

PENGUJIAN PENANDA JENIS SPESIFIK PADA JAMUR YANG BERPOTENSI SEBAGAI AGENS PENGENDALI HAYATI PENYAKIT BUSUK AKAR PADA AKASIA

Assessment of species specific primers for fungi as biological control agent of root rot disease in acacia

Istiana Prihatini¹, Anto Rimbawanto¹, Desy Puspitasari² dan Dayin Fauzi³

¹) Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan
Jl. Palagan Tentara Pelajar, Km.15, Purwobinangun, Pakem, Sleman, Yogyakarta, Indonesia
email: istiana.prihatini@biotifor.or.id

²) Mahasiswa Pascasarjana Program Studi Fitopatologi Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jl. Flora Bulaksumur, Yogyakarta, Indonesia

³) Mahasiswa Program Studi Biologi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atmajaya
Jl. Babarsari 44, Yogyakarta, Indonesia

ABSTRACT

Root rot caused by *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres., is an important disease in Acacia plantation. A strategy to control this disease is currently being developed, particularly on the application of biological control agent (BCA). Species specific primers for rapid identification of potential fungi as BCA were developed. This study aimed to obtain the best DNA condition and the best primers for species specific identification. DNA with 20x dilution is the best condition for amplification of the ITS fragment thus used for rapid species identification. The best primer set to detect *Cerrena* sp. is CrF1/CrR1, PbF2/PbR2 is the best primer set for *Phlebiopsis* sp. 1. There was no specific primer suitable to detect *Phlebia* sp. 1 and *Phlebia* sp. 2 only but Pl-2F1/Pl-2R4 is the best primer set for *Phlebia* spp.

Keywords: DNA dilution, *Ganoderma*, PCR primers, rapid identification

ABSTRAK

Penyakit busuk akar yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) merupakan salah satu penyakit penting pada hutan tanaman akasia. Saat ini strategi manajemen untuk pengendalian penyakit ini sedang dikembangkan, khususnya aplikasi agens pengendali hayati (APH). Penanda DNA (primer) yang spesifik untuk identifikasi secara cepat untuk jenis jamur yang berpotensi sebagai APH telah dikembangkan. Penelitian ini dilakukan untuk menentukan kondisi DNA jamur yang tepat untuk pengujian serta pasangan penanda DNA yang paling tepat untuk identifikasi jenis jamur. DNA dengan pengenceran 20x merupakan kondisi terbaik yang dipakai dalam proses amplifikasi fragmen DNA ITS sehingga kondisi ini digunakan pada pengujian lebih lanjut menggunakan penanda spesifik jenis. Pasangan penanda DNA terbaik untuk mendeteksi jamur *Cerrena* sp. adalah CrF1/CrR1, PbF2/PbR2 merupakan penanda DNA terbaik untuk mendeteksi jamur *Phlebiopsis* sp. 1. Tidak ada penanda spesifik yang mampu mendeteksi jenis jamur *Phlebia* sp. 1 dan *Phlebia* sp. 2 saja, namun Pl-2F1/Pl-2R4 merupakan penanda yang paling baik untuk mendeteksi jamur *Phlebia* spp.

Kata kunci: Pengenceran DNA, *Ganoderma*, primer PCR, identifikasi cepat

I. PENDAHULUAN

Akasia (*Acacia mangium* Willd.) merupakan jenis tanaman hutan yang banyak digunakan sebagai bahan baku industri, seperti pulp dan kertas, furniture, medium-density fiberboard (MDF), plywood, lantai dan konstruksi ringan lainnya. Namun, permasalahan saat ini adalah produktivitas akasia mengalami penurunan karena adanya hama dan penyakit.

Salah satu jenis penyakit yang umum terjadi pada tanaman akasia adalah busuk akar yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma philippii* (Glen et al., 2009; Puspitasari & Rimbawanto, 2010; Puspitasari, Rimbawanto, & Hidayati, 2009). Penyakit ini menyebabkan tingginya kematian pohon hingga 3% - 28% pada tanaman akasia umur 3-5 tahun pada rotasi kedua (Irianto et al., 2006). Gejala umum yang muncul misalnya daun menjadi kuning klorotik, mengecil dan jarang, tajuk muda layu secara

serentak, dan pohon yang terserang umumnya mengelompok karena jamur menyebar melalui kontak akar (Mohammed, Rimbawanto, & Page, 2014). Oleh karena itu, diperlukan suatu cara atau strategi yang dapat mengatasi permasalahan tersebut, salah satunya adalah dengan penggunaan agens pengendali hayati (APH). Terdapat beberapa jenis jamur dengan *track record* yang bagus sebagai pengendali hayati sebelumnya dari koleksi isolat yang dimiliki dari hasil isolasi sampel di lapangan, antara lain jamur *Phlebiopsis* sp. 1 (Puspitasari et al., 2016), jamur *Cerrena* sp. dan jamur *Phlebia* spp (Agustini, Francis, Glen, Indrayadi, & Mohammed, 2014). Dua dari tiga jenis jamur tersebut telah dipelajari potensinya sebagai APH untuk mengendalikan jamur *Ganoderma philippii* (Heru Indrayadi, komunikasi pribadi). Beberapa metode aplikasi penggunaan APH tersebut juga sedang dipelajari, salah satunya adalah dengan melihat kemampuan APH tersebut dalam mengkolonisasi tunggul untuk mempercepat proses pelapukan tunggul dan serasah kayu.

Sekuen *internal transcribed spacer* (ITS) pada *ribosomal* DNA (rDNA) dapat digunakan sebagai karakter untuk mendeteksi keberadaan jamur pada tanaman, sedangkan penanda spesifik jenis dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis jamur secara cepat. Penanda spesifik untuk jenis-jenis jamur yang berpotensi sebagai APH saat ini sedang dikembangkan, dengan beberapa kandidat *primers* (Morag Glen, komunikasi pribadi). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tingkat dilusi DNA terbaik antara 10x dan 20x DNA hasil ekstraksi, menguji penanda (primer) spesifik jenis jamur yang telah dipelajari potensinya sebagai agens pengendali hayati terhadap penyakit busuk akar yang menyerang tanaman akasia serta mengetahui primer spesifik terbaik untuk setiap spesies jamur yang diuji.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan penelitian

Bahan yang digunakan adalah 12 isolat dari enam jenis jamur (*Cerrena* sp., *Phlebiopsis* sp. 1, dan *Phlebia* spp.) yang telah teridentifikasi secara molekuler (Glen et al., 2014) dan berpotensi sebagai agens pengendali hayati jamur patogen *Ganoderma philippii* (Bres. & Henn. ex Sacc.) Bres. penyebab penyakit busuk akar pada akasia (Tabel 1). Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika Molekular Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan (B2PPBPTH) Yogyakarta pada tanggal 23 Juni 2015 – 10 Agustus 2015.

Tabel 1. Sampel isolat jamur yang memiliki potensi sebagai agens pengendali hayati *Ganoderma philippii*

No. sampel	Kode isolat	Jenis
1	Cr-1	<i>Cerrena</i> sp.
2	Cr-2	<i>Cerrena</i> sp.
3	Cr-4	<i>Cerrena</i> sp.
4	Cr-6	<i>Cerrena</i> sp.
5	Pb-1	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
6	Pb-2	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
7	Pb-8	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
8	Pb-11	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
9	PI-1	<i>Phlebia brevispora</i>
10	PI-2	<i>Phlebia</i> sp. 1
11	PI-3	<i>Phlebia</i> sp. 2
12	PI-4	<i>Phlebia</i> sp. 3

B. Ekstraksi dan Purifikasi DNA

Ekstraksi DNA dari miselium jamur dilakukan menggunakan SDS *buffer* dengan cara menambahkan lima buah gotri (*stainless bead*) ukuran 2.3 mM (Biospec) ke dalam *microtube* ukuran 2 mL yang telah berisi sampel isolat jamur. Larutan SDS *buffer* (Raeder & Broda, 1985) sebanyak 250 µL ditambahkan ke setiap *microtube* sebelum sampel dihancurkan menggunakan mesin *mini bead beater-8* (Biospec) selama 5 menit. Sampel yang telah dihancurkan kemudian diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam pada mesin *incubator mini dual-14* (Hybaid).

Sampel kemudian disentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 14.000 rpm menggunakan mesin *low speed centrifuge* LC121 (Tomy). Supernatan hasil sentrifugasi diambil sebanyak $\pm 250 \mu\text{L}$ dan dimasukkan ke dalam *microtube* baru yang telah diisi dengan silika (*glass milk*) sebanyak $10 \mu\text{L}$ dan $750 \mu\text{L}$ NaI. *Microtube* tersebut kemudian dihomogenisasi menggunakan mesin vortex (Scientific Industries), kemudian didinginkan dalam *ice bath* selama 15 menit sambil sesekali dibolak-balik. Sentrifugasi selama 20 detik pada kecepatan 14.000 rpm dilakukan untuk memisahkan pelet silika yang mengikat DNA dengan *supernatant* yang kemudian dibuang. Pelet yang tertinggal dalam *microtube* disuspensi ulang dalam larutan *wash solution* sebanyak $750 \mu\text{L}$. Langkah selanjutnya, proses homogenisasi dengan mesin vortex hingga pelet tercampur rata, kemudian disentrifugasi kembali selama 20 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Cairan supernatan dibuang, kemudian pelet kembali dilarutkan dalam etanol 100% sebanyak $750 \mu\text{L}$. Sampel kembali dihomogenisasi dan disentrifugasi seperti sebelumnya. Supernatan dibuang dan pelet yang tertinggal dalam tube kemudian dikering-anginkan dalam ruangan aseptis atau dalam *Laminair Air Flow* (LAF) ± 60 menit.

Pelet kemudian ditambah dengan larutan TE *buffer* sebanyak $50 \mu\text{L}$, divortex, dan kemudian diinkubasi pada suhu 45°C selama 10 menit. Setelah proses inkubasi, *tube-tube* disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Supernatan yang diperoleh dari hasil sentrifugasi tersebut, kemudian diambil dan dipindahkan ke dalam *tube* yang baru. DNA isolat jamur hasil ekstraksi tersebut kemudian disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu -20°C hingga dilakukan analisis DNA.

DNA hasil ekstraksi diencerkan atau didilusi 10x dan 20x, untuk mengetahui kondisi terbaik DNA untuk digunakan pada proses amplifikasi DNA. Dilusi 10x dilakukan dengan cara mengambil $10 \mu\text{L}$ DNA jamur hasil ekstraksi dan $90 \mu\text{L}$ TE, sehingga volume total

menjadi $100 \mu\text{L}$. DNA dari hasil dilusi 10x tersebut kemudian dilanjutkan ke proses dilusi DNA 20x dengan cara mengambil $50 \mu\text{L}$ DNA hasil dilusi 10x, ditambah dengan $50 \mu\text{L}$ TE. DNA hasil dilusi tersebut dapat disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu -20°C sebelum digunakan pada proses PCR.

C. Amplifikasi DNA menggunakan penanda ITS1-F/ITS-4 dan primer sSpesifik jenis (*Species Specific PCR*)

Primer yang digunakan dalam penelitian ini meliputi primer ITS1F, (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes & Bruns, 1993), ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990), dan 14 set primer spesifik (Morag Glen, *unpublished*; Tabel 2). Konsentrasi akhir reagen yang digunakan dalam PCR adalah: 67 mM Tris-HCl, pH 8.8; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (in $10\times \text{NH}_4\text{-based reaction buffer}$ dari Bioline); 2.0 mM *magnesium chloride* (Promega); 200 μM *deoxynucleotide triphosphate* (Bioline); 0.25 μM *oligonucleotide primer* (Geneworks); 0.02 unit/ μL *Mangotaq DNA polymerase* (Bioline); 0.2 $\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$ *bovine serum albumin* (Fisher Biotech) untuk mengurangi hambatan enzim yang mungkin ada dalam *template* DNA (Kreader, 1996); $10 \mu\text{L}$ DNA diencerkan dalam TE (1/40) sebagai *template* dan air steril (Otsuka) untuk membuat volume mencapai $50 \mu\text{L}$.

Amplifikasi dilakukan dengan menggunakan mesin GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystem) pada profil suhu sebagai berikut: 95°C selama 3 menit, diikuti dengan 35 siklus dari 94°C selama 30 detik, 55°C selama 30 detik dan 72°C selama 2 menit, serta ekstensi akhir pada suhu 72°C selama 7 menit. Adapun untuk amplifikasi fragmen DNA dengan penanda spesifik menggunakan profil suhu yang sama dengan amplifikasi fragmen ITS, kecuali pada tahapan *annealing* menggunakan suhu 62°C . Kedua proses PCR tersebut berlangsung kurang lebih selama 2 jam.

D. Elektroforesis dan visualisasi gel

Elektroforesis dilakukan pada gel *agarose* 1% yang sudah ditambahkan 2,5 µL *Ethidium bromide* (EtBr) per 40 µL larutan 1xTBE. Gel *agarose* kemudian dimasukkan ke dalam bak elektroforesis yang telah berisi 1xTBE *buffer* dengan penambahan EtBr 200 µL/L. Tangki elektroforesis dialiri listrik dengan tegangan sebesar 120 volt selama ± 1 jam.

Setelah proses elektroforesis selesai dilakukan proses visualisasi gel untuk melihat hasil elektroforesis menggunakan *Gel Doc system* (Biorad). Gambar pita yang menunjukkan adanya produk hasil amplifikasi DNA dapat teramati dengan adanya sinar ultraviolet. Gambar gel didokumentasikan menggunakan kamera yang terdapat pada mesin *Gel Doc* dan disimpan dalam format JPEG.

Tabel 2. Daftar primer yang digunakan dalam amplifikasi PCR spesifik jenis serta nama jenis jamur yang akan terdeteksi

No	Nama primer	Jenis jamur yang akan dideteksi
1	CrF1/CrR1 (Set 1)	<i>Cerrena</i> sp.
2	CrF2/CrR1 (Set 2)	<i>Cerrena</i> sp.
3	PbF1/PbR1 (Set 1)	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
4	PbF1/PbR2 (Set 2)	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
5	PbF2/PbR1 (Set 3)	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
6	PbF2/PbR2 (Set 4)	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1
7	PI-2F1/PI-2R2 (Set 1)	<i>Phlebia</i> sp. 1
8	PI-2F3/PI-2R2 (Set 2)	<i>Phlebia</i> sp. 1
9	PI-2F1/PI-2R4 (Set 3)	<i>Phlebia</i> sp. 1
10	PI-2F3/PI-2R4 (Set 4)	<i>Phlebia</i> sp. 1
11	PI-3F1/PI-3R2 (Set 5)	<i>Phlebia</i> sp. 2
12	PI-3F3/PI-3R2 (Set 6)	<i>Phlebia</i> sp. 2
13	PI-3F1/PI-3R4 (Set 7)	<i>Phlebia</i> sp. 2
14	PI-3F3/PI-3R4 (Set 8)	<i>Phlebia</i> sp. 2

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi DNA dan amplifikasi DNA dengan PCR ITS

Amplifikasi fragmen ITS menggunakan pasangan primer ITS1F/ITS4 dilakukan untuk mendeteksi adanya DNA jamur dari hasil ekstraksi 12 isolat menggunakan *buffer* SDS sedangkan penggunaan tingkat pengenceran DNA yang berbeda (10x dan 20x) dilakukan untuk menguji tingkat dilusi DNA terbaik yang dapat menghasilkan pita DNA paling jelas dan tebal. Hasil amplifikasi terhadap DNA dari 12 isolat jamur pada tingkat pengenceran DNA sebanyak 10x, pita (*band*) DNA muncul pada 9 isolat, terdapat 3 isolat yang tidak memunculkan pita DNA yaitu Pb-8, Pb-11 dan PI-4 (Gambar 1A; Tabel 3). Pada sampel dengan pengenceran 20x, 10 isolat menunjukkan adanya pita DNA dan 2 sampel tidak menunjukkan adanya pita

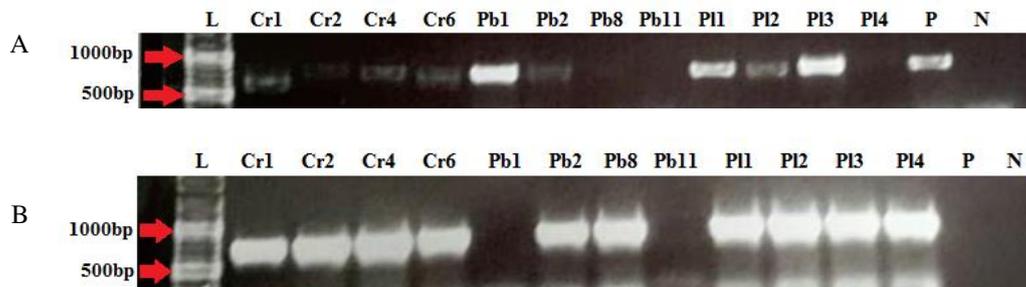
DNA yaitu Pb-1 dan Pb-11 (Gambar 1B; Tabel 3).

