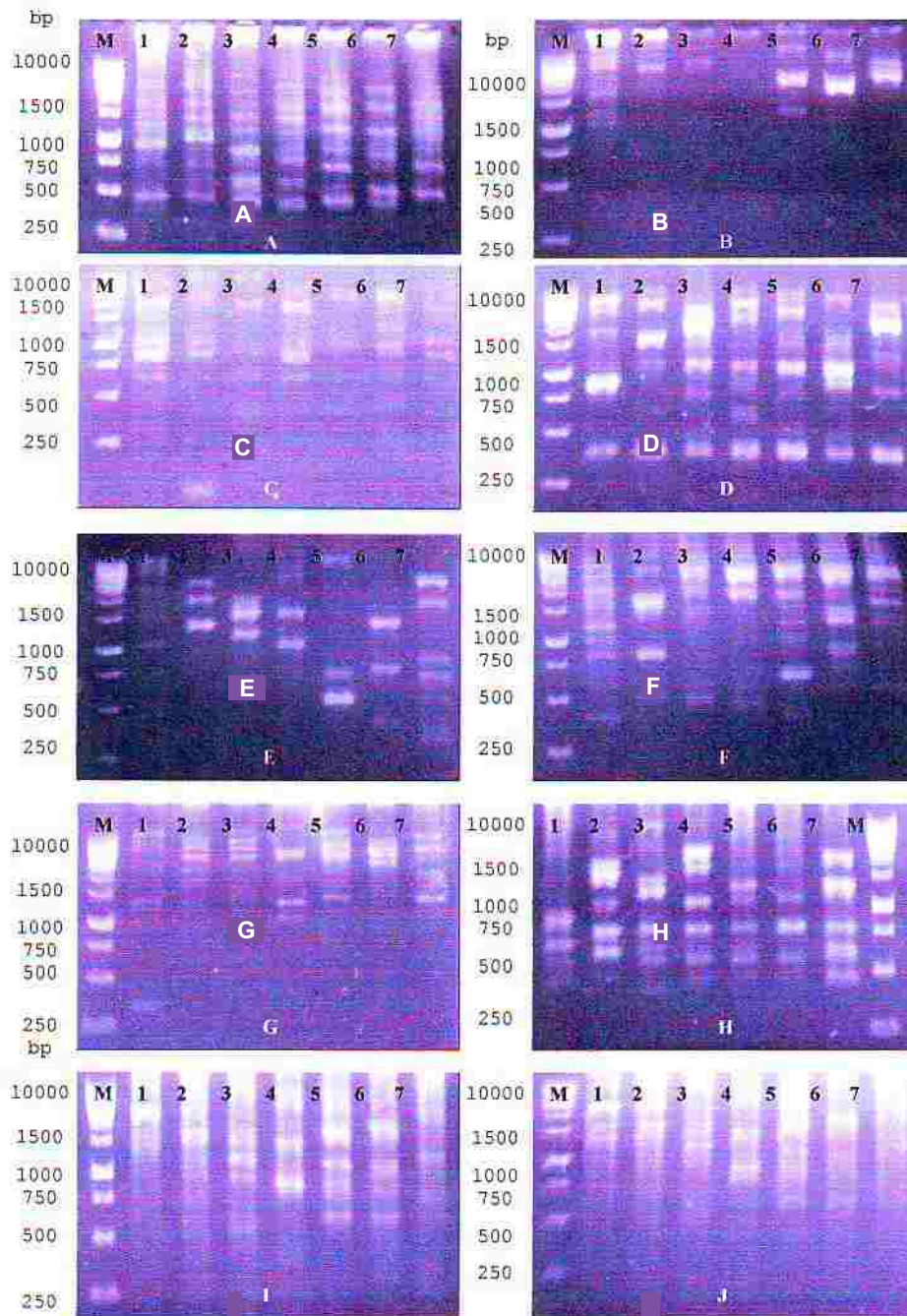
Tabel 2. Sekuen nukleotida primer RAPD dan jumlah pita DNA yang dihasilkan
 Table 2. RAPD primer nucleotide sequence and number of DNA fragment produced

No	Primer Primer	Sekuen primer 5' → 3' Sequence of primer	Jumlah pita DNA Number of DNA fragments		
			Total	Polimorfik Polymorphic	Persentase pita polimorfik Percentage of polymorphic fragment (%)
1	OPN-04	GACCGACCCA	12	11	91,7
2	OPN-05	ACTGAACGCC	8	7	87,5
3	OPN-11	TCGCCGCAA	11	11	100
4	OPN-12	CACAGACACC	7	6	85,7
5	OPN-14	TCGTGCGGGT	8	8	100
6	OPN-15	CAGCGACTGT	7	3	42,9
7	OPN-17	CATTGGGGAG	5	5	100
8	OPN-18	GGTGAGGTCA	7	2	28,6
9	OPN-19	GTCCGTA CTG	13	13	100
10	OPN-20	GGTGCTCCGT	14	14	100
11	OPH-04	GGAAGTCGCC	11	11	100
12	OPH-08	GAAACACCCC	7	4	57,1
13	OPH-09	TGTAGCTGGG	12	12	100
14	OPH-12	ACGCGCATGT	7	7	100
15	OPH-16	TCTCAGCTGG	10	10	100



CBK = Isolat asal Bengkulu (Isolate from Bengkulu)
 CLP = Isolat asal Lampung (Isolate from Lampung)
 CKB = Isolat asal Kalimantan Barat (Isolate from West Kalimantan)
 CJT = Isolat asal Jawa Tengah (Isolate from Central Java)
 CSS = Isolat asal Sumatera Selatan (Isolate from South Sumatera)
 CJB = Isolat asal Jambi (Isolate from Jambi)
 CSU = Isolat asal Sumatera Utara (Isolate from North Sumatera)

Gambar 2. Koefisien kesamaan genetik tujuh isolat *C. cassicola*
 Figure 2. Coefficient of genetic similarity of seven *C. cassicola* isolates



M= Marker 1 kb Ladder

1. CBK= Isolat asal Bengkulu (*Isolate from Bengkulu*)
2. CLP = Isolat asal Lampung (*Isolate from Lampung*)
3. CKB= Isolat asal Kalimantan Barat (*Isolate from West Kalimantan*)
4. CJT = Isolat asal Jawa Tengah (*Isolate from Central Java*)

5. CSS = Isolat asal Sumatera Selatan (*Isolate from South Sumatra*)
6. CJB = Isolat asal Jambi (*Isolate from Jambi*)
7. CSU = Isolat asal Sumatera Utara (*Isolate from North Sumatra*)

Gambar 3. Amplifikasi PCR yang menghasilkan pola spesifik pada tujuh isolat *C. cassiicola* dengan menggunakan primer OPN-04 (A), OPN-05 (B), OPN-11 (C), OPN-12 (D), OPN-19(E), OPN-20 (F), OPH-04 (G), OPH-09 (H), OPH-12 (I) dan OPH-16 (J).

Figure 3. PCR amplification yielding specific pattern on seven *C. cassiicola* isolates by using OPN-04 (A), OPN-05 (B), OPN-11 (C), OPN-12 (D), OPN-19 (E), OPN-20 (F), OPH-04 (G), OPH-09 (H), OPH-12 (I) and OPH-16 (J) primers

Tabel 3. Koefisien kesamaan genetik tujuh isolat *C. cassiicola*
 Table 3. Genetic similarity coefficient among seven *C. cassiicola* isolates

Isolat <i>Isolate</i>	CBK	CLP	CKB	CJT	CSS	CJB	CSU
CBK	1,0000						
CLP	0,5735	1,0000					
CKB	0,5890	0,5455	1,0000				
CJT	0,5793	0,6107	0,5816	1,0000			
CSS	0,5695	0,5109	0,6667	0,5890	1,0000		
CJB	0,6207	0,6565	0,6525	0,6286	0,6849	1,0000	
CSU	0,5185	0,6281	0,5649	0,5846	0,6471	0,6462	1,0000

CBK = Isolat asal Bengkulu (*Isolate from Bengkulu*)

CLP = Isolat asal Lampung (*Isolate from Lampung*)

CKB = Isolat asal Kalimantan Barat (*Isolate from West Kalimantan*)

CJT = Isolat asal Jawa Tengah (*Isolate from Central Java*)

CSS = Isolat asal Sumatera Selatan (*Isolate from South Sumatera*)

CJB = Isolat asal Jambi (*Isolate from Jambi*)

CSU = Isolat asal Sumatera Utara (*Isolate from North Sumatera*)

Hasil amplifikasi DNA dengan 5 primer yang tidak menghasilkan pola spesifik pada semua isolat dapat dilihat pada Gambar 4. Amplifikasi DNA dengan primer OPN-14 menghasilkan 4 pola berbeda dengan jumlah pita DNA 0 - 7 per isolat. Pola pertama ditemukan pada isolat yang berasal dari Bengkulu, pola kedua pada isolat yang berasal dari Lampung, Jawa Tengah dan Jambi, pola ketiga pada isolat yang berasal dari Kalimantan Barat dan pola ke empat pada isolat yang berasal dari Sumatera Selatan. Sementara itu pada isolat yang berasal dari Sumatera Utara tidak dihasilkan pita DNA (Gambar 4A).

Gambar 4B menunjukkan hasil amplifikasi dengan primer OPN-15 yang menghasilkan 3 pola berbeda. Pola pertama ditemukan pada isolat yang berasal dari Bengkulu dan Jawa Tengah, pola kedua pada isolat yang berasal dari Lampung, Jambi, dan Sumatera Utara, serta pola ketiga pada isolat yang berasal dari Kalimantan Barat dan Sumatera Selatan.

Hasil amplifikasi dengan primer OPN-17 menghasilkan 5 pola pita yang berbeda. Pola pertama ditemukan pada isolat yang berasal dari Bengkulu, pola kedua pada isolat yang berasal dari Kalimantan Barat, pola ketiga pada isolat dari Jawa Tengah, pola keempat pada isolat dari Sumatera Selatan dan pola kelima pada isolat dari Jambi dan Sumatera Utara. Jumlah pita DNA yang dihasilkan masing-masing isolat berkisar 0 - 4 pita, dimana isolat dari

Lampung tidak meng-hasilkan pita DNA (Gambar 4C).

Amplifikasi DNA dengan menggunakan primer OPN-18 menghasilkan 2 pola, dimana isolat yang berasal dari Kalimantan Barat memiliki pola yang berbeda dengan keenam isolat lainnya. Perbedaan itu ditentukan oleh satu pita DNA spesifik berukuran 250 bp yang hanya ditemukan pada isolat dari Kalimantan Barat. Jumlah pita DNA yang dihasilkan masing-masing isolat adalah 6 (Gambar 4D).

Gambar 4E menunjukkan hasil amplifikasi dengan primer OPH-08 yang menghasilkan 5 pola berbeda. Pola pertama ditemukan pada isolat yang berasal dari Bengkulu dan Lampung, pola kedua pada isolat dari Kalimantan Barat, pola ketiga pada isolat dari Jawa Tengah, pola keempat pada isolat dari Sumatera Selatan, dan pola kelima pada isolat dari Jambi dan Sumatera Utara. Jumlah pita DNA yang dihasilkan masing-masing isolat berkisar 3 - 5 pita. Amplifikasi dengan primer OPH-08 menghasilkan 2 pita DNA spesifik yang hanya ditemukan pada isolat dari Jawa Tengah.

