

ANALISIS VARIABILITAS GENETIK *Rigidoporus microporus* (JAMUR AKAR PUTIH) PADA KARET DENGAN TEKNIK PCR-RFLP FRAGMENT ITS ¹⁾

GENETIC VARIABILITY ANALYSIS OF *Rigidoporus microporus* (WHITE ROOT ROT FUNGUS) OF RUBBER BY PCR-RFLP FRAGMENT ITS TECHNIQUE

Ria Novianti²⁾, Haryono Semangun³⁾, Ferry F. Karwur^{*3)}, dan Martanto Martosupono³⁾

²⁾Mahasiswa Program Studi Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Salatiga

³⁾Program Studi Magister Biologi, Universitas Kristen Satya Wacana, Jln. Diponegoro 52–60, Salatiga 50711

*Penulis untuk korespondensi. E-mail: fkwur@yahoo.com

ABSTRACT

The eleven isolates studied fell into two groups, which showed that the fungus did not have high genetic variability. Isolates from diseased rubber trees in shorter vicinities, which were due to pathogen's vegetative spread through root contact, have close genetic relationship. Meanwhile isolates from far apart trees, either in one estate or from different islands, does not necessarily have distant genetic relationship. It might be due to the fact that long distance dispersal of the disease could also due to rhizomorph contaminating rubber stumps. PCR-RFLP Fragment ITS Techniques can be applied to study genetic relationship of *Rigidoporus microporus* isolates. It is expected that the technique will be applied with more isolates from different provinces by using additional different restriction enzymes.

Keywords: genetic variability, PCR-RFLP Fragment ITS Technique, *Rigidoporus microporus*, white root rot of rubber

INTISARI

Kesebelas isolat yang diteliti terbagi ke dalam dua kelompok, yang menunjukkan bahwa jamur ini tidak mempunyai variabilitas genetik yang tinggi. Isolat-isolat dari pohon karet sakit yang letaknya berdekatan, yang terjadi karena penularan vegetatif melalui kontak akar, mempunyai hubungan kekerabatan genetik yang erat. Isolat-isolat dari pohon karet sakit yang berjauhan, baik dalam satu kebun maupun dari pulau lain, tidak selalu mempunyai hubungan kekerabatan genetik yang jauh. Ini dapat disebabkan karena adanya penyebaran penyakit jarak jauh secara vegetatif dengan terbawanya rizomorf pada akar *stump*. Teknik *PCR-RFLP Fragment ITS* dapat dimanfaatkan untuk penelitian kekerabatan *Rigidoporus microporus*. Pemakaiannya perlu diperluas dengan pengumpulan isolat yang lebih tersebar, dengan memakai enzim restriksi yang lebih banyak.

Kata kunci: jamur akar putih karet, *Rigidoporus microporus*, variabilitas genetik, PCR-RFLP fragmen ITS.

PENGANTAR

Penyakit akar putih yang disebabkan oleh jamur akar putih (JAP) (*Rigidoporus microporus*) adalah penyakit karet yang terpenting di Indonesia dan di beberapa negara penanam karet di Asia. Sampai sekarang para penanam karet beranggapan bahwa jamur menular dengan dua cara. Pada jarak dekat dari pohon ke pohon jamur menular melalui kontak antara akar yang sakit dengan akar yang sehat. Pada jarak jauh jamur dapat menular dengan basidiospora yang terbawa oleh angin. Spora yang jatuh pada tonggak yang masih baru akan berkembang menginfeksi tonggak dan dari sini jamur menginfeksi ke pohon sehat di dekatnya melalui kontak akar (Semangun, 2008).

Jika diperhatikan inti hifa jamur akar putih maupun Polyporaceae pada umumnya, basidiospora adalah haploid (n), berkembang membentuk hifa

primer haploid yang tidak dapat tahan lama. Basidiospora yang lain akan berkembang menjadi hifa primer haploid (n) yang akan bersatu dengan hifa haploid yang pertama untuk membentuk hifa sekunder yang diploid (2n) yang dapat tahan lama, yang pada waktunya akan membentuk tubuh buah (basidioma) diploid (2n). Tubuh buah akan membentuk basidium diploid (2n), yang setelah mengalami pembelahan reduksi (meiosis) akan membentuk basidiospora haploid (n) (Campbell *et al.*, 2003).

