

## VARIABILITAS GENETIK *Ganoderma* ISOLAT INDONESIA

## GENETIC VARIABILITY OF *Ganoderma* ISOLATES IN INDONESIA

Sri Wening, Agus Eko Prasetyo, Fahrida Yanti, dan Agus Susanto

**Abstrak** *Ganoderma* adalah penyebab utama penyakit busuk pangkal batang pada tanaman kelapa sawit. Pengendalian penyakit tersebut memerlukan informasi genetik yang mendalam mengenai *Ganoderma*. Penelitian ini bertujuan untuk mengkaji variabilitas genetik *Ganoderma* dari berbagai wilayah di Indonesia, menggunakan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan sekruensing daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) rDNA. Hasil menunjukkan bahwa semua isolat yang dianalisis adalah *Ganoderma* sp. *Cluster analysis* menggunakan AFLP dan ITS rDNA menunjukkan bahwa isolat tidak mengelompok sesuai dengan informasi geografi asal maupun inang. Hal ini menegaskan bahwa pemilihan isolat dapat menggunakan informasi hasil *cluster analysis*, dan bukan berdasarkan geografi asal ataupun inang. Selain itu, hal tersebut membuktikan bahwa *Ganoderma* memiliki kisaran inang yang luas. Tingginya keragaman genetik *Ganoderma* pada daerah yang sama mendukung hipotesis yang menyatakan bahwa penyebaran utama *Ganoderma* adalah melalui spora.

**Kata kunci :** *Ganoderma*, AFLP, sekruensing, ITS rDNA, *cluster analysis*

**Abstract** *Ganoderma* is a main pathogen of basal stem rot disease of oil palm. The disease management needs comprehensive genetic information of *Ganoderma*. This research aims to study the genetic variability of *Ganoderma* collected from some regions of Indonesia,

Penulis yang tidak disertai dengan catatan kaki instansi adalah peneliti pada Pusat Penelitian Kelapa Sawit

Sri Wening (✉)  
Pusat Penelitian Kelapa Sawit  
Jl. Brigjen Katamso No. 51 Medan, Indonesia  
Email: s.wening@iopri.org

using *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) and sequencing of *Internal Transcribe Spacer* region of ribosomal DNA (ITS-rDNA). *Cluster analysis* by AFLP and ITS rDNA showed that the isolate groups were not congruent with the information of geographical location and the host. It confirms that isolate selection can use the result of cluster analysis, not geographical or host origin. It also proves that *Ganoderma* has wide range of hosts. The high genetic diversity of *Ganoderma* in a location supports the hypothesis that the main spreading of *Ganoderma* is through its spore.

**Keywords :** *Ganoderma*, AFLP, sequencing, ITS rDNA, *cluster analysis*

### PENDAHULUAN

Penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Ganoderma* sp. adalah salah satu penyakit utama pada kelapa sawit di Indonesia. Penyakit ini menyebabkan kerugian yang besar pada perkebunan kelapa sawit, karena mengurangi jumlah tegakan pohon yang hidup, turunnya produktivitas pohon yang terinfeksi dan diperlukannya peremajaan ulang tanaman yang dipercepat (Flood et al., 2002). Tercatat pada kelapa sawit di Indonesia bahwa kejadian penyakit *Ganoderma* sebesar 1% dapat menyebabkan kerugian sekitar 256 juta USD per tahun (Darmono, 2011). Tingkat epidemiologi penyakit ini juga semakin meningkat di Indonesia, karena tidak hanya ditemui pada tanaman tua, tapi juga pada tanaman muda, bahkan pada generasi pertama perkebunan kelapa sawit (Susanto et al., 2013).

Sistem perkebunan kelapa sawit yang monokultur dan luasnya kisaran inang menyebabkan sulitnya pengendalian penyakit ini. Saat ini pengendalian penyakit secara terpadu merupakan cara pengendalian

penyakit busuk pangkal batang yang paling efektif. Pengendalian tersebut meliputi pengendalian kultur teknis, seperti menghancurkan sisa tanaman saat replanting, tumpang sari, dan lubang tanam besar (Susanto, 2009; Virdiana et al., 2012), pengendalian kimia dengan menggunakan pestisida hexaconazole, pengendalian hayati dengan menggunakan *Trichoderma* sp. (Idris, 2009; Susanto et al., 2013), serta penggunaan tanaman toleran terhadap *Ganoderma* sp. (Durand Gasselin et al., 2014).

Untuk mendapatkan teknik pengendalian yang tepat, perlu diketahui informasi biologi dan genetik *Ganoderma*. Secara taksonomi, terdapat beberapa spesies *Ganoderma* yang bersifat patogenik terhadap kelapa sawit, walaupun laporan sebelumnya menyatakan bahwa *Ganoderma boninense* merupakan spesies utama penyebab penyakit pada kelapa sawit (Wong et al., 2012). Biasnya morfologi individu, adanya pengaruh lingkungan, tingginya variabilitas dan interhibridisasi menyebabkan sulitnya identifikasi *Ganoderma* sp. (Zheng et al., 2009). Diperlukan karakterisasi genetika *Ganoderma* melalui kajian pada tingkat molekuler untuk lebih memahami sifat biologinya. Beberapa informasi dapat diperoleh melalui karakterisasi genetika tersebut misalnya identifikasi spesies dan isolat melalui analisis sidik jari DNA, serta strategi pengendalian penyakit melalui kajian ekspresi gen. Hingga saat ini, telah dilaporkan beberapa kajian molekuler untuk mengetahui karakter biologi dan genetika *Ganoderma*, seperti: kajian sekuensing genom *Ganoderma boninense* (Camus-Kulandaivelu et al., 2014), identifikasi *Ganoderma* sp. (Wong et al., 2012) dan variabilitas isolat *Ganoderma* spp. (Purnamasari et al., 2012).

*Ganoderma* dapat ditemui hampir di seluruh wilayah Indonesia, menyerang tidak hanya kelapa sawit tapi juga beberapa inang yang lain. Identifikasi molekuler *Ganoderma* telah dilakukan di Indonesia oleh Purnamasari et al. (2012), tetapi sampel yang digunakan hanya berasal dari dua pulau, dimana masing-masing pulau diwakili oleh isolat *Ganoderma* yang berasal dari satu propinsi. Sampel yang dianalisis juga hanya berasal dari kelapa sawit. Hingga saat ini, belum ada kajian spesies dan variabilitas isolat yang lebih mewakili seluruh wilayah Indonesia.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh informasi variabilitas genetik isolat-isolat

*Ganoderma* yang dikoleksi dari berbagai wilayah di Indonesia menggunakan *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan sekuen daerah *Inter Transcribed Spacer* (ITS). Informasi tersebut dapat menjadi panduan untuk menentukan strategi pengendalian *Ganoderma*, manajemen isolat-isolat *Ganoderma* yang akan digunakan untuk skrining bahan tanaman toleran terhadap *Ganoderma*, serta untuk menambah pengetahuan tentang epidemiologi *Ganoderma* di wilayah Indonesia.

## BAHAN DAN METODE

Kegiatan pengumpulan sampel tubuh buah *Ganoderma* dan kulturnya dilakukan di Laboratorium Proteksi Tanaman, Pusat Penelitian kelapa Sawit. Kegiatan ekstraksi DNA, PCR dan analisis data dikerjakan di Laboratorium Biologi Molekuler, Pusat Penelitian Kelapa Sawit. *Direct sequencing* pada hasil amplifikasi menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh 1stBASE (Malaysia). Kegiatan penelitian tersebut berlangsung pