Jurnal Penelitian Kelapa Sawit, 2003, 11 (1): 23 - 37

DESAIN PRIMER SPESIFIK UNTUK DETEKSI GANODERMA PENYEBAB PENYAKIT BUSUK PANGKAL BATANG PADA TANAMAN KELAPA SAWIT

Condro Utomo dan Daisy Tambajong

ABSTRAK

Primer set bersifat sensitif dan spesifik dalam reaksi berantai polimerase untuk deteksi Ganoderma, jamur klas basidiomycete penyebab penyakit busuk pangkal batang kelapa sawit telah didesain berdasarkan variasi sekuen pada daerah internal transcribed spacer (ITS) dari ribosom DNA. Pasangan primer-primer ini menghasilkan pita tunggal berukuran 450 bp untuk primer IT1-IT2 dan 334 bp untuk primer IT1-IT3 hanya bila digunakan DNA Ganoderma isolat kelapa sawit tetapi tidak akan menghasilkan pita apapun bila digunakan DNA jamur sapropitik yang berasosiasi dengan akar sawit. Pada pengujian sampel, Ganoderma isolat kelapa sawit yang terdapat dalam sampel akar yang diambil dari lapang dapat dideteksi dengan PCR sebelum gejala penyakit secara visual terlihat. Metoda PCR ini terbukti merupakan alat yang praktis untuk mendeteksi keberadaan Ganoderma pada akar kelapa sawit.

Kata kunci: *Kelapa sawit, Ganoderma, deteksi, primer spesifik, PCR*

ABSTRACT

Sensitive and specific primer sets for polymerase chain reaction (PCR) for oil palm Ganoderma, the basidiomycete fungus that causes basal stem rot of oil palm, were developed based on variable sequence in the internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA. These primers amplified a 450 bp fragment for primer IT1-IT2 and a 334 bp fragment for primer IT1-IT3 from DNA of oil palm Ganoderma but not DNA from any saprophytic fungi that associated with oil palm roots. In sampling studies, oil palm Ganoderma was detected by PCR from naturally infected oil palm roots, before any visible disease symptoms were present. The PCR assay provides a practical tool for detection of oil palm Ganoderma within oil palm roots.

Keywords: *Oil palm, Ganoderma, detection, specific primer, PCR*

PENDAHULUAN

Kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq.) adalah salah satu tanaman perkebunan terpenting di Indonesia. Pada tahun 1968, total areal pertanaman kelapa sawit hanya berkisar 120.000 ha tetapi pada tahun 1999 telah mencapai 2,8 juta ha, suatu peningkatan areal yang hampir 24 kali dalam 32 tahun (12).

Mulai generasi pertanaman kedua dan seterusnya, tanaman kelapa sawit terancam oleh patogen jamur, khususnya jamur *Ganoderma (Aphyllophorales, Basidiomycota)*, penyebab penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang menyerang sistem perakaran kelapa sawit.

Penyakit BPB pertama kali dilaporkan di Malaysia pada tahun 1930 dan pada waktu itu penyebab penyakitnya diidentifikasi sebagai G. lucidum (W.Curt.:Fr.) Karst. (19). Steyaert (18) kemudian mengidentifikasi 6 spesies tambahan yang berasosiasi dengan penyakit BPB pada tanaman kelapa sawit di Malaysia dan Indonesia (Sumatra) sebagai *G. boninense Pat., G. Miniatocinctum Steyaert, G. chalceum (Cooke) Steyaert, G. tornatum (Pers.) Bers., G. zonatum Murill and G. xylonoides Steyaert*. Meskipun sebanyak 15 spesies *Ganoderma* dilaporkan ditemukan berasosiasi dengan penyakit BPB (23), akan tetapi studi di Indonesia dan Malaysia menunjukkan bahwa penyakit BPB disebabkan oleh spesies tunggal yaitu *G. boninense Pat.* (7).

Salah satu faktor pembatas dalam pengendalian penyakit BPB adalah kelangkaan metoda diagnosis yang akurat untuk mendeteksi *Ganoderma* sedini mungkin. Untuk itu beberapa metoda telah dikembangkan untuk mendeteksi *Ganoderma* seperti penggunaan media semi selektif untuk menumbuhkan *Ganoderma* pada media agar di cawan petri (1), antibodi poliklonal yang diaplikasikan pada indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (24) dan reaksi berantai polimerase (PCR) (25). Pada metoda terakhir tersebut masih perlu disempurnakan karena adanya reaksi silang dengan jamur sapropitik yang bersifat kontaminan pada contoh akar.

Daerah ITS dari ribosom DNA (rDNA) telah dipilih sebagai target yang aktraktif untuk mendesain primer spesifik untuk deteksi dalam metoda PCR karena daerah tersebut secara umum bersifat hampir seragam dalam suatu spesies tetapi akan beragam sekuennya untuk spesies yang berbeda-beda (27). Sekuen daerah ITS telah terbukti berguna untuk menghasilkan primer spesifik dalam metoda PCR untuk mendeteksi jamur patogen yang menginfeksi jaringan tanaman secara alami (3, 10, 11, 20, 21).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengembangkan metoda diagnosis secara molekuker untuk mendeteksi *Ganoderma* pada tanaman sedini mungkin dengan memanfaatkan daerah ITS sebagai target untuk menghasikan primer spesifik.

BAHAN DAN METODA

Isolasi dan perbanyakan jamur

Pengumpulan tubuh buah jamur *Ganoderma* isolat kelapa sawit dilakukan dari berbagai kebun kelapa sawit di Sumatera Utara, Indonesia. Untuk isolasi *Ganoderma*, tubuh buah jamur dipotong menjadi kecil-kecil, dicelupkan dalam larutan 0,5 % sodium hypochloride selama 2 menit, dikeringkan dan kemudian dipindahkan pada media potato dextrose agar (PDA). Untuk isolasi jamur sapropitik, akar kelapa sawit sakit dicelupkan dalam larutan 0.5 % sodium hypochloride selama 1 menit

kemudian dipotong memanjang lalu dipindahkan pada media PDA. Semua jamur yang berhasil diisolasi dan digunakan dalam studi ini tertera pada Tabel 1. *Ganoderma* dan jamur sapropitik dibiakkan pada media yang berbeda: (1) media untuk *Ganoderma* (g/l); 15.0 g ekstrak malt (Difco, USA) and 5.0 g ekstrak ragi (Difco, USA) dan (2) media untuk jamur sapropitik (g/l); 34.4 g Czapek dox (Oxoid, England) dan 10.0 g ekstrak ragi (Difco, USA). Media tersebut disterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah dilakukan inkubasi pada suhu 30 °C selama 30 hari untuk*Ganoderma* dan 10 hari untuk jamur sapropitik, kemudian miselia jamur dipanen dengan jalan penyaringan dengan kertas saring Whatman No.1 dan dibilas sebanyak 2 kali dengan air steril. Miselia jamur dibeku-keringkan selama 2 hari, digiling di cawan porselin sampai halus kemudian disimpan pada suhu -20 °C sampai digunakan.

Persiapan sampel akar kelapa sawit

Tanaman kelapa sawit yang tampak sehat (tanpa terlihat gejala serangan *Ganoderma* yaitu tidak adanya pembusukan pada pangkal batang dan tidak ditemukan tubuh buah jamur) disekitar areal pertanaman kelapa sawit sakit dipilih untuk dijadikan sampel. Sampel akar dikumpulkan dari 15 kebun kelapa sawit di Sumatera Utara dengan memotong akar kelapa sawit dengan cangkul atau kapak pada kedalaman 15-20 cm dari permukaan tanah dekat pangkal batang. Sampel akar sehat dan sakit dipisahkan dan dicuci dengan air bersih.Untuk tiap sampel diambil sebanyak 3 potong akar sakit sepanjang 15 cm kemudian dipotong menjadi kecil-kecil, dicampur merata dan ditimbang (sebanyak 15 g).

Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA untuk biakan murni jamur dan sampel akar kelapa sawit sakit dilakukan dengan metoda Wang *et al.* (26) yang telah dimodifikasi oleh Utomo dan Niepold (25). Sebanyak 30 mg miselia yang telah digiling dilarutkan dalam 300 µl bufer ekstraksi Raeder dan Broda (14) atau 1,5 g akar yang telah dilarutkan dalam 1.5 ml bufer ekstraksi Raeder dan Broda (14). Larutan ekstraksi diinkubasi pada suhu 65 °C selama 60 menit kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit. Larutan bagian atas dipindahkan kedalam 20 µl NaOH 0,5 N, dipanaskan pada suhu 95 °C selama 10 menit kemudian diinkubasikan ke dalam es selama 10-30 menit. Pelet atau DNA terekstraksi dilarutan kedalam bufer Tris-HCl/BSA pH 7.8. Konsentrasi DNA diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV DU-50 (Beckman, Germany). Skala bacaan 1 dari OD_{260} berkorelasi dengan 50 µg/ml untuk „double-stranded" DNA (15). Untuk menentukan batas minimum deteksi DNA *Ganoderma* dalam reaksi PCR, DNA terekstraksi diencerkan dengan kelipatan 10. Perlakuan lain untuk mengevaluasi batas minimum dilakukan dengan mencampur meselia *Ganoderma* dengan akar kelapa sawit sehat pada berbagai rasio dan sebagai kontrol negatif dilakukan amplifikasi akar sehat kelapa sawit. Evaluasi kekhususan primer dilakukan amplifikasi DNA dari jamur sapropitik dengan PCR dan sebagai kontrol dilakukan

amplifikasi DNA dari jamur sapropitik dengan menggunakan primer universal ITS1-ITS4. Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Desain primer dan kondisi PCR

Oligonukleotida (primer PCR) disintesa oleh IBA-GmbH (Germany), campuran deoxynukleootide (dNTPs) dibeli dari Promega (USA), sedangkan Taq DNA polimerase dibeli dari Mira Diagnostica GmbH (Germany). Primer PCR ITS1 (5` TCCGTAGGTGAACCT GCGG 3`) sebagai primer depan dan primer ITS 4 (5` TCCTCCGCTTATTG ATATGC 3`) sebagai primer balik yang digunakan untuk mengamplifikasi daerah ITS

Ganoderma berdasarkan primer yang disain oleh White *et al.* (27). Kloning dan sekuensing (8 *Ganoderma* isolat kelapa sawit) berdasarkan protokol standar (15), sedangkan desain spesifik primer dari daerah ITS dilakukan dengan menggunakan program DNAstar. Desain spesifik primer untuk *Ganoderma* isolat kelapa sawit dilakukan dengan jalan menjajarkan sekuen nukleotida daerah ITS1 dan ITS2 dari *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan daerah yang sama dari spesies *Ganoderma* lain yang diperoleh dari GenBank (Tabel 2) untuk

Tabel 1. Jamur yang digunakan dalam percobaan

Fungi	Sumber	Inang
Ganoderma (20 isolat)	PPKS	*Elaeis guinensis*
Trichoderma koningii	,,	Kontaminan pada akar kelapa sawit
T.harzianum	,,	,,
T.viride	,,	,,
Aspergillus flavus	,,	,,
Penicillium sp.	,,	,,
Trichoderma sp. 1	,,	,,
Rhizopus sp.	,,	,,
Bispora sp.	,,	,,
Geotrichum sp.	,,	,,
Trichoderma sp. 2	,,	,,
Trichoderma sp. 3	,,	,,
Gliocladium sp.	,,	,,
Mucor sp.	,,	,,
Cylindrocarpon sp.	,,	,,
Monilia sp.	,,	,,
Fusarium sp.	,,	,,
Aspergillus sp.	,,	,,
Botryodiplodia sp.	,,	,,

mencari variasi sekuen antara *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan spesies *Ganoderma* lain. Kondisi PCR yang digunakan untuk percobaan deteksi adalah sebagai berikut: 5 µl ekstraksi DNA ditambahkan kedalam 20 ml campuran reasksi yang terdiri dari bufer PCR, 1.5 mM $MgCl_2$, 50.0 µM untuk tiap dNTP, 0.5 pmol untuk masing-masing primer dan 2 U Taq DNA polimerase.

Table 2. Sekuen nukleotida dari daerah ITS1 dan ITS2 dari berbagai *Ganoderma* spesies berbeda yang diperoleh dari GenBank

Ganoderma	ITS 1	ITS 2	Inang
	Nomor GenBank	Nomor GenBank	
G. adspersum CBS 351.74	X78742	X78763	Salix sp.
G. ahmadii FWP 14329	Z37047	Z37098	Dalbergia sissoo
G. australe 07505	X78750	X78771	Tidak diketahui
G. boninense RSH RS	X78749	X78770	Tidak diketahui
G. colossum CBS 216.36	Z37071	Z37091	Tidak diketahui
G. cupreum DFP 3896	-	-	Casuarina sp.
G. cupreum DFP 4336	-	-	Kayu lunak
G. cupreum QFRI 8678	-	-	Kayu mati
G. formicatum RSH 0814	Z37067	Z37087	Kayu keras
G. formosanum 0109	X78752	X78773	Tidak diketahui
G. gibbosum ACCC 5.151	X78741	X78762	Tidak diketahui
G. lipsiense BAFC 2424	AF169977	AF169978	Podocarpus sp.
G. lobatum BAFC 2411	AF169989	AF169990	Salix sp
G. lucidum ATCC 324.71	X78744	X78765	Acrocarpus sp.
G. lucidum BAFC 2419	AF170007	AF170008	Dari tanah/akar
G. microsporum RSH 0821	X78751	X78772	Salix babylonica
G. oerstedii ATCC 52410	X78739	X78760	Tidak diketahui
G. oregonense CBS 177.30	Z37060	Z37100	Conifer
G. pfeifferi CBS 747.84	X78738	X78759	Quercus sp.
G. platense BAFC 384	AF170001	AF170002	Platanus acerifolia
G. resinaceum CBS 194.76	X78737	X78758	Fagus sylvatica
G. sessile BAFC 2373	AF170005	AF170006	Angiosperm
G. sessiliforme BAFC 2580	AF169999	AF170000	Cassia multijuga
G. sinense ZHANG 1734	Z37066	Z37103	Tidak diketahui
G. subamboinense ATCC 52419	X78736	X78757	Platanus sp.
G. tornatum BAFC 1172	AF169975	AF169976	Batang membusuk
G. tornatum BAFC 1139	AF169979	AF169980	Tidak diketahui
G. tropicum HK 93-8	Z37069	Z37089	Kayu keras
G. tsugae CBS 428.84	X78735	X78756	Abies concolor

Tabel 2. Sekuen nukleotida dari daerah ITS1 dan ITS2 dari berbagai *Ganoderma* spesies berbeda yang diperoleh dari GenBank (lanjutan)

Ganoderma	ITS 1	ITS 2	Inang
	Nomor GenBank	Nomor GenBank	
G. tuberculosum BAFC 2414	AF169997	AF169998	Salix sp
G. valesiacum CBS 282.33	Z37056	Z37081	Larix sp.?
G. weberianum CBS 219.36	X78734	X78755	Mangifera sp
G. zonatum BAFC 2374	AF170003	AF170004	Angiosperm
Ganoderma dari kelapa sawit (Gano PNG)	-	-	Elaeis guineensis
G. boninense LKM	-	-	Palma

Ket: Sekuen nukleotida daerah ITS dari 3 spesies *G. cupreum* dikutip dari Smith dan Sivasithamparam (2000). Daerah ITS pada *G. boninense* LKM disediakan oleh Dr. Moncalvo. Untuk *Gano* PNG, sekuen daerah ITS dikutip dari Bridge dkk. (2000).

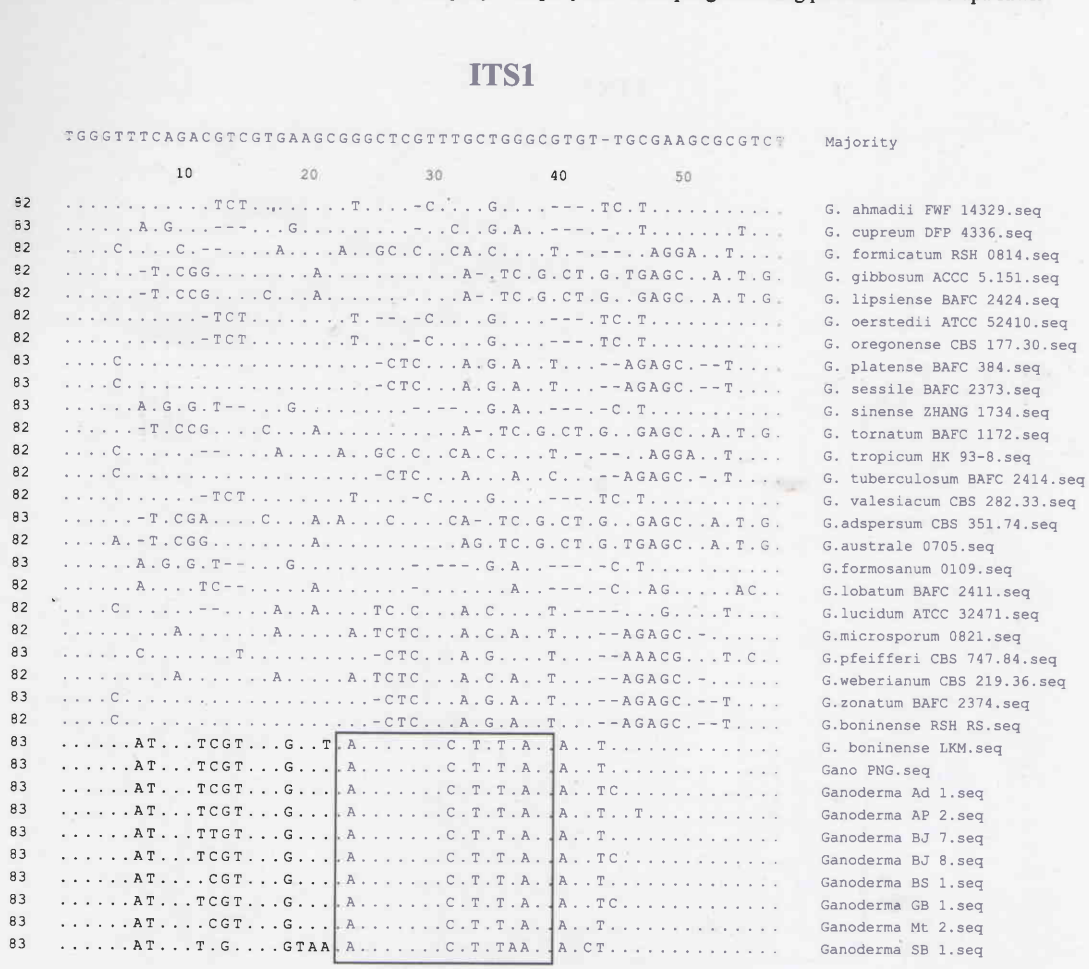
HASIL

Desain primer spesifik

Penjajaran sekuen nukleotida daerah ITS1 dan ITS2 dari 8 *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan daerah sekuen yang sama dari spesies *Ganoderma* lain yang didepositkan di GenBank menunjukkan adanya variasi sekuen yang terletak di bagian tengah pada daerah ITS1 dan pada bagian akhir pada daerah ITS2 (gambar tidak ditunjukkan). Data sekuen daerah ITS dari 8 *Ganoderma* isolat kelapa sawit telah didepositkan di GenBank dengan nomor aksesi AY220537-AY220544. Dalam penjajaran antara daerah ITS *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan spesies*Ganoderma* lain dipilih variasi sekuen berukuran 18 bp di daerah ITS1 dan 18 bp (sebanyak 2 buah) di daearah ITS2. Adanya variasi sekuen tersebut digunakan untuk medesain primer spesifik untuk membedakan *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan spesies *Ganoderma* lainnya melalui amplifikasi PCR. Variasi sekuen di daerah ITS1 didesain sebagai primer forward IT1 (5`AGCTCGTTCGT TTGACGA´3), lihat Gambar 1. Untuk primer reverse, 2 variasi sekuen di daerah ITS2 dikonstruksi sebagai IT2 (5`TTGTCC CAATAACGGGAC`3), lihat Gambar 2 dan IT3 (5`CGATCAATAAAA GACCGA`3), Gambar tidak diperlihatkan. Pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 digunakan dalam PCR untuk amplifikasi segmen ITS dari total genomik DNA yang diekstraksi dari *Ganoderma* dan jamur sapropitik.

Penentuan batas minimum DNA dan uji reaksi silang dari primer spesifik

DNA yang diekstraksi dengan menggunakan ekstraksi DNA berdasarkan metoda Utomo dan Niepold (25) konsentrasi DNA tidak dapat diukur secara langsung dengan spektrofotometer, kemungkinan karena ketidakmurnian DNA. Pada metoda ini,



Gambar 1. Variasi sekuen antara *Ganoderma* isolat kelapa sawit dan spesies *Ganoderma* lainnya pada daerah ITS1 ditunjukkan dikotak (IT1) sebagai primer spesifik.

penyebab ketidakmurnian DNA kemungkinan karena protein pada metoda ini tidak diendapkan, namun demikian DNA yang terekstraksi dapat diamplifikasi dengan PCR. Pasangan primer IT1-IT2 atau IT1-IT3 menghasilkan pita tunggal PCR berukuran kira-kira 450 atau 334 bp hanya bila DNA *Ganoderma* digunakan. Dengan menggunakan metoda ekstraksi DNA ini, batas minimum DNA yang terdeteksi setara dengan 1.5 ng miselia beku-kering atau pada pengenceran $1:10^5$ (Gambar 3).

Untuk menguji kekhususan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3, DNA dari jamur sapropitik diamplifikasi pada berbagai tingkat pengenceran. Hasil PCR menunjukkan bahwa tak satupun dari

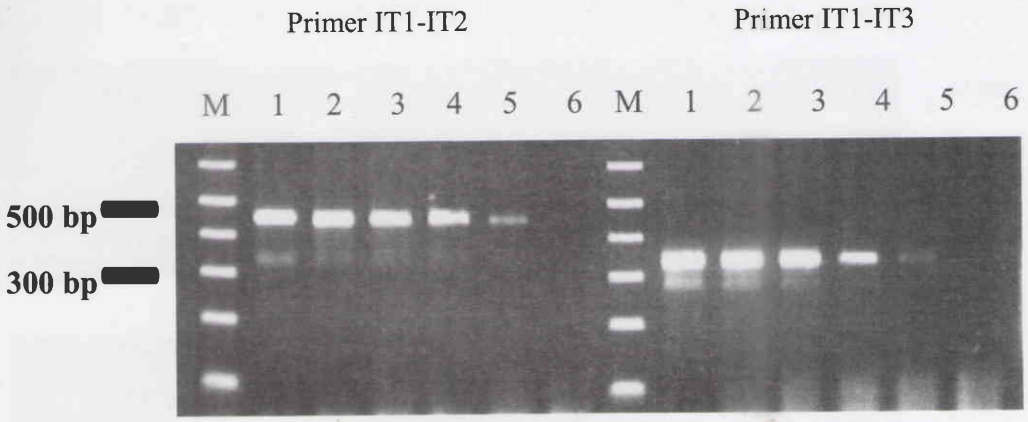
ITS2

```
     A A C C G T C T C - G T T A T T G A G A - - - C A G C - T T T   Majority
                       10                  20                  30
165  . . . . . . . . . . - . G . . . A . . . . - - - . . A G - . . .   G. adspersum CBS 351.74.SEQ
156  . . . . . . . . T C . C . T G - A . . . - - - . . . . . - . . .   G. ahmadii FWF 14329.SEQ
172  . . . . . . . . . . . . . . . C A . . . . - - - . . . . . - . .   G. australe 0705.SEQ
170  . G T . . . . . . . - T G . . . A . . . . - - - . . A T C . . .   G. cupreum DFP 3896.SEQ
163  . . . G . . . . . . A . . . - - G . . . . - - - . . . . . - . .   G. formicatum RSH 0814.SEQ
170  . . . G . . . . . . - T G . . . G . . . . - - - . . A A G C . .   G. formosanum 0109.SEQ
167  . . . . . . . . . . - . . . . C A . . . . - - - . . . . . - . .   G. lipsiense BAFC 2424.SEQ
166  . . . . . . . . . T . . . . C A . . . . - - - . . . . . - . . .   G. lobatum BAFC 2411.SEQ
162  . . . . A . . . . . A . . . - - G . . . . - - - . . A . - . . .   G. lucidum ATCC 32471.SEQ
167  . . . . . . G A T A . . . T G - A C A . A T T T                   G. microsporium 0821.SEQ
164  . . . . . . . . T C . C . T G - A . . . - - - . . . . . - . . .   G. oerstedii  ATCC 52410.SEQ
165  . . . . . . . . T C . C . T G - A . . . - - - . . . . . - . . .   G. oregonense CBS 177.30.SEQ
168  . . . . . . . . . . . - . . . T G . . . . . - - - . . . . . - . .   G. pfeifferi CBS 747.84.SEQ
167  . . . . . . . . . . . - . . . T G . . . . . - - - . . . . . - . .   G. resinaceum CBS 194.76.SEQ
167  . . T A . . . . . . - A . . T A . . . . . - - - . . . . . - . . .   G. sessile BAFC 2373.SEQ
170  . . . N . . . . . . - T G . . . G . . . . - - - . . A A G C . .   G. sinense ZHANG 1734.SEQ
167  . . . . . . . . . . - . . . . C A . . . . - - - . . . . . - . .   G. tornatum BAFC 1139.SEQ
164  . . N A . . . . . . A . . . - - G . . . . - - - . . . . . - . .   G. tropicum HK 93-8.SEQ
165  . . . . . . . . C T C . . . T G G A C A G C T T T                 G. tuberculosum BAFC 2414.SEQ
164  . . . Y . . . . . T C . C . T G - A . . . - - - . . . . . - N . .   G. valesiacum CBS 282.33.SEQ
167  . . . . . . . . C T T . . . T G G A C A . A T T T . T G A C C .   G. weberianum CBS 219.36.SEQ
167  . . T A . . . . . . - A . . T A . . . . . - - - . . . . . - . .   G. zonatum BAFC 2374.SEQ
166  . . . . . . . . . . . . . . T G . . . . . - - - . . . . . - . .   G. boninense RSH RS.SEQ
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   G. boninense LKM.SEQ
169  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   Gano PNG.SEQ
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . G C . .   Ganoderma Ad 1.seq
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . G C . .   Ganoderma AP 2.seq
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   Ganoderma BJ 7.seq
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   Ganoderma BJ 8.seq
172  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . G C . .   Ganoderma BS 1.seq
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   Ganoderma GB 1.seq
168  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . G C . .   Ganoderma Mt 2.seq
172  . . . . . . . . C . - . . . . . . . G . . . - - - . . A . T C . .   Ganoderma SB 1.seq
```

IT2

Gambar 2. Variasi sekuen antara *Ganoderma* isolat kelapa sawit dan spesies *Ganoderma* lainnya pada daerah ITS2 ditunjukkan dikotak (IT2) sebagai primer spesifik.

DNA jamur sapropitik dapat diamplifikasi dengan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 (Gambar 4), tetapi bila DNA jamur sapropitik diamplifikasi dengan pasangan primer ITS1-ITS4 (sebagai primer kontrol) menghasilkan pita tunggal PCR berukuran kira-kira 550 sampai 600 bp (Gambar tidak ditunjukkan). Pencampuran *Ganoderma* dengan akar sehat kelapa sawit tidak mempengaruhi batas minimum deteksi dimana hasil PCR setara dengan bila hanya menggunakan *Ganoderma* saja, tetapi penambahan akar sehat kelapa sawit tersebut berpengaruh pada amplifikasi PCR pada pengenceran 1:10 dimana pada pengenceran tersebut DNA *Ganoderma* tidak dapat diamplifikasi



Gambar 3. Batas minimum deteksi *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan menggunakan primer spesifik IT1-IT2 dan IT1-IT3. Lajur 1-6: 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$ dan $1:10^6$ pengenceran DNA. M = Marka DNA

Tabel 3. Hasil amplifikasi PCR dari campuran *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan akar sehat kelapa sawit pada berbagai pengenceran dengan menggunakan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3

Rasio *Ganoderma* : root (w/w)	Pengenceran seri DNA					
	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$
1:10	-	+++	+++	++	+	-
$1:10^2$	-	+++	+++	++	+	-
$1:10^3$	-	+++	+++	+	-	-
$1:10^4$	-	++	+	-	-	-
$1:10^5$	-	+	-	-	-	-
$1:10^6$	-	-	-	-	-	-

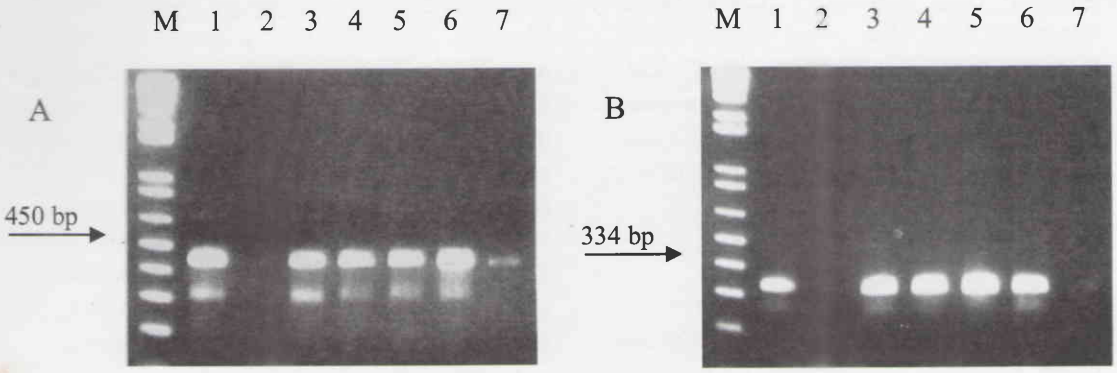
Ket: +++: pita sangat jelas, ++: pita jelas, +: pita kurang jelas, dan -: tanpa pita

Gambar 4. Uji reaksi silang PCR dengan menggunakan primer spesifik IT1-IT2 (A) dan IT1-IT3 (B) terhadap 18 jamur sapropitik pada pengenceran $1:10^2$. Lajur 1, 13 = *Ganoderma* isolat kelapa sawit, 2-12 dan 14-20 = jamur sapropitik. M = Marka DNA

dengan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 (lihat Tabel 3). Demikian pula bila DNA dari akar kelapa sawit diamplifikasi dengan pasangan primer tersebut maka tidak akan menghasilkan pita amplifikasi PCR (data tidak ditunjukkan).

Deteksi DNA *Ganoderma* dari akar yang terinfeksi secara alami

Dari 15 contoh akar kelapa sawit yang diambil dari berbagai kebun, sebanyak 4 contoh akar (dari kebun Pabatu, Rambutan, Pagar Merbau and Sei Bamban) menunjukkan tanpa adanya pita amplifikasi PCR atau 80 % contoh menunjukkan hasil yang positif. Salah satu contoh (dari kebun Bukit Sentang) menunjukkan pita hasil amplifikasi PCR yang kurang jelas pada pengenceran $1:10^2$ untuk pasangan primer spesifik yang digunakan (Gambar 5). Contoh positif ditunjukkan oleh ukuran pita PCR yang diharapkan bila digunakan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 pada pengenceran contoh $1:10^2$ dan $1:10^3$, sedangkan pada contoh yang sama, pengenceran 1:10 tidak menghasilkan pita PCR bila digunakan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3. Hasil lengkap mengenai amplifikasi contoh akar kelapa sawit disajikan pada Tabel 4. Pengujian sebelumnya menunjukkan bahwa pita PCR berukuran kira-kira 450 dan 334 bp hanya dihasilkan oleh pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 bila digunakan DNA *Ganoderma* isolat kelapa sawit, dan pita PCR ini tidak akan



Gambar 5. Amplifikasi PCR dari contoh akar kelapa sawit yang terinfeksi *Ganoderma* secara alami dengan menggunakan pasangan primer IT1-IT2 (A) dan IT1-IT3 (B) pada pengenceran contoh $1:10^2$. Lanjur 1-7: contoh dari kebun Marihat, Sei Bamban, Adolina, Dolok Hilir, Sei Pancur, Gunung Bayu and Bukit Sentang. M = Marka DNA

Tabel 4. Hasil amplifikasi PCR dari contoh akar kelapa sawit dengan menggunakan primer spesifik IT1-IT2 dan IT1-IT3

Asal dari contoh akar kelapa sawit	Pasangan primer dan pengenceran DNA					
	IT 1 dan IT 2			IT 1 dan IT 3		
	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$	1:10	$1:10^2$	$1:10^3$
Kebun Gunung Bayu	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Pabatu	-	-	-	-	-	-
Kebun Marihat	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Bangun	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Adolina	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Matapao	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Bukit Sentang	-	+	-	-	+	-
Kebun Dolok Hilir	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Aek Pancur	-	++	++	-	++	++
Kebun Sei Bamban	-	-	-	-	-	-
Kebun Sei Pancur	-	+++	+++	-	+++	+++
Kebun Pagar Merbau	-	-	-	-	-	-
Kebun Bah Jambi	-	++	++	-	++	++
Kebun Rambutan	-	-	-	-	-	-
Kebun Lonsum	-	+++	+++	-	+++	+++
Akar sehat	-	-	-	-	-	-

+++: pita sangat jelas, ++: pita jelas, +: pita kurang jelas, dan -: tanpa pita

muncul bila digunakan DNA jamur sapropitik dan akar sehat kelapa sawit. Karena itu, adanya pita PCR yang dimaksud dari contoh akar kelapa sawit dapat dipastikan bahwa contoh akar kelapa sawit yang diuji mengandung *Ganoderma* isolat kelapa sawit.

DISKUSI

Sebelum dikembangkan metoda yang berbasis DNA, deteksi penyakit BPB pada kelapa sawit didasarkan pada observasi gejala penyakit secara visual, mengambil bagian yang sakit kemudian diisolasi pada media selektif untuk *Ganoderma* (1) atau menggunakan essai ELISA (24). Metoda pengamatan secara visual memerlukan penempatan jaringan sakit pada media semi-selektif untuk mengamati pertumbuhan miselia *Ganoderma* yang spesifik dimana diperlukan waktu minimal 4 hari atau lebih. Pengujian dengan metoda PCR untuk *Ganoderma* isolat kelapa sawit relatif lebih mahal jika dibandingkan dengan metoda pembiakan *Ganoderma* pada media semi-selektif atau uji dengan metoda ELISA, namun demikian metoda uji PCR lebih sensitif dan cepat. Pengujian dengan Metoda PCR dapat diselesaikan dalam waktu 3 sampai 4 jam, ini sudah termasuk pengolahan contoh, amplifikasi PCR, visualisasi gel elektroporesis dan pewarnaan. Keuntungan lain dari metoda PCR adalah desain primer spesifik untuk suatu spesies khususnya untuk *Ganoderma* isolat kelapa sawit dimana primer spesifik dapat mencegah reaksi silang dengan spesies lain yang bukan target, sebagai contoh adalah jamur sapropitik yang berasosiasi dengan jaringan sakit. Metoda uji PCR dikombinasi dengan metoda ekstraksi DNA yang cepat akan memberikan hasil yang lebih cepat lagi jika dibandingkan dengan metoda-metoda sebelumnya dalam hal pendeteksian *Ganoderma* yang menginfeksi kelapa sawit. Kekhususan prosedur deteksi berbasis PCR dipertegas dengan tanpa adanya reaksi silang dengan DNA yang berasal dari tanaman inang (jaringan kelapa sawit sehat) dan 18 jamur sapropitik.

Amplifikasi DNA *Ganoderma* isolat kelapa sawit dengan PCR tidak dipengaruhi oleh adanya sejumlah besar DNA kelapa sawit, seperti yang ditunjukkan oleh keberhasilan amplifikasi DNA *Ganoderma* pada rasio DNA *Ganoderma*: DNA kelapa sawit yaitu 1: 10^4. Kegagalan reaksi PCR dengan menggunakan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 untuk mengamplifikasi ITS-rDNA pada jamur sapropitik yang ditunjukkan dengan hasil negatif bukan disebabkan degradasi DNA dari jamur sapropitik maupun adanya zat penghambat dalam reaksi PCR. Keraguan adanya degradasi DNA maupun zat penghambat dalam reaksi PCR diverifikasi dengan hasil positif bila DNA jamur sapropitik diamplifikasi dengan pasangan primer ITS1-ITS4 yang merupakan primer kontrol.

Salah satu masalah dalam aplikasi PCR untuk target DNA yang berada di dalam jaringan inang adalah adanya zat-zat penghambat seperti polisakarida (5) atau senyawa penolik (4, 8, 9, 22) dimana zat-zat tersebut dapat mengurangi secara drastis kepekaan metoda PCR. Sebagai contoh, karena adanya zat-

zat penghambat tersebut mengakibatkan kegagalan amplifikasi PCR pada DNA jamur Gaeumannomyces graminis (6) dan Magnaporthe poae (3) yang berada di dalam jaringan tanaman inang. Untuk itu diperlukan tahapan pemurnian lebih lanjut untuk menghilangkan zat-zat penghambat, termasuk "cation exchange columns" (17), polyvinil polypyrrolidone (PVPP) untuk mengikat senyawa polipenolik (13) atau penggunaan kit pemurnian DNA komersial seperti "Magic DNA Clean-up Columns" (8). Semua prosedur ini memakan waktu banyak dan mahal, untuk itu metoda ekstraksi DNA yang telah dikembangkan oleh Utomo dan Niepold (25) dimana tidak diperlukan tahapan pemurnian DNA lagi akan sangat berguna untuk pengujian rutin PCR. Pada penelitian ini terjadi kegagalan amplifkasi PCR dengan menggunakan pasangan primer IT1-IT2 dan IT1-IT3 untuk campuran buatan antara *Ganoderma* dengan akar sehat kelapa sawit maupun akar yang terinfeksi di lapang pada pengenceran contoh 1:10. Kemungkinan kegagalan reaksi PCR ini karena pekatya zat penghambat reaksi PCR pada pengenceran contoh 1:10, hal ini diperjelas dengan keberhasilan amplifikasi PCR untuk contoh yang sama pada pengenceran contoh 1: 10^2 dan 1: 10^3. Karena itu, persyaratan yang dibutuhkan untuk keberhasilan amplifikasi PCR adalah mengurangi kepekatan zat penghambat melalui pengenceran contoh yang lebih tinggi.