Penularan jarak dekat terjadi secara vegetatif oleh hifa sekunder, yang juga disebut secara klonal, dan diperkirakan menghasilkan sifat genetik yang sama. Sedangkan hasil penularan jarak jauh dengan spora akan menghasilkan hifa sekunder yang mempunyai perbedaan dengan hifa yang pertama karena adanya pencampuran inti dari dua basidiospora.

¹⁾ Pemah dikemukakan dalam Kongres Nasional XX Perhimpunan Fitopatologi Indonesia (PFI) dan Seminar Ilmiah, Makassar, 4–7 Agustus 2009

Penularan jarak jauh dapat dikatakan terjadi secara generatif melalui persatuan inti. Dengan asumsi seperti ini diharapkan bahwa dengan teknik molekuler tertentu akan dapat dilihat persamaan dan perbedaan antara miselium hasil penularan jarak dekat dengan hasil penularan jarak jauh.

Penelitian hubungan kekerabatan dapat dilakukan dengan beberapa cara. Hamidson dan Naito (2003) dan Suwandi (2007) meneliti kekerabatan isolat-isolat *R. microporus* dengan mengamati kompatibilitas somatiknya. Dalam penelitian ini para peneliti mempertimbangkan teknik yang dikembangkan oleh Jasalavich *et al.* (2000) untuk mendeteksi dan mengidentifikasi jamur Basidiomycota yang menyerang kayu dengan Analisis *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Farid *et al.* (2006) telah memanfaatkan teknik PCR untuk mendeteksi secara spesifik jamur akar putih, *R. microporus*.

Penelitian ini didasarkan atas dua hipotesis: (1) Isolat *R. microporus* dari pohon sakit yang letaknya berdekatan mempunyai hubungan kekerabatan yang erat, dan (2) Isolat dari pohon sakit yang letaknya berjauhan mempunyai hubungan kekerabatan yang kurang erat. Penularan jarak dekat terjadi melalui kontak antara miselium dengan hifa-hifa diploid secara vegetatif. Penularan jarak jauh terutama terjadi melalui basidiospora haploid yang membentuk hifa haploid, yang untuk perkembangannya perlu berhubungan dengan hifa haploid lain. Di sini terjadi perkembang biakan secara generatif (seksual). Terdapat kemungkinan pemencaran (*dispersal*) jarak jauh yang terjadi karena pengangkutan *stump* karet yang terinfeksi atau membawa rizomorf *R. microporus*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini memakai 11 isolat *R. microporus*. Tujuh isolat diisolasi dari Kebun Merbuh (Semarang) dan Kebun Blimbing (Pekalongan). Empat isolat dari Balai Penelitian Karet Getas, Salatiga, yang berasal dari Kebun Widodaren (Jember), Kebun Cikumpay (Purwakarta,), Kebun Warnasari (Cilacap), dan Kebun Balai Penelitian Sungei Putih (Deli Serdang, Sumatera Utara) (Tabel 1).

Isolasi *R. microporus* dilakukan dengan cara yang dipakai di Balai Penelitian Karet Getas. Rizomorf dicuci dengan air bersih, didesinfestasi dengan sublimat 0,1%, dibilas dengan akuades steril, dipotong-potong dan diletakkan di atas media PDA dalam cawan petri yang diberi 1 tetes asam laktat 25%. Untuk menguji bahwa isolat yang diperoleh adalah *R. microporus*, dilakukan *Postulat Koch* dengan penginokulasian isolat pada potongan-potongan akar karet sehat dalam tabung-tabung gelas steril.

Isolasi DNA dilakukan dari miselium berumur 2 minggu. DNA yang diperoleh digandakan dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Primer yang digunakan adalah sepasang primer oligonukleotida, yaitu primer maju (*forward primer*) dan primer mundur (*reverse primer*). Hasil PCR dipotong dengan enzim *HaeIII*, *MspI*, dan *HinfI*, dilanjutkan dengan elektroforesis dan deteksi fragmen-fragmen DNA berdasarkan ukurannya. Selanjutnya dilakukan analisis polimerase pita DNA, diikuti dengan analisis filogenetik dengan program UPGMA (*Unweight Pairs Group Marker Analysis*) sehingga diperoleh dendrogram.