B. Amplifikasi DNA menggunakan penanda spesifik untuk jenis *Cerrena* sp.

Dua pasang primer spesifik CrF1/CrR1 (Set 1) dan CrF2/CrR1 (Set 2), digunakan pada amplifikasi PCR untuk mendeteksi jenis jamur *Cerrena* sp. (Tabel 4). Hasil amplifikasi menggunakan primer spesifik *Cerrena* Set 1 menunjukkan adanya pita DNA untuk isolat Cr-1 sampai Cr-6. Pada beberapa sampel yang lain yaitu isolat Pb-2 dan PI-1 juga terlihat adanya pita DNA yang lemah. Sementara itu, hasil amplifikasi menggunakan primer *Cerrena* Set 2 menunjukkan adanya pita DNA pada isolat Cr-1, Cr-2 dan Cr-4 dan pita DNA yang lemah pada isolat Cr-6 dan isolat Pb-2. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa primer *Cerrena* Set 1 memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan primer *Cerrena* Set 2 dalam mendeteksi DNA jenis jamur *Cerrena* sp.

Pita DNA dengan intensitas paling kuat dihasilkan oleh amplifikasi menggunakan primer *Phlebiopsis* Set 1 (Gambar 2A). Adapun amplifikasi menggunakan pasangan primer *Phlebiopsis* Set 2 menunjukkan hasil yang sama dengan primer Set 1, kecuali pada isolat Pb-2 pita DNA yang dihasilkan lebih tipis (Gambar 2B). Adapun hasil amplifikasi menggunakan primer spesifik *Phlebiopsis* Set 3 (Gambar 2C)

dan *Phlebiopsis* Set 4 (Gambar 2D) menunjukkan adanya pita DNA dengan intensitas sedang pada isolat Pb-1, Pb-2 dan Pb-8. Amplifikasi menggunakan primer *Phlebiopsis* Set 1, Set 2, dan Set 3 pada beberapa isolat *Phlebia* spp. juga menghasilkan adanya pita DNA yang teramplifikasi namun tidak sekuat pada isolat-isolat *Phlebiopsis* sp. 1.



Gambar 1. Amplifikasi fragmen ITS (550bp) dari 12 isolat jamur menggunakan penanda ITS1F/ITS4. Gambar A menunjukkan hasil amplifikasi menggunakan pengenceran 10x, sedang gambar B menggunakan pengenceran 20x. L adalah DNA ladder 100bp, Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1 dan PI adalah isolat *Phlebia* spp., P adalah kontrol positif (*Ganoderma philippii*) dan N adalah kontrol negatif (air steril)

Tabel 3. Hasil amplifikasi PCR-ITS menggunakan primer ITS1F/ITS4 dengan tingkat dilusi DNA 10x dan 20x

No	Kode isolat	Jenis jamur	Tingkat pengenceran DNA	
			10x	20x
1	Cr-1	<i>Cerrena</i> sp.	++	+++
2	Cr-2	<i>Cerrena</i> sp.	+	+++
3	Cr-4	<i>Cerrena</i> sp.	++	+++
4	Cr-6	<i>Cerrena</i> sp.	++	+++
5	Pb-1	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1	+++	-
6	Pb-2	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1	+	+++
7	Pb-8	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1	-	+++
8	Pb-11	<i>Phlebiopsis</i> sp. 1	-	-
9	PI-1	<i>Phlebia brevispora</i>	++	+++
10	PI-2	<i>Phlebia</i> sp. 1	-	+++
11	PI-3	<i>Phlebia</i> sp. 2	+	+++
12	PI-4	<i>Phlebia</i> sp. 3	-	+++
13	Kontrol positif	<i>Ganoderma philippii</i>	+++	
14	Kontrol negatif	Air steril	-	

Keterangan: +++ = ada pita DNA dengan intensitas kuat, ++ = ada pita DNA dengan intensitas sedang, + = ada pita DNA dengan intensitas lemah, - = tidak ada pita DNA

Tabel 4. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik jenis *Cerrena* sp. dengan tingkat dilusi DNA 20x

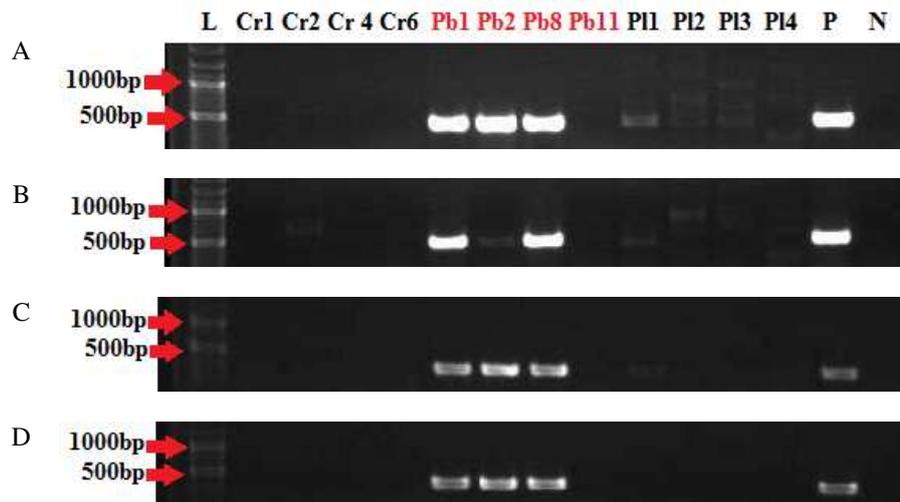
No	Kode isolat	Pasangan primer	
		CrF1/CrR1 (Set 1)	CrF2/CrR1 (Set 2)
1	Cr-1	+++	++
2	Cr-2	+++	++
3	Cr-4	+++	++
4	Cr-6	+	-
5	Pb-1	-	-
6	Pb-2	+	+
7	Pb-8	-	-
8	Pb-11	-	-
9	Pl-1	+	-
10	Pl-2	-	-
11	Pl-3	-	-
12	Pl-4	-	-
13	Kontrol positif (<i>Cerrena</i> sp.)	+++	+++
14	Kontrol negatif (air steril)	-	-

Keterangan: +++ = ada pita DNA dengan intensitas kuat, ++ = ada pita DNA dengan intensitas sedang, + = ada pita DNA dengan intensitas lemah, - = tidak ada pita DNA. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1 dan Pl adalah isolat *Phlebia* spp. Isolat yang ditandai (*highlighted*) dan dicetak tebal merupakan jenis yang menjadi target deteksi

Tabel 5. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik jenis untuk *Phlebiopsis* sp. 1 dengan tingkat dilusi DNA 20x

No	Kode sampel	Pasangan primer			
		PbF1/PbR1 (Set 1)	PbF1/PbR2 (Set 2)	PbF2/PbR1 (Set 3)	PbF2/PbR2 (Set 4)
1	Cr-1	-	-	-	-
2	Cr-2	-	-	-	-
3	Cr-4	-	-	-	-
4	Cr-6	-	-	-	-
5	Pb-1	+++	+++	++	++
6	Pb-2	+++	+	++	++
7	Pb-8	+++	+++	++	++
8	Pb-11	-	-	-	-
9	Pl-1	+	+	+	-
10	Pl-2	+	+	+	-
11	Pl-3	+	-	-	-
12	Pl-4	+	-	-	-
13	Kontrol positif (<i>Phlebiopsis</i> sp.1)	+++	+++	++	++
14	Kontrol negatif (air steril)	-	-	-	-

Keterangan: +++ = ada pita DNA dengan intensitas kuat, ++ = ada pita DNA dengan intensitas sedang, + = ada pita DNA dengan intensitas lemah, - = tidak ada pita DNA. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1 dan Pl adalah isolat *Phlebia* spp. Isolat yang ditandai (*highlighted*) dan dicetak tebal merupakan jenis yang menjadi target deteksi



Gambar 2. Amplifikasi PCR menggunakan penanda spesifik untuk jenis *Phlebiopsis* sp.1, primer PbF1/PbR1 (Set 1) (A), primer PbF1/PbR2 (Set 2) (B), primer PbF2/PbR1 (Set 3) (C), primer PbF2/PbR2 (Set 4) (D) pada 12 isolat jamur. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1, PI adalah isolat *Phlebia* spp., L adalah DNA ladder 100bp, P adalah kontrol positif (*Phlebiopsis* sp.1) dan N adalah kontrol negatif (air steril)

C. Amplifikasi DNA menggunakan penanda spesifik untuk jenis *Phlebia* spp.

Empat pasang primer spesifik yaitu : PI-2F1/PI-2R2 (Set 1), PI-2F3/PI-2R2 (Set 2), PI-2F1/PI-2R4 (Set 3) dan PI-2F3/PI-2R4 (Set 4) dikembangkan untuk mendeteksi jenis jamur *Phlebia* sp.1. Adapun empat pasang primer yang lain yaitu, PI-3F1/PI-3R2 (Set 5), PI-3F3/PI-3R2 (Set 6), PI-3F1/PI-3R4 (Set 7) dan PI-3F3/PI-3R4 (Set 8) dikembangkan untuk mendeteksi jamur *Phlebia* sp. 2. Hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer-primer tersebut menunjukkan adanya pita DNA dengan intensitas yang lemah hingga kuat pada empat isolat *Phlebia* spp. (Tabel 6, Gambar 3&4), meskipun pada sampel untuk kontrol positif tidak terjadi amplifikasi (Gambar 3 A, B dan D). Tidak terjadinya amplifikasi pada kontrol positif mungkin disebabkan karena sampel DNA telah mengalami degradasi atau kerusakan. Degradasi sampel DNA tersebut dapat disebabkan oleh penggunaan rutin dalam jangka waktu yang lama serta penyimpanan pada suhu kurang optimal. Pada sampel-sampel DNA yang rutin di gunakan DNA biasanya

disimpan pada suhu 14°C untuk menghindari proses pembekuan (*freezing*) dan pencairan (*thawing*) yang terus menerus. Adapun sampel-sampel DNA yang jarang digunakan penyimpanan dilakukan pada suhu -20 °C. Pada pengujian dengan penanda *Phlebia* spp berikutnya, digunakan dua sampel DNA baru sebagai kontrol positif, dan hasil PCR menunjukkan adanya amplifikasi pada kedua sampel tersebut (Gambar 4 A, B, C dan D).

Amplifikasi DNA menggunakan empat primer spesifik *Phlebia* sp. 1 menghasilkan pita DNA dengan intensitas kuat pada isolat jamur *Phlebia* sp. 1 (PI-2), namun pita DNA juga muncul pada jenis lain yaitu pada isolat PI-4 (intensitas kuat) dan pada isolat PI-3 dan PI-1 (intensitas sedang).

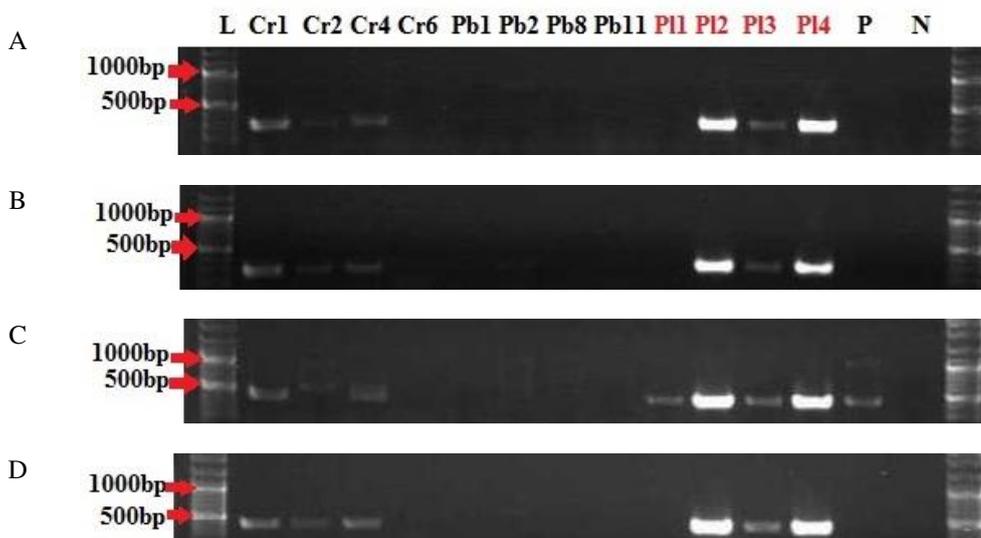
Empat pasangan primer yang dikembangkan untuk mendeteksi jenis *Phlebia* sp. 2 (Set 5 – Set 8) berhasil mendeteksi jenis tersebut (isolat PI-3), dengan menghasilkan pita DNA yang kuat. Namun primer-primer tersebut juga mampu mengamplifikasi DNA jenis lain dengan munculnya pita DNA dengan intensitas sedang hingga kuat PI-4.

Tabel 6. Hasil amplifikasi PCR menggunakan primer spesifik jenis *Phlebia* sp.1 dan *Phlebia* sp.2 dengan tingkat dilusi DNA 20x.

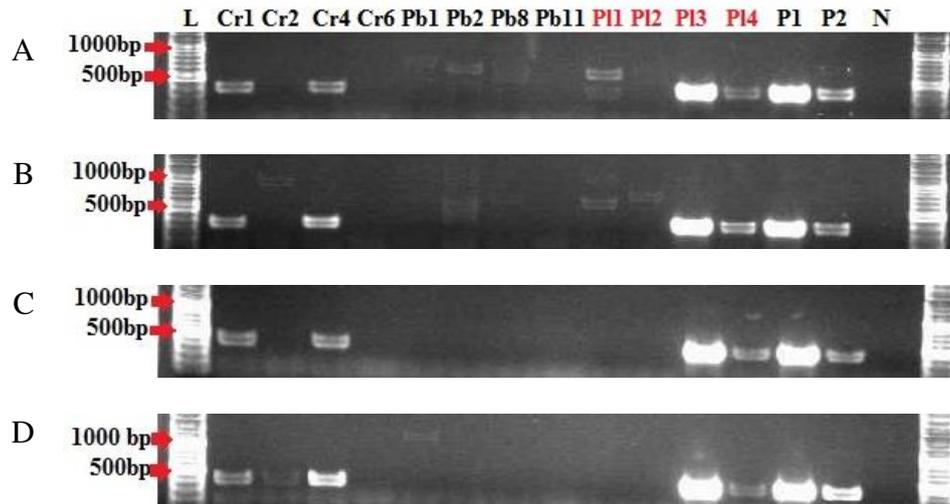
No	Kode sampel	Pasangan primer							
		Set 1	Set 2	Set 3	Set 4	Set 5	Set 6	Set 7	Set 8
1	Cr-1	+	+	+	+	++	++	++	++
2	Cr-2	+	+	+	+	-	-	-	+
3	Cr-4	+	+	+	+	++	++	++	++
4	Cr-6	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Pb-1	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Pb-2	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Pb-8	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Pb-11	-	-	-	-	-	-	-	-
9	PI-1	-	-	++	-	+	-	-	-
10	PI-2	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-
11	PI-3	+	+	++	+	+++	+++	+++	+++
12	PI-4	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++
13	Kontrol positif (<i>Phlebia</i> spp.)	-	-	++	-	+++	+++	+++	+++
14	Kontrol negatif (air steril)	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan: +++ = ada pita DNA dengan intensitas kuat, ++ = ada pita DNA dengan intensitas sedang, + = ada pita DNA dengan intensitas lemah, - = tidak ada pita DNA. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1 dan PI adalah isolat *Phlebia* spp. Isolat yang ditandai (*highlighted*) dan dicetak tebal merupakan jenis yang menjadi target deteksi

Pasangan primer Set 1 = PI-2F1/PI-2R2, Set 2 = PI-2F3/PI-2R2, Set 3 = PI-2F1/PI-2R4, Set 4 = PI-2F3/PI-2R4, Set 5 = PI-3F1/PI-3R2, Set 6 = PI-3F3/PI-3R2, Set 7 = PI-3F1/PI-3R4 dan Set 8 = PI-3F3/PI-3R4.



Gambar 3. Amplifikasi PCR menggunakan penanda spesifik untuk jenis *Phlebia* sp.1, primer PI-2F1/PI-2R2 (Set 1) (A), primer PI-2F3/PI-2R2 (Set 2) (B), primer PI-2F1/PI-2R4 (Set 3) (C), dan primer PI-2F3/PI-2R4 (Set 4) (D) pada 12 isolat jamur. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1, PI adalah isolat *Phlebia* spp., L adalah DNA ladder 100bp, P1 adalah kontrol positif (*Phlebia* sp.1) dan N adalah kontrol negatif (air steril)



Gambar 4. Amplifikasi PCR menggunakan penanda spesifik untuk jenis *Phlebia* sp.2, primer PI-3F1/PI-3R2 (Set 5) (A), primer PI-3F3/PI-3R2 (Set 6) (B), primer PI-3F1/PI-3R4 (Set 7) (C), dan primer PI-3F3/PI-3R4 (Set 8) (D) pada 12 isolat jamur. Cr adalah isolat *Cerrena* sp., Pb adalah isolat *Phlebiopsis* sp. 1, P1 adalah isolat *Phlebia* spp., L adalah DNA ladder 100bp, P1 dan P2 adalah kontrol positif (*Phlebia* sp.2) dan N adalah kontrol negatif (air steril)

D. Pembahasan

DNA jamur berhasil diekstraksi menggunakan larutan (*buffer*) *Sodium dodecyl sulphate* (SDS) yang dikembangkan oleh (Raeder & Broda, 1985) dan telah dimodifikasi oleh (Glen, Tommerup, Bougher, & O'Brien, 2002). Metode ini telah banyak digunakan sebagai metode ekstraksi DNA dari berbagai jenis sampel jamur selain miselium, misalnya badan buah atau *sporocarp* (Yuskianti et al., 2014) maupun jamur endofit dari organ tanaman (Prihatini, 2014; Prihatini, Glen, Wardlaw, Ratkowsky, & Mohammed, 2015).

