

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE III

Tema:

*Kontribusi Sains untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana pada Daerah Kepulauan*



Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Pattimura
Ambon 2010

ISBN : 978-602-97522-0-5

PROSEDING

SEMINAR NASIONAL BASIC SCIENCE II

Kontribusi Sains Untuk Pengembangan Pendidikan,
Biodiversitas dan Mitigasi Bencana
Pada Daerah Kepulauan



SCIENTIFIC COMMITTEE:

Prof. H.J. Sohilait, MS
Prof. Dr. Th. Pentury, M.Si
Dr. J.A. Rupilu, SU
Drs. A. Bandjar, M.Sc
Dr.Ir. Robert Hutagalung, M.Si

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS PATTIMURA
AMBON, 2010**

2 Juli 2010

PROFIL RIBOSOMAL DNA ISOLAT *PHYTOPHTHORA PALMIVORA* (BUTL.) ASAL KELAPA, KAKAO, DAN LADA

Anneke Pesik

*Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Pattimura, Kotak Pos 95 Jalan Ir. M. Putuhena,
Kampus Poka Ambon 97233, Tel.+62-911-3825055*

ABSTRAK

Phytophthora palmivora merupakan cendawan patogen yang menyebabkan penyakit busuk pucuk dan gugur buah pada tanaman kelapa, penyakit busuk buah pada kakao dan penyakit busuk pangkal batang pada lada. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi profil DNA isolat *P. palmivora* yang berasal dari tanaman kelapa, kakao, dan lada. Penelitian dilakukan secara molekuler menggunakan teknik PCR fragmen ribosomal DNA (rDNA) dengan pasangan primer ITS-1 dan ITS-4, yang dilanjutkan dengan pemotongan hasil PCR menggunakan enzim restriksi *Hinf-I* (G^{\downarrow} ANTC). Hasil PCR untuk sepuluh koleksi isolat *P. palmivora* mengalami pemanjangan fragmen rDNA sampai 900 pasang basa (pb). Identifikasi profil DNA setelah pemotongan dengan enzim restriksi *Hinf-I* pada produk PCR menghasilkan tiga profil DNA. Pertama, isolat *P. palmivora* penyebab gugur buah kelapa Sulawesi Utara, Jawa Barat dan Sulawesi Tengah; penyebab busuk pucuk kelapa Sulawesi Utara dan Sumatera Utara; penyebab busuk buah kakao Sumatera Utara, Jawa Timur dan Sulawesi Utara pada panjang 140, 160, 260 dan 320 pb. Kedua, isolat penyebab busuk pangkal batang lada Jawa Barat terpotong pada panjang 120, 140, 160 dan 300 pb. Ketiga, isolat penyebab gugur buah kelapa Sumatera Utara yang terpotong pada panjang 160 dan 340 pb.

Kata kunci: Phytophthora palmivora, PCR, rDNA, primer ITS

PENDAHULUAN

Cendawan *Phytophthora palmivora* (Butl.) merupakan patogen yang penting pada berbagai jenis tanaman tahunan dan semusim di daerah tropis. Pengaruh langsung berupa kematian tanaman yang sangat drastis di semua areal pertanaman. Beberapa daerah pertanaman kelapa di Indonesia, kehilangan hasil akibat penyakit busuk pucuk dan gugur buah tiap tahun mencapai 50% (Bennett *et al*, 2002), untuk penyakit busuk buah kakao besarnya kerugian sangat berbeda antar areal pertanaman satu dengan yang lainnya, variasinya antara 26% sampai 50% tiap tahun (Semangun, 1998), sedangkan untuk penyakit busuk pangkal batang lada dapat mengakibatkan kerusakan lebih dari 80% pada areal pertanaman lada di Indonesia (Asnawi, 2001).

2 Juli 2010

Kisaran inang patogen ini makin besar karena daya adaptasinya terhadap suatu tanaman relatif sangat tinggi. Hal ini berhubungan dengan pola genetiknya yang sangat bervariasi karena sebagian bersifat heterotalik, sehingga dapat menghasilkan turunan yang bervariasi dengan karakteristik induk yang berbeda (Ho, 2001). Spesies dalam genus *Phytophthora* menunjukkan banyak variasi genetik baik karakter makroskopis maupun mikroskopis. Identifikasi dan karakterisasi *Phytophthora* menggunakan karakter morfologi ditentukan secara subjektif oleh pengetahuan dan pengalaman peneliti, karena beberapa karakter saling tumpang tindih antar spesies dan variasi yang sangat nyata antar isolat dalam spesies yang sama. Karakter morfologi berupa bentuk dan diameter koloni, bentuk sporangium, perbandingan panjang dan lebar sporangium. Dengan teknik molekuler analisis variasi dalam populasi atau mengidentifikasi isolat dan mutan dapat dilakukan. Pendekatan secara molekuler memiliki metode yang akurat untuk identifikasi patogen, mendeteksi keberadaan patogen dan variasi antar spesies pada perubahan satu basa (Schlick *et al*, 1994). Analisis asam nukleat mempunyai kelebihan dibandingkan dengan pengamatan morfologis, sebab struktur DNA hanya sedikit mengalami perubahan yang diakibatkan oleh lingkungan (Turner *et al*, 2001).

Berbagai pendekatan molekuler dapat digunakan untuk membedakan spesies *Phytophthora* termasuk analisis fragmen genom random, DNA mitokondria, dan ribosomal DNA (rDNA). *Internal Transcribed Spacer* (ITS) adalah sekuens nukleotida non fungsional yang menjadi pemisah di antara daerah yang mengkode rDNA dan menjadi faktor variasi yang sangat umum terjadi pada cendawan. ITS dan *Polimerase Chain Reaction* (PCR) dapat menentukan keragaman di dalam spesies *Phytophthora* spp. PCR adalah suatu metode enzimatik untuk melipatgandakan secara eksponensial suatu sekuens nukleotida tertentu secara in-vitro (Yuwono, 2006). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil DNA cendawan *P. palmivora* pada tanaman kelapa, kakao dan lada menggunakan teknik PCR.

MATERI DAN METODE

Penyediaan isolat. Isolat *P. palmivora* ditumbuhkan pada media V-8 cair selama ± 3 hari, media cair yang telah ditumbuhi cendawan disaring dengan kertas saring steril, miselium dimasukkan pada tabung eppendorf. Tambahkan 500 μL TE buffer dan disimpan dalam freezer selama 1 hari (Smith, 2001).

2 Juli 2010

Ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA *P. palmivora* dilakukan menggunakan metode Smith (2001). Miselium disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit lalu ditambahkan 300 μ L buffer ekstraksi dan gerus miselium dengan drill, tambahkan 150 μ L natrium asetat 3 M diaduk dan simpan dalam freezer selama 15 menit. Sentrifugasi dilakukan kembali pada 13.000 rpm selama 15 menit dan supernatannya dipindahkan ke dalam tabung eppendorf yang baru dan dihitung volume supernatan tersebut menggunakan pipet mikro (Pipetman®, Gilson Inc.). Tambahkan isopropanol sebanyak volume supernatan yang dipindahkan kemudian diaduk. Tabung eppendorf disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 10 menit dan dibuang supernatannya. Cuci lapisan endapan DNA dengan ethanol 70%, dan disentrifugasi kembali pada kecepatan yang sama selama 10 menit, buang supernatannya dan keringkan dalam desikator. Tambahkan TE buffer dan simpan endapan DNA dalam freezer.

Amplifikasi sekuen ITS-DNA. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR untuk fragmen rDNA berdasarkan metode Smith (2001) menggunakan primer universal *forward* ITS-1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' dan primer *reverse* ITS-4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al*, 1990). Volume akhir setiap reaksi PCR adalah 50 μ L terdiri atas : ddH₂O 30,75 μ L, PCR buffer 5 μ L, dNTP 4 μ L, Primer ITS-1 2,5 μ L, Primer ITS-4 2,5 μ L, *Taq* DNA Polimerase 0,25 μ L, sampel DNA 5 μ L. Amplifikasi DNA menggunakan mesin Gene Amp PCR System 9700 dengan tahapan sebagai berikut (Smith, 2001): tahap pra amplifikasi pada suhu 94°C selama 4 menit, tahap pemisahan utas pada suhu 94°C selama satu menit, tahap sintesis pada suhu 60°C selama 1 menit, tahap pasca amplifikasi 72°C selama 5 menit. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 34 siklus. Selanjutnya, hasil PCR dielektroforesis. Sebanyak 5 μ L DNA hasil amplifikasi ditambahkan 5 μ L loading buffer, dipisahkan dengan elektroforesis dalam gel agarosa 1%, diwarnai dengan ethidium bromida selama \pm 45 menit dan dibilas dengan aquades. Pita DNA hasil amplifikasi diamati di atas lampu UV transilluminator dan dibuatkan foto Polaroid™.