Dalam teknik PCR-RFLP, DNA diisolasi dari 0,5 g miselium dari masing-masing isolat (11

Tabel 1. Nama dan asal isolat *Rigidoporus microporus* yang diteliti

No. Sampel	Nama	Letak tanaman sakit dari Kebun	Keterangan
1.	1AM	Merbuh, Semarang, Jawa Tengah	
2.	2AM	Merbuh, Semarang, Jawa Tengah	Berjarak 8 m dari 1AM
3.	AK	Merbuh, Bagian Kaliwringin, Semarang, Jawa Tengah	Berjarak l.k. 1500 m dari 1AM dan 2AM
4.	1ABW	Blimbing, Bag. Buwaran, Pekalongan, Jawa Tengah	
5.	2ABW	Blimbing, Bag. Buwaran, Pekalongan, Jawa Tengah	Berjarak 3 m dari 1ABW
6.	3ABW	Blimbing, Bag. Buwaran, Pekalongan, Jawa Tengah	Berjarak 5 m dari 1ABW
7.	ABL	Blimbing, Bag. Blimbing, Pekalongan, Jawa Tengah	Berjarak l.k. 1500 m dari 1ABW, 2ABW, dan 3ABW
8.	KSW	Warnasari, Cilacap, Jawa Tengah	
9.	KWD	Widodaren, Jember, Jawa Timur	
10.	KC	Cikumpay, Purwakarta, Jawa Barat	
11.	KPSP	Puslit Karet Sungei Putih, Deli, Serdang, Sumatera Utara	

isolat), umur dua minggu pada suhu 25°C), penggerusan dengan nitrogen cair, dengan buffer alkali (Tris-EDTA, pH 8.0; NaCl 1,4 M, 2% PVC 40.000; 0,2% merkaptiohanol; dengan 10% SDS). Potongan DNA target, yakni DNA *Internal Transcribed Spacers* (ITS) yang terletak di antara gen pengkode 18S RNA dan 25S RNA diamplifikasi menggunakan primer ITS1-F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') dan ITS4-B (5'-CAG GAG ACT TGT ACA CGG TCC AG-3'). PCR dilakukan sebanyak 35 siklus, dengan suhu daur PCR: (a) denaturasi 95°C 35 detik, (b) penempelan primer 60°C 55 detik, dan (c) sintesis-pemanjangan DNA 72°C 1 menit. Hasil PCR dengan pita tunggal ±900 pb (pasangan basa dari 11 isolat), kecuali isolat 2ABW, masing-masing dipotong secara terpisah dengan berturut-turut enzim restriksi *HaeIII*, *MspI*, dan *HinfI*, pada suhu 37°C selama 3 jam. Hasil pemotongan enzimatis dielektroforesis menggunakan 2% agarosa, diamati di bawah UV Transilluminator 2000, dan difoto menggunakan kamera Canon Powershot A430. Kehadiran fragmen hasil pemotongan enzimatis dilakukan menggunakan teknik matriks, dengan mengidentifikasi setiap potongan yang ada, dan dengan menaksir ukurannya berdasarkan penanda ukuran yang ada. Data dimasukkan ke dalam matriks pada program NTSYSpc2.0., dan analisis dendrogram menggunakan Program UPGMA (*Unweight Pairs Group Marker*).