Hasil ekstraksi DNA yang telah diencerkan 10x dan 20x digunakan pada pengujian awal penanda ITS untuk menentukan konsentrasi DNA yang paling optimal dalam proses amplifikasi DNA. Penggunaan DNA dengan pengenceran 20x memberikan hasil amplifikasi paling baik karena sebagian besar sampel yang diuji menghasilkan pita DNA dengan sintensitas yang kuat. Pada pengujian lanjutan menggunakan penanda spesifik jenis digunakan DNA dengan pengenceran 20x. Perbedaan hasil amplifikasi DNA menggunakan tingkat pengenceran DNA 10x dan 20x,

menunjukkan bahwa konsentrasi DNA *template* yang digunakan pada proses amplifikasi sangat berpengaruh dalam proses amplifikasi. Menurut (Weeden, Timmerman, Hemmat, Kneen, & Lodhi, 1992), konsentrasi DNA cetakan yang terlalu kecil sering menghasilkan pita DNA amplifikasi yang lemah atau tidak jelas.

Pada pengujian dua set penanda yang dikembangkan untuk mendeteksi *Cerrena* sp. menunjukkan bahwa penanda Set 1 (CrF1/CrR1) memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan penanda Set 2 (CrF2/CrR1) dalam mendeteksi DNA jenis jamur *Cerrena* sp. Munculnya pita DNA tipis pada isolat jamur jenis lain (Pb-2 dan P1-1) dapat dimungkinkan karena adanya kontaminasi DNA karena amplifikasi hanya muncul pada dua isolat dari dua jenis jamur yang berbeda.

Pengujian terhadap empat penanda spesifik untuk mendeteksi DNA jamur *Phlebiopsis* sp. 1, menunjukkan bahwa empat set penanda tersebut mampu mendeteksi jenis target meskipun ada satu sampel *Phlebiopsis* sp. 1 (isolat Pb-11) yang tidak teramplifikasi. Tidak terjadinya proses amplifikasi DNA terhadap sampel tersebut dapat disebabkan karena

kualitas DNA yang digunakan sebagai *template* tidak bagus. Proses amplifikasi terhadap sampel isolat Pb-11 menggunakan penanda ITS1F/ITS4 juga tidak menunjukkan adanya hasil amplifikasi DNA yang baik pada pengenceran 10x maupun 20x.

Tiga pasang penanda spesifik jenis *Phlebiopsis* sp. 1 (Set 1 – Set 3) juga memberikan hasil positif terhadap empat isolat *Phlebia* spp., namun pita DNA yang dihasilkan tidak sejelas pada isolat-isolat *Phlebiopsis* sp. 1. Adanya pita DNA tipis yang dihasilkan oleh empat isolat jenis *Phlebia* spp. menggunakan tiga penanda spesifik untuk jenis jamur *Phlebiopsis* sp. 1, dapat disebabkan karena *Phlebia* spp. memiliki kemiripan urutan basa DNA dengan jamur *Phlebiopsis* sp. 1, sehingga terjadi proses amplifikasi DNA pada saat dilakukan PCR. Pita DNA yang dihasilkan oleh jenis jamur lain pada amplifikasi menggunakan penanda spesifik jamur *Phlebiopsis* sp. 1 bukan merupakan pita tunggal yang kuat, melainkan berupa beberapa pita yang lemah, sehingga hal ini dapat digunakan sebagai pembeda antara jenis *Phlebiopsis* sp. 1 dengan *Phlebia* spp. Penanda *Phlebiopsis* Set 4 (PbF2/PbR2) memiliki kemampuan deteksi yang lebih baik apabila dibandingkan dengan tiga set penanda yang lain karena penanda ini tidak menghasilkan produk amplifikasi DNA dari isolat jamur yang bukan jenis target.

Pengujian delapan pasang penanda untuk mendeteksi jenis jamur *Phlebia* sp. 1 dan *Phlebia* sp. 2 menunjukkan bahwa semua pasangan penanda tersebut mampu mengamplifikasi DNA jenis target, namun juga mampu mendeteksi jenis non target dari genus yang sama (*Phlebia*) dan dari genus yang berbeda (*Cerrena* sp.). Adanya amplifikasi dari genus yang sama dapat disebabkan adanya kemiripan susunan basa DNA dari fragmen ITS yang digunakan sebagai dasar pengembangan penanda spesifik yang digunakan dalam penelitian ini (Morag Glen, komunikasi pribadi). Adanya amplifikasi dari genus *Cerrena* mungkin disebabkan oleh adanya

kontaminasi DNA dalam penyiapan reaksi PCR, karena amplifikasi tidak memunculkan pita pada genus *Phlebiopsis* yang memiliki susunan DNA lebih mirip dengan *Phlebia* spp. Kontaminasi DNA merupakan hal yang mungkin terjadi dalam penggunaan penanda spesifik (Yuskianti et al., 2014), oleh karena itu penggunaan penanda spesifik untuk mendeteksi jenis-jenis jamur tertentu, misalnya pada *Phlebia* spp. memerlukan kehati-hatian karena adanya kemungkinan untuk mendapatkan amplifikasi dari jenis jamur yang lain yang masih erat kekerabatannya dengan *Phlebia* spp. Hal lain yang dapat dilakukan untuk mendapatkan penanda yang lain yang lebih spesifik untuk mendeteksi jenis-jenis tertentu adalah merancang dan mengembangkan penanda-penanda spesifik yang lain. Hal ini penting dilakukan terutama jika ada beberapa jenis *Phlebia* tertentu yang akan dikembangkan lebih lanjut sebagai APH.