Pemotongan menggunakan Enzim Restriksi. Larutan dengan volume 20 μ L terdiri dari: DNA 2 μ L, buffer 4 μ L, enzim restriksi *Hinf*-I 2 μ L, aquades 12 μ L. Inkubasi selama satu malam pada suhu 37°C, dimasukkan dalam freezer selama 10 menit. Tambahkan loading buffer 5 μ L dan disimpan dalam inkubator pada suhu 60°C selama 15 menit. Selanjutnya, hasil pemotongan dielektroforesis seperti langkah sebelumnya.

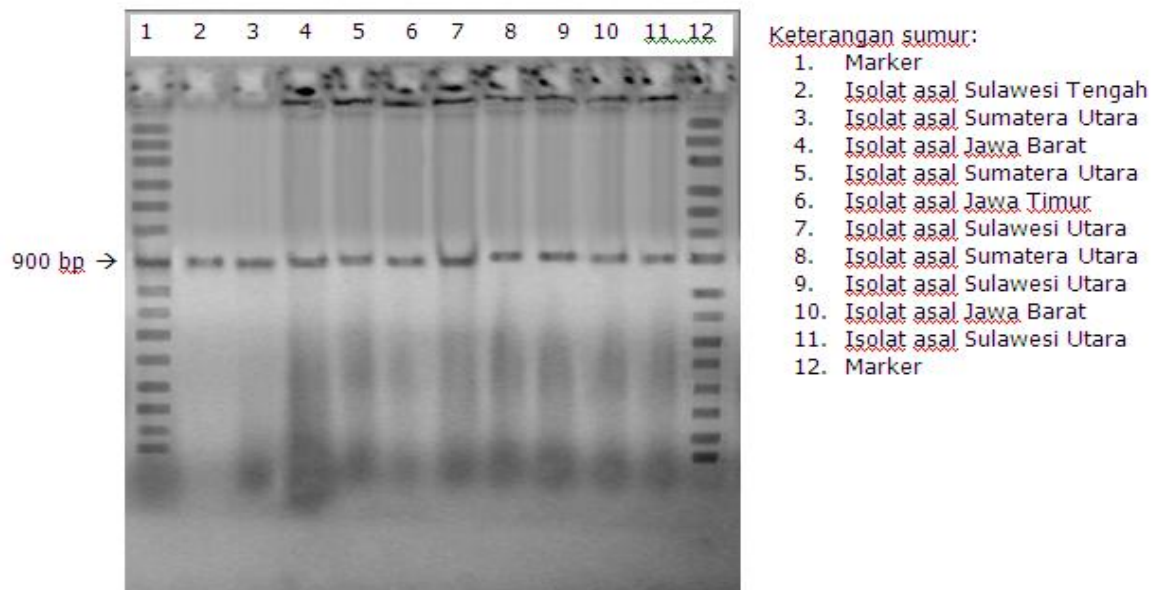
2 Juli 2010

HASIL DAN PEMBAHASAN

Profil DNA yang terbentuk setelah proses amplifikasi rDNA dari sepuluh isolat *P. palmivora* dengan teknik PCR yang menggunakan pasangan primer ITS-1 dan ITS-4, dapat dilihat pada Gambar 1.