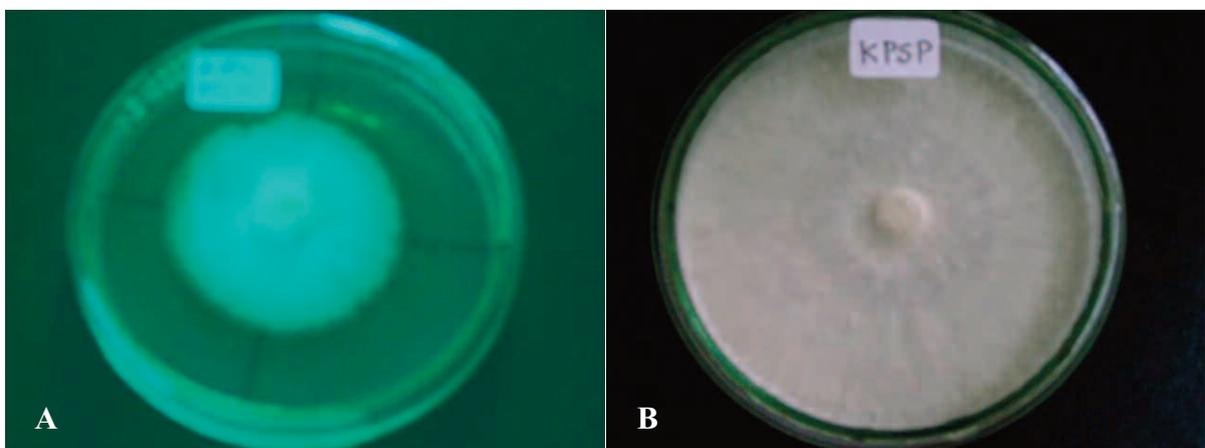
HASIL DAN PEMBAHASAN

Ke-11 isolat *R. microporus* mempunyai morfologi dan kecepatan tumbuh yang agak bervariasi. Isolat 1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC miseliumnya sangat mirip satu dengan yang lain, terdiri atas hifa yang halus,

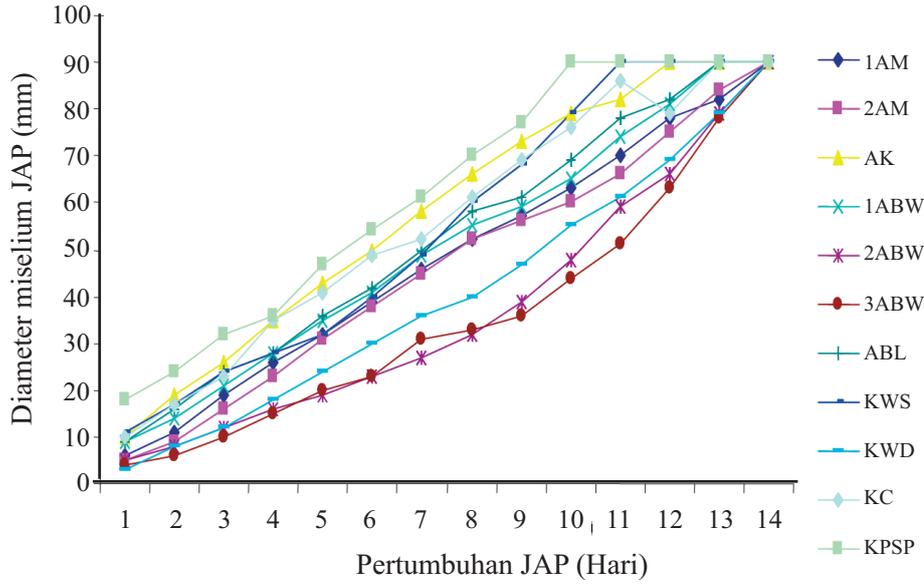
berstruktur radier. Isolat AK dan KPSP mempunyai banyak persamaan, mempunyai hifa yang lebih halus, membentuk struktur radier, miselium terlihat mempunyai lingkaran-lingkaran konsentris (Gambar 1). Urutan kecepatan pertumbuhan miselium berturut-turut adalah KPSP, KWS, AK, ABL, 1ABW, KC, 1AM, 2AM, 2ABW, 3ABW, dan KWD. Miselium KPSP sudah memenuhi cawan petri pada hari ke-10, sedang KWD baru pada hari ke-14 (Gambar 2).