Metoda deteksi PCR terbukti mampu mendeteksi *Ganoderma* isolat kelapa sawit sebelum gejala penyakit terlihat sehingga metoda ini berguna untuk menentukan tingkat infeksi laten pada tanaman kelapa sawit sakit yang belum menunjukkan gejala. Informasi demikian dapat membantu pekebun membuat keputusan untuk mengendalikan pohon yang sakit. Metoda PCR selain digunakan untuk mendeteksi *Ganoderma* dalam jaringan sakit, dapat juga digunakan untuk mempelajari penyebaran *Ganoderma* di dalam jaringan kelapa sawit atau untuk melacak keberadaan *Ganoderma* pada tanaman inang lain di lapang ataupun pada areal-areal yang belum ditanami.

DAFTAR PUSTAKA

1. ARIFIN, D., I. ABU-SEMAN and H. KHAIRUDIN. 1993. Confir-mation of*Ganoderma* infected palm by drilling technique. Proceeding of the 1993 PORIM International Palm oil Congress, 20 – 25 September 1993, Kuala Lumpur, Malaysia.
2. BRIDGE, P. D., E. B. O'GRADY, C. A. PILOTTI and F. R. SANDERSON. 2000. Develop-ment of molecular diagnostics for the detection of *Ganoderma* isolates pathogenic to oil palm. In: *Ganoderma* Diseases of Perennial Crops. Flood, J., Bridge, P.D. and Holderness, M. (eds.). CABI publishing, Wallingford. pp. 225-234.
3. BUNTING, T. E., K. A. PLUMLEY, B. B. CLARKE and B. I. HILLMAN. 1996. Identification of Magnaporthe poae by PCR and examination of its relationship to other fungi by analysis of their nuclear rDNA ITS-1 regions. Phytopathology 86, 398-404.

4. CENIS, J. L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acid Res. 20, 2380.

5. DEMEKE, T. and R. P. ADAM. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. Bio Techniques 12, 332-333.

6. HENSON, J. M., T. GOINS, W. GREY, D. E. MATHRE and M. L. ELLIOT. 1993. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeumannomyces grami-nis* DNA in plant grown in artificially and naturally infected soil. Phytopathology, 83, 283-287.

7. HO, Y. W. and A. NAWAWI. 1985. *Ganoderma boninense* Pat. from basal stem rot of oil palm (Elaeis guineensis) in Peninsular Malaysia. Pertanika 8, 425-428.

8. JOHANSON, A. 1994. PCR for detection of the fungi that cause Sigatoka leaf spots of banana and plantain. In: Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification. Schots, A., Dewey, F.M. and Oliver, R. (eds.), CAB International, Oxford, UK, pp 215-221.

9. JOHN, M. E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolic. Nucleic Acids Res. 20, 2381.

10. LOVIC, B. R., R. D. MARTYN and M. E. MILLER. 1995. Sequence analysis of the ITS regions of rDNA in Monosporascus spp. to evaluate its potential for PCR-mediated detection. Phytopathology 85, 655-661.

11. MAZZOLA, M., O. T. WONG and R. J. COOK. 1996. Virulence of *Rhizoctonia oryzae*and *R. solani* AG-8 on wheat and detection of R. oryzae in plant tissue by PCR. Phytopathology 86, 354-360.

12. NOGOSENO 2000. Regulation and policy of oil palm seed production. Proceeding: Technical oil palm meeting III, 3-4 October 2000, Medan, Indonesia.

13. PARRY, D. W. and P. NICHOLSON. 1996. Development of a PCR assay to detect Fusarium poae in wheat. Plant Pathology 45, 383-391.

14. RAEDER, U. and P. BRODA. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Lett. Appl. Microbiol. 1, 17-20.

15. SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2 ed. Vol. I-III. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. USA.

16. SMITH, B. J. and K. SIVASITHAMPARAM. 2000. Internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence of five species of *Ganoderma* from Australia. Mycol. Res. 104, 943-951.

17. STEIN, A. and D. RAOULT. 1992. A simple method for amplification of DNA from paraffin-embedded tissues. Nucleic Acids Res. 20, 5237-5238.

18. STEYAERT, R. L. 1967. Les Ganoderma palmicoles. Bulletin Jardin Botanique Nationale Belgique 37, 465-492.

19. THOMPSON, A. 1931. Stem rot of the oil palm in Malaya. Bulletin of Department of Agriculture, Science Series 6: 23 p.

20. TISSERAT, N. A., S. H. HULBERT, and K. M. SAUER. 1994. Selective amplification of rDNA internal transcribed spacer regions to detect Ophios-phaerella korrae and O. herpotricha. Phytopathology 84, 478-482.

21. TOOLEY, P. W., B. A.BUNYARD, M. M. CARRAS and E. HATZILOUKAS. 1997. Deve-lopment of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of Phytophthora species infecting potatoes. Appl. Environ. Microbiol. 63, 1467-1475.

22. TSAI, Y. L. and B. H. OLSON. 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediment for polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2292-2295

23. TURNER, P. D. 1981. Oil Palm Diseases and Disorders. Oxford University Press, Kuala Lumpur, 281 pp.

24. UTOMO, C. 1997. Early detection of *Ganoderma* in oil palms by ELISA technique. Master of Science Thesis. The Georg-August University Göttingen.

25. UTOMO, C. F. and NIEPOLD. 2000. Development of diagnostic methods for detecting *Ganoderma*-infected oil palms. J. Phytopathology 148: 507-514

26. WANG, H., M. Qi. and A. J. CUTLER. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. Nucleic Acids Res. 21, 4153-4154.

27. WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE. and J. TAYLOR. 1990. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M. A., Gelfand, D.H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (eds.). Academic Press, New York, pp. 315-322