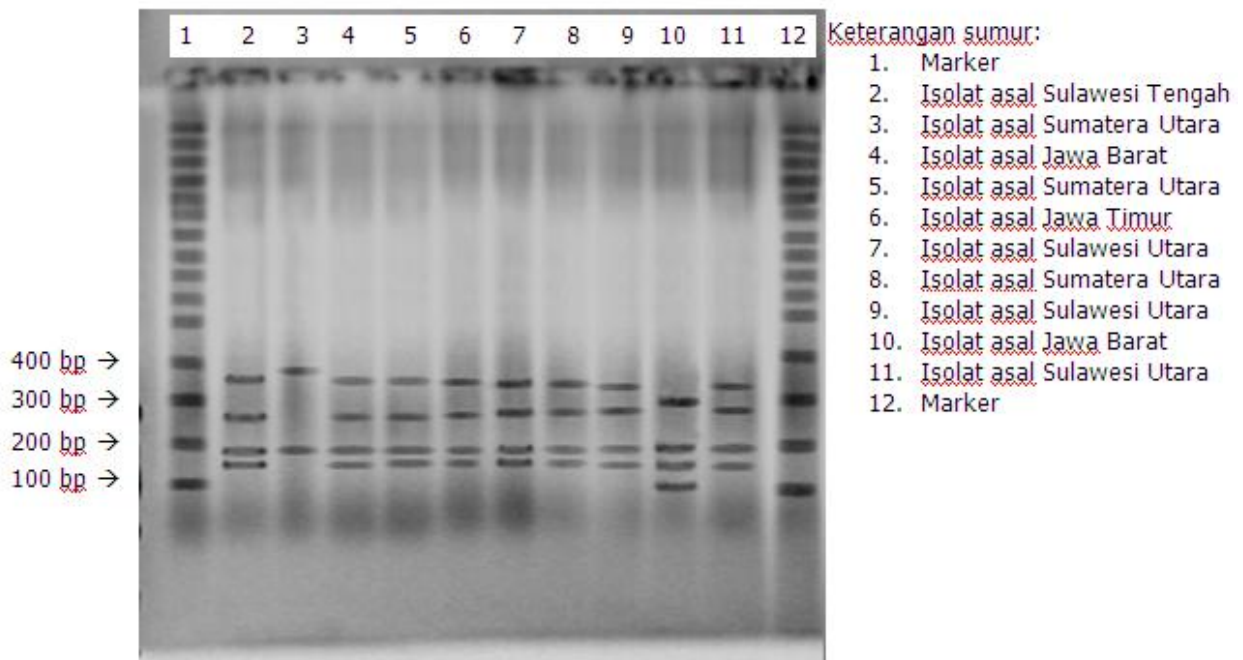
Ribosomal DNA *P. palmivora* yang diamplifikasi oleh pasangan primer ITS-1 dan ITS-4, terhadap 10 isolat koleksi menghasilkan satu pita rDNA yang berukuran 900 pb (Gambar 1). Ukuran pita DNA ini merupakan spesies *P. palmivora* penyebab gugur buah dan busuk pucuk kelapa, busuk buah kakao dan busuk pangkal batang lada. Hasil amplifikasi DNA 900 pb sesuai dengan hasil yang diperoleh Umayu (2004).

Pemanjangan fragmen rDNA *Phytophthora sp.* dengan teknik PCR hanya sampai 900 pb. Hal ini terjadi karena pasangan primer ITS 1 dan ITS 4 hanya mampu menambah nukleotida hingga mencapai ukuran tersebut, bila dipasangkan dengan potongan pita rDNA *Phytophthora spp* (Smith, 2001). Hasil amplifikasi PCR dari 10 isolat tersebut dilakukan pemotongan fragmen DNA linier oleh enzim restriksi *Hinf*-I, dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Hasil amplifikasi rDNA beberapa isolat *Phytophthora palmivora*.

Isolat pada sumur 2,3,4, & 9 penyebab gugur buah kelapa, sumur 7 & 8 penyebab busuk pucuk kelapa. Isolat pada sumur 5,6, & 11 adalah penyebab busuk buah kakao. Isolat pada sumur 10 penyebab busuk pangkal batang lada.



Gambar 2. Hasil pemotongan amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer ITS-1 dan ITS- 4 oleh enzim restriksi *Hinf*-I.

Dari Gambar 2 terlihat bahwa profil rDNA pada hasil elektroforesis memperlihatkan enzim restriksi *Hinf*-I yang digunakan dapat memotong rDNA genom isolat *P. palmivora* penyebab busuk buah kakao Sulawesi Utara, Sumatera Utara dan Jawa Timur; penyebab gugur buah kelapa Sulawesi Utara, Jawa Barat dan Sulawesi Tengah; dan penyebab busuk pucuk kelapa Sumatera Utara dan Sulawesi Utara, pada panjang sekitar 140, 160, 260 dan 320 pb. Penyebab busuk pangkal batang lada Jawa Barat dipotong pada panjang sekitar 120, 140, 160 dan 300 pb; dan pada penyebab gugur buah kelapa Sumatera Utara, dipotong pada panjang sekitar 160 dan 340 pb.

Tabel 1. Interpretasi profil DNA hasil pemotongan enzim restriksi *Hinf*-I.