Hasil amplifikasi PCR dilakukan 2 kali untuk tiap DNA isolat. Kesebelas isolat yang telah diamplifikasi dengan primer ITS1-F dan ITS4-B semua menghasilkan pita DNA tunggal berukuran 900 pb. Ini membuktikan bahwa pasangan primer universal untuk Basidiomycota sesuai untuk identifikasi *R. microporus* (Gambar 3). Untuk melihat variasi atau keragamannya, pita DNA hasil PCR dipotong dengan enzim *HaeIII*, *MspI*, dan *HinfI*. Terlihat bahwa DNA hasil PCR dapat terpotong dengan enzim *HaeIII*. Isolat 1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC terpotong menjadi 2 pita dengan ukuran 350 pb dan 550 pb, sedangkan isolat AK dan KPSP terpotong menjadi 3 pita dengan ukuran 250 pb, 300 pb, dan 350 pb (Gambar 4).

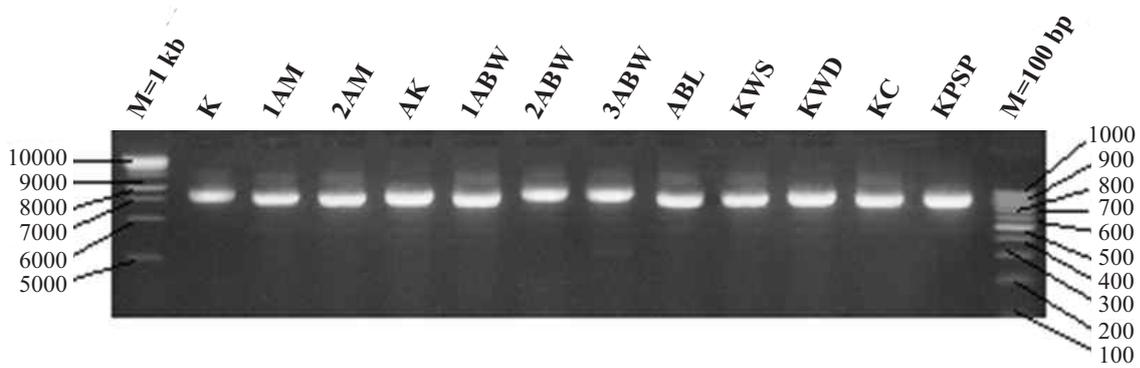
Hasil pemotongan dengan enzim *MspI* menunjukkan bahwa dari 11 isolat ada 2 isolat yang tidak terpotong DNA-nya, yaitu isolat AK dan KPSP, sedangkan isolat 1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC terpotong menjadi 3 pita pada ukuran 100 pb, 350 pb, dan 450 pb (Gambar 5). Dengan enzim *HinfI* terlihat bahwa kesebelas isolat terpotong menjadi 4 pita. Isolat 1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC terpotong pada ukuran 125 pb, 200 pb, 225 pb, dan 350 pb. Sedangkan isolat AK dan



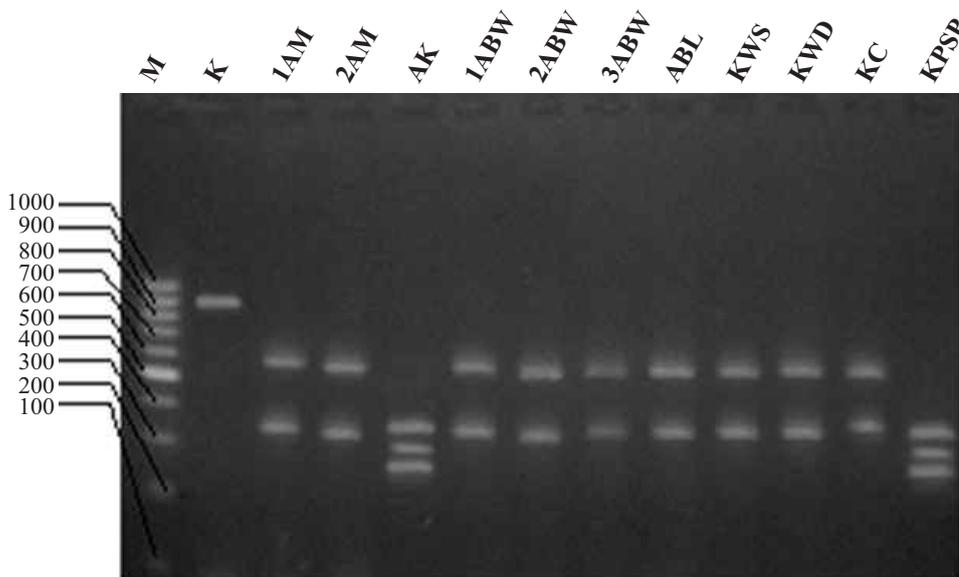
Gambar 1. Perbandingan morfologi miselium isolat 1AM (A) dan KPSP (B) umur 10 hari