IV. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa DNA dengan pengenceran 20x merupakan kondisi terbaik yang dipakai dalam proses amplifikasi fragmen DNA ITS, pasangan penanda DNA terbaik untuk mendeteksi jamur *Cerrena* sp. adalah CrF1/CrR1, sedangkan PbF2/PbR2 merupakan penanda DNA terbaik untuk mendeteksi jamur *Phlebiopsis* sp. 1. Tidak ada penanda spesifik yang mampu mendeteksi jenis jamur *Phlebia* sp. 1 dan *Phlebia* sp. 2 saja, namun PI-2F1/PI-2R4 merupakan penanda yang paling baik untuk mendeteksi jamur *Phlebia* spp.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini merupakan bagian dari proyek FST/2014/068 dengan judul “*Management Strategies for Acacia Plantation Diseases in Indonesia and Vietnam*”, yang merupakan kerjasama penelitian antara Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan,

Universitas Gadjah Mada dan University of Tasmania, yang didukung dana dari *Australian Centre for International Agriculture Research* (ACIAR). Penulis mengucapkan terimakasih kepada Morag Glen yang telah menyediakan penanda spesifik jenis untuk diuji dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, L., Francis, A., Glen, M., Indrayadi, H., & Mohammed, C. L. (2014). Signs and identification of fungal root-rot pathogens in tropical *Eucalyptus pellita* plantations. *Forest Pathology*, 44(6), 486–495. <http://doi.org/10.1111/efp.12145>
- Agustini, L., Wahyuno, D., Indrayadi, H., & Glen, M. (2014). *In vitro* interaction between *Phlebiopsis* sp. and *Ganoderma philippii* isolates. *Forest Pathology*, 44(6), 472–476. <http://doi.org/10.1111/efp.12143>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes, application to the identification of mycorrhizal and rusts. *Molecular Ecology*, 2(May 2016), 113–118. <http://doi.org/10.1111/J.1365-294x.1993.Tb00005.X>
- Glen, M., Bougher, N. L., Francis, A. A., Nigg, S. Q., Lee, S. S., Irianto, R. S. B., ... Mohammed, C. L. (2009). *Ganoderma* and *Amauroderma* species associated with root-rot disease of *Acacia mangium* plantation trees in Indonesia and Malaysia. *Australasian Plant Pathology*, 38(4), 345–356. <http://doi.org/10.1071/AP09008>
- 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? *Mycorrhiza*, 12(5), 243–247. <http://doi.org/10.1007/s00572-002-0180-y>
- Glen, M., Yuskianti, V., Puspitasari, D., Francis, A., Agustini, L., Rimbawanto, A., ... Mohammed, C. L. (2014). Identification of basidiomycete fungi in Indonesian hardwood plantations by DNA barcoding. *Forest Pathology*, 44(6), 496–508. <http://doi.org/10.1111/efp.12146>
- Irianto, R. S. B., Barry, K., Hidayati, N., Ito, S., Fiani, A., Rimbawanto, A., & Mohammed, C. (2006). Incidence and spatial analysis of root rot of *Acacia mangium* in Indonesia. *Journal of Tropical Forest Science*, 18(3), 157–165.
- Kreder, C. A. (1996). Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1102–1106.
- Mohammed, C. L., Rimbawanto, A., & Page, D. E. (2014). Management of basidiomycete root- and stem-rot diseases in oil palm, rubber and tropical hardwood plantation crops. *Forest Pathology*, 44(6), 428–446. <http://doi.org/10.1111/efp.12140>
- Prihatini, I. (2014). Identification of endophyte fungi of *Pinus radiata* needles using direct DNA extraction methods. *Jurnal Pemuliaan Tanaman*, 8(3), 30–42. Retrieved from http://forda-mof.org/files/Jurnal_pemuliaan_8.1.2015-3.Istiana.pdf
- Prihatini, I., Glen, M., Wardlaw, T. J., Ratkowsky, D. A., & Mohammed, C. L. (2015). Needle fungi in young Tasmanian *Pinus radiata* plantations in relation to elevation and rainfall. *New Zealand Journal of Forestry Science*, 45(1). <http://doi.org/10.1186/s40490-015-0055-6>
- Puspitasari, D., & Rimbawanto, A. (2010). Uji Somatik Inkompabilitas *Ganoderma philippii* untuk Mengetahui Pola Sebaran Penyakit Busuk Akar pada Tanaman *Acacia mangium*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan*.
- Puspitasari, D., Rimbawanto, A., & Hidayati, N. (2009). Karakterisasi Morfologi dan Verifikasi DNA penyebab Busuk Akar *A. mangium*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman*, 3(2), 83–93.
- Puspitasari, D., Wibowo, A., Rahayu, S., Prihatini, I., Rimbawanto, A., & No, J. A. (2016). Karakter morfologi isolat *Phlebiopsis* sp. 1 jamur pengendali hayati yang potensial untuk *Ganoderma philippii*. *Jurnal Pemuliaan Tanaman*, 10(1), 51–62.
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17–20.
- Weeden, N., Timmerman, G., Hemmat, M., Kneen, B., & Lodhi, M. (1992). Inheritance and reliability of RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc.

- Yuskianti, V., Glen, M., Puspitasari, D., Francis, A., Rimbawanto, A., Gafur, A., ... Mohammed, C. L. (2014). Species-specific PCR for rapid identification of *Ganoderma philippii* and *Ganoderma mastoporum* from *Acacia mangium* and *Eucalyptus pellita* plantations in Indonesia. *Forest Pathology*, 44(6), 477–485. <http://doi.org/10.1111/efp.12144>