Dari hasil amplifikasi DNA diatas terlihat bahwa tidak semua primer mampu menghasilkan pola spesifik, meskipun demikian sudah ditemukan 10 primer yang menghasilkan pola berbeda yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi masing-masing isolat. Pola spesifik hasil 15 primer

Tabel 4. Pola spesifik yang dihasilkan oleh 15 primer pada tujuh isolat *C. cassiicola*
 Table 4. Specific pattern produced by 15 primers from seven *C. cassiicola* isolates

No	Isolat/ Primer	CBK	CLP	CKB	CJT	CSS	CJB	CSU
1	OPN-04	1	2	3	4	5	6	7
2	OPN-05	1	2	3	4	5	6	7
3	OPN-11	1	2	3	4	5	6	7
4	OPN-12	1	2	3	4	5	6	7
5	OPN-19	1	2	3	4	5	6	7
6	OPN-20	1	2	3	4	5	6	7
7	OPH-04	1	2	3	4	5	6	7
8	OPH-09	1	2	3	4	5	6	7
9	OPH-12	1	2	3	4	5	6	7
10	OPH-16	1	2	3	4	5	6	7
11	OPN-14	1	2	3	2	4	2	2
12	OPN-15	1	2	3	1	3	2	2
13	OPN-17	1	1	2	3	4	5	5
14	OPN-18	1	1	2	2	2	2	2
15	OPH-08	1	1	2	3	4	5	5

Angka yang sama pada baris yang sama menunjukkan pola yang sama
 Same figures in the same row show the same pattern

- CBK = Isolat asal Bengkulu (*Isolate from Bengkulu*)
- CLP = Isolat asal Lampung (*Isolate from Lampung*)
- CKB = Isolat asal Kalimantan Barat (*Isolate from West Kalimantan*)
- CJT = Isolat asal Jawa Tengah (*Isolate from Central Java*)
- CSS = Isolat asal Sumatera Selatan (*Isolate from South Sumatra*)
- CJB = Isolat asal Jambi (*Isolate from Jambi*)
- CSU = Isolat asal Sumatera Utara (*Isolate from North Sumatra*)

pada 7 isolat *C. cassiicola* disarikan pada Tabel 4.

Dari Tabel 4 diketahui bahwa teknik RAPD dapat digunakan untuk mengidentifikasi isolat *C. cassiicola*, dimana untuk kepentingan identifikasi dibutuhkan minimal dua buah pola spesifik, agar keduanya dapat saling mengkonfirmasi. Dengan menggunakan kombinasi 2 primer dari 10 primer yang menghasilkan pola spesifik maka ketujuh isolat dapat diidentifikasi, sehingga seleksi ketahanan klon terhadap PGDC dapat dilakukan dengan tepat.

Identifikasi Morfologi vs Molekuler

Secara umum identifikasi spesies jamur dilakukan dengan melihat perbedaan konidia di bawah mikroskop. Namun hal ini

susah dilakukan pada spesies yang sama, karena secara umum bentuk konidia suatu spesies adalah sama. Untuk mengatasi hal tersebut biasanya digunakan perbedaan morfologi miselium yang dihasilkan. Dengan memperhatikan ciri-ciri bentuk, tekstur dan warna miselium, tujuh isolat *C. cassiicola* asal klon GT 1 dapat dibedakan. Namun permasalahan yang muncul adalah ciri-ciri tersebut tidak konsisten, dimana seiring perubahan waktu kultur ciri-ciri tersebut juga berubah. Kelemahan identifikasi secara morfologi tersebut dapat dilengkapi dengan identifikasi secara genetik yang tidak dipengaruhi oleh perubahan lingkungan.