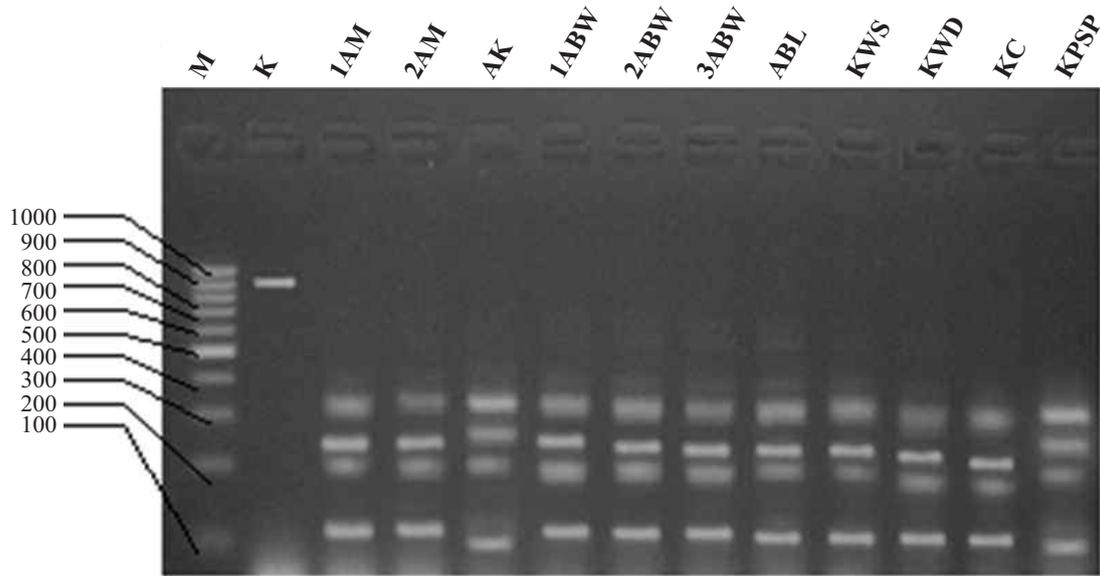
Gambar 2. Grafik kecepatan pertumbuhan isolat-isolat jamur akar putih (JAP)



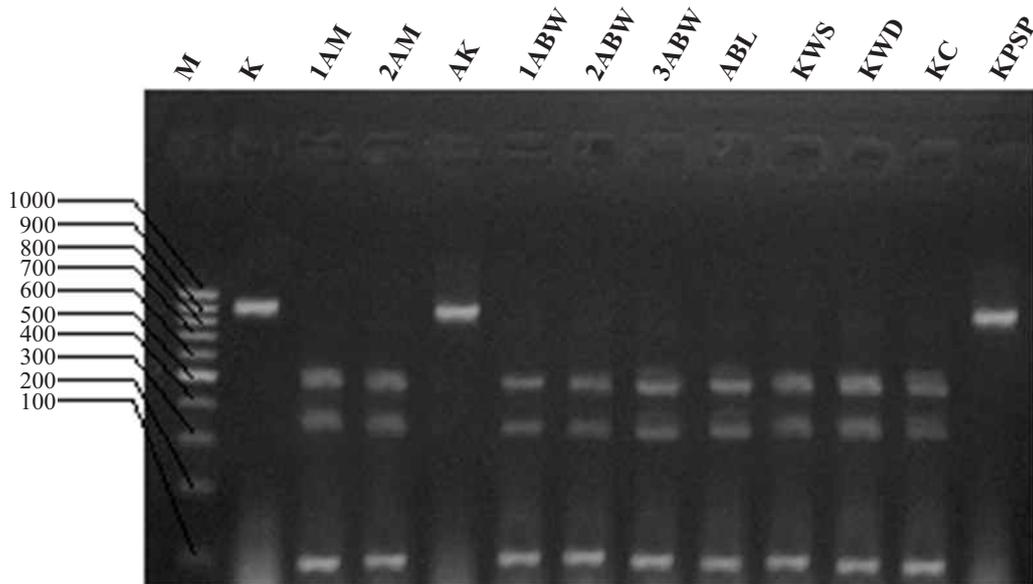
Gambar 3. Pita DNA tunggal 900 pb hasil amplifikasi DNA dari 11 isolat jamur akar putih (JAP) dengan primer ITS1-F dan ITS4-B