Nomor Sumur	Marker dan sampel DNA 10 isolat <i>P. palmivora</i>	Asal	Profil DNA pb
1.	Marker		
2.	Penyebab gugur buah kelapa	Sulawesi Tengah	140,160,260,320
3.	Penyebab gugur buah kelapa	Sumatera Utara	160, 340
4.	Penyebab gugur buah kelapa	Jawa Barat	140,160,260,320
5.	Penyebab busuk buah kakao	Sumatera Utara	140,160,260,320

2 Juli 2010

6.	Penyebab busuk buah kakao	Jawa Timur	140,160,260,320
7.	Penyebab busuk pucuk kelapa	Sulawesi Utara	140,160,260,320
8.	Penyebab busuk pucuk kelapa	Sumatera Utara	140,160,260,320
9.	Penyebab gugur buah kelapa	Sulawesi Utara	140,160,260,320
10.	Penyebab busuk pangkal batang lada	Jawa Barat	120,140,160,300
11.	Penyebab busuk buah kakao	Sulawesi Utara	140,160,260,320
12.	Marker		

Berdasarkan hasil pemotongan enzim restriksi *Hinf*-I pada fragmen DNA tersebut, sebagian besar (80%, atau 8 isolat dari 10 koleksi) isolat *P. palmivora* walaupun berbeda habitat dan lokasi tapi masih memiliki profil rDNA yang sama. Towner dan Cockayne (2003) menyatakan bahwa enzim restriksi *Hinf*-I hanya memotong ikatan antara G dan A dalam pola urutan G[↓]ANTC. Jadi sebagian besar profil rDNA yang dimiliki isolat-isolat *P. palmivora* mempunyai pola urutan G[↓]ANTC hanya pada panjang sekitar 140, 160, 260 dan 320 pb.

Profil rDNA isolat *P. palmivora* penyebab busuk pangkal batang lada Jawa Barat, pola urutan G[↓]ANTC terdapat pada panjang sekitar 120, 140, 160 dan 300 pb; sedangkan yang menyebabkan gugur buah kelapa Sumatera Utara terletak pada panjang sekitar 160 dan 340 pb. Perbedaan hasil pemotongan kedua isolat ini menunjukkan adanya polimorfisme pita rDNA yang dihasilkan dan hal ini mencerminkan kompleksitas genom cendawan patogen asal kelapa, kakao dan lada.

Primer ITS-1 dan ITS-4 berhasil mengamplifikasi fragmen rDNA cendawan patogen menggunakan teknik PCR dengan ukuran pita 900 pb. Namun, hasil pemotongan dengan enzim restriksi menghasilkan tiga profil DNA yaitu 140, 160, 260, 320 pb; 120, 140, 160, 300 pb; dan 160, 340 pb. Perbedaan profil ini mengindikasikan adanya keragaman genetik pada tingkat DNA antar isolat asal kelapa, kakao dan lada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Balai Penelitian Kelapa Dan Palma Lain di Manado atas dukungan dana penelitian. Ucapan terima kasih juga disampaikan kepada Kepala Laboratorium Kelompok Peneliti Bidang Penyakit atas ijin pelaksanaan penelitian ini.

2 Juli 2010**DAFTAR PUSTAKA**

- Asnawi, RH. 2001. Uji ketahanan beberapa varietas lada terhadap *Phytophthora palmivora* (Butl.). Jurnal Fitopatologi Vol. 4 No. 1.
- Bennett CPA, O Roboth, G Sitepu. 2002. Aspect of the control of premature nutfall disease of coconut, *Cocos nucifera* caused by *Phytophthora palmivora* (Butl.). Prosiding Seminar Proteksi Tanaman Kelapa. Seri Pengembangan (3): 157-176.
- Ho HH. 2000. Taiwan *Phytophthora*. *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul Minnesota.
- Neinhuis J, J Tivang, P Skroch. 2002. Analysis of genetic relationships among genotypes based on molecular marker data. P 8-14. In Join Plant Breeding Simposia Series, Corvalis. CSSA. Am.Soc.Horticul.Sci and Am. Genet. Assoc.
- Schlick A, K Kuhls, W Meyer, E Lieckfeld, T Borner, K Messner. 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induces mutation in fungal DNA, implications for the identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. Current Genetic 26: 74-78.
- Semangun H. 1998. Penyakit-penyakit tanaman perkebunan di Indonesia. UGM Press. Yogyakarta.
- Smith J. 2001. User manual for selected molecular methods in the characterisation for *Phytophthora* diseases of coconut in Indonesia. CABI Bioscience UK Egham. PE 31 GAL. United Kingdom.
- Turner PC, AG McLennan, AD Bates MRH White. 2001. Instant notes in molecular biology. BIOS Scientific Publishers.
- Towner KJ, A Cockayne. 2003. Molecular methods for microbial identification and typing. Champman and Hall. London.
- Umaya A. 2004. Keragaman genetik *Phytophthora palmivora* pada kakao di Indonesia berdasarkan pendekatan molekuler. Disertasi. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Yuwono, T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chain reaction. Andi Offset. Yogyakarta.
- White TJ, T Bruns, S Lee, JW Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp.315-322. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Pr. Inc. New York.