KESIMPULAN

1. Tujuh isolat *C. cassiicola* dapat diidentifikasi secara morfologi dan genetik dengan menggunakan teknik RAPD.

2. Dari analisis RAPD menggunakan 15 primer pada 7 isolat *C. cassiicola*, terbentuk 4 kelompok dengan koefisien kesamaan genetik 66%, dimana kelompok satu terdiri dari isolat asal Bengkulu, kelompok dua isolat asal Lampung dan Sumatera Utara, kelompok tiga isolat asal Kalimantan Barat, Sumatera Selatan dan Jawa barat dan kelompok empat terdiri dari isolat asal Jawa tengah.
3. Sepuluh dari 15 primer yang diuji mampu menghasilkan pola spesifik pada masing-masing isolat, sehingga kesepuluh primer tersebut dapat digunakan sebagai alat identifikasi isolat *C. cassiicola*.
4. Pengujian patogenisitas dari masing-masing kelompok ras perlu dilaksanakan sehingga pengendalian yang tepat dapat dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Atan, S. and N.H. Hamid. 2003. Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *J. Rubb. Res.*, 6 (1), 58-64.
- Anh-Nghia, N., J. Kadir, E. Sunderasan, M.P. Abdullah, A. Malik, and S. Napis. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* Isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166, 189-201.
- Darmono, T.W., A. Darussamin, dan S. Pawirosoemardjo. 1996. Keragaman diantara isolat *Corynespora cassiicola* yang berasosiasi dengan *Hevea brasiliensis* di Indonesia. *Pros. Lok. Penyakit Gugur Daun Corynespora pada Tanaman Karet*, 16-17 Desember 1996, Pusat Penelitian Karet, Medan, Indonesia, 79-92.
- Farr, D.F., A.Y. Rossman, M.E. Palm, and E.B. McCray. 2007. Fungal Databases. Systematic Botany and Mycology Laboratory, ARS, USDA. <http://nt.arsgrin.gov>.
- Oktavia, F., M. Lasmingsih dan Kuswanhadi. 2009. Identifikasi klon karet anjuran dengan teknik RAPD. *J. Penel. Karet*, 27 (1), 21-31.
- Qi Y.X., Y.X. Xie, X. Zhang, J. Pu, H.Q. Zhang, S. Huang and H. Zhang. 2009. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Mol. Biotechnol.*, 41, 145-151.
- Qi, Y.X., X. Zhang, J. Pu, X. Liu, Y. Lu, H. Zhang, H.Q. Zhang, Y.C. Lv, and Y.X. Xie. 2010. Morphological and molecular analysis of genetic variability within isolates of *Corynespora cassiicola* from different hosts. *Eur. J. Plant. Pathol.*, 130 (1), 83-95.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-PC. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analisis System*. New York, Eeter software.
- Sambrook, J.E.F. Fritsch, and Maniatis. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York,
- Shimomoto, Y., T. Sato, H. Hojo, Y. Morita, S. Takeuchi, H. Mizumoto, A. Kiba and Y. Hikichi. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology*, 60, 253-260.
- Silva, W.P.K., D.S. Multani, B.J. Deverall, and B. Lyon. 1995. RFLP and RAPD analysis in the identification and differentiation of isolates of the leaf spot fungus *Corynespora cassiicola*. *Australian J. Botany*, 43, 609-618.
- Situmorang, A., A. Budiman, S. Pawirosoemardjo, dan M. Lasminingsih. 1996. Epidemi penyakit gugur daun *Corynespora* dan pencegahannya pada tanaman karet. *Pros. Lok. Penyakit Gugur Daun Corynespora pada Tanaman Karet*, 16-17 Desember 1996, Pusat Penelitian Karet, Medan, Indonesia, 111-132.

- Situmorang, A. 2002. Sebaran Penyakit Gugur Daun, Viru-lensi dan Genetika *Cory-nespora cassiicola* Asal Sentra Perkebunan Karet Indonesia. Disertasi. Institut Pertanian Bogor.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff and G. Kahl. 2005. DNA Finger Printing *In Plants, Principles, Methods and Applications*. CRC Press, London.
- William, J.G.K., A.R. Kubelik, J.A. Livak, K.J. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA poly-morphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 6531 - 6535.