Gambar 4. Pita-pita berukuran 350 pb dan 550 pb (1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC); 250 pb, 300 pb, dan 350 pb (AK dan KPSP) hasil restriksi produk PCR dengan enzim *HaeIII*; K adalah kontrol produk PCR tanpa pematangan



Gambar 5. Pita-pita berukuran 100 pb, 350 pb, dan 450 pb (1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC); 900 pb (AK dan KPSP) hasil restriksi produk PCR dengan enzim *MspI*; K adalah kontrol produk PCR tanpa pemotongan

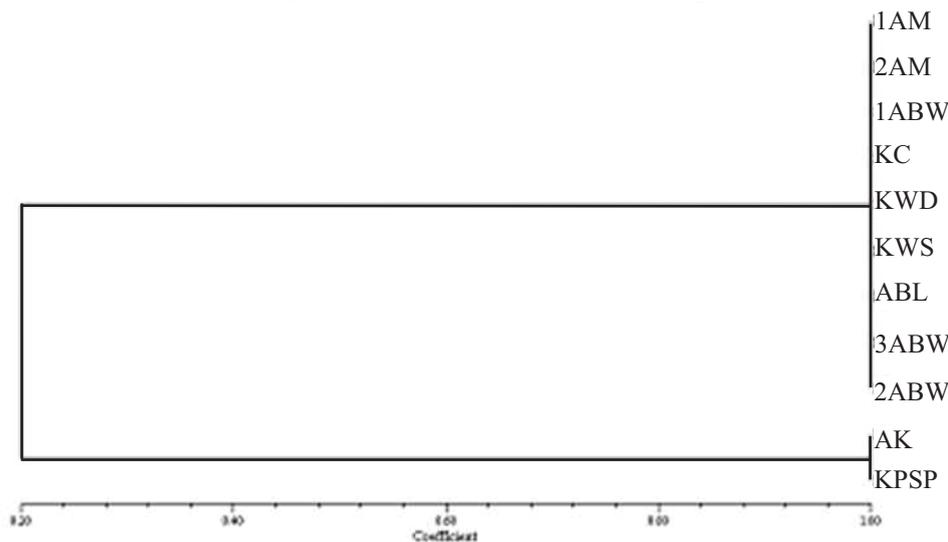


Gambar 6. Pita-pita berukuran 125 pb, 200 pb, 225 pb, dan 350 pb (1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC); 100 pb, 200 pb, 250 pb, dan 350 pb (AK dan KPSP) hasil restriksi produk PCR dengan enzim *HinfI*; K adalah kontrol produk PCR tanpa pemotongan

KPSP pada ukuran 100 pb, 200 pb, 250 pb, dan 350 pb (Gambar 6).

Hasil analisis filogenetik mengenai hubungan kekerabatan *R. microporus* yang diolah dengan program UPGMA menghasilkan dendrogram yang tertera pada Gambar 7. Terlihat adanya 2 kelompok kekerabatan pada isolat-isolat yang diteliti. Kelompok 1 terdiri atas isolat 1AM, 2AM, 1ABW, 2ABW, 3ABW, ABL, KWS, KWD, dan KC. Kelompok 2 terdiri atas isolat AK dan KPSP.

Dalam penelitian ini terlihat adanya hasil yang sesuai antara penelitian morfologi dan fisiologi dengan penelitian genetik lewat penanda DNA. Kedua cara menunjukkan adanya dua kelompok di antara isolat-isolat yang diteliti. Semua isolat dari pohon-pohon sakit yang berdekatan mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat erat, yang terlihat dari morfologi dan kecepatan tumbuh miselium, dan dari analisis dengan pemotongan-pemotongan DNA.



Gambar 7. Pohon filogenetik isolat jamur akar putih (JAP) yang menunjukkan tingkat kekerabatan dengan pemotongan enzim *HaeIII*, *MspI*, dan *HinfI*

Isolat yang asalnya berjauhan, dalam satu kebun ataupun dari pulau lain, tidak semuanya mempunyai hubungan kekerabatan yang jauh. Isolat KPSP dan isolat AK yang asalnya sangat berjauhan, bahkan berbeda pulau, mempunyai hubungan kekerabatan yang sangat erat. Demikian juga isolat-isolat 1AM, ABL, KWS, KWD, dan KC yang berbeda provinsi. Memang, di sini terdapat kemungkinan bahwa isolat yang berjauhan itu bukan hasil pemencaran lewat spora secara generatif, tetapi secara vegetatif misalnya lewat rizomorf yang melekat pada *stump* karet yang diangkut jarak jauh. Ini menekankan pentingnya pemencaran jamur akar putih sebagai rizomorf yang terbawa oleh *stump* karet.

Dari penelitian ini diketahui juga bahwa secara molekuler kedua kelompok *R. microporus* tersebut mempunyai perbedaan yang cukup tegas. Untuk mengetahui apakah kedua kelompok itu masih tergolong dalam satu spesies perlu dilakukan penelitian kompatibilitas somatik seperti yang dilakukan oleh Hamidson & Naito (2004) dan Suwandi (2007). Masih diperlukan penelitian untuk mende-tekstinya adanya varian di dalam kedua kelompok tersebut.

KESIMPULAN

1. Isolat jamur akar putih (*Rigidoporus microporus*) dari pohon sakit yang berdekatan mempunyai hubungan kekerabatan yang erat.
2. Isolat dari pohon sakit yang berjauhan, yang bukan terjadi karena penularan lewat kontak akar, tidak selalu mempunyai hubungan kekerabatan yang jauh, karena adanya kemungkinan pemencaran karena rizomorf yang terbawa *stump*.

DAFTAR PUSTAKA

- Campbell, N.A., J.B. Reece, & L.G. Mitchell. 2003. *Biologi* edisi kelima. Jilid II. (diterjemahkan dari: *Biology*, 5th ed., penerjemah: W. Manalu). Erlangga, Jakarta. 404 p.
- Farid, A.M., S.S. Lee, H. Mohd. Rosli, & M. Patahayah. 2006. *Specific Detection of the White Root Disease Fungus, Rigidoporus lignosus, through a PCR-based Technique*. Univ. Sains Malaysia, Penang.
- Hamidson, S.H. & S. Naito. 2004. Distribution of *Rigidoporus lignosus* Genotypes in a Rubber Plantation, as Revealed by Somatic Compatibility. *Mycoscience* 45: 72–75.
- Jasalavich, C.A., A. Ostrofsky, & J. Jellison. 2000. Detection and Identification of Decay Fungi in Spruce Wood by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Genes Encoding rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 4725–4734.
- Semangun, H. 2007. White Root Disease of Rubber: Some of its Biological Aspects, p. 60–67. In S. Prawirosoemardjo, B. Setyawan, H. Suryaningtyas, M. Supriadi (eds.), *Proceeding of International Workshop on White Root Disease of Hevea Rubber*, Salatiga, 28–29 November 2006.
- Semangun, H. 2008. *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. ed. kedua, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 835 p.
- Suwandi. 2007. Mode of Dispersal and Variation in Population of White Root Fungus *Rigidoporus microporus* as Revealed by Mycelial Incompatibility, p. 68–75. In S. Prawirosoemardjo, B. Setyawan, H. Suryaningtyas, M. Supriadi (eds.), *Proceeding of International Workshop on White Root Disease of Hevea Rubber*, Salatiga, 28–29 November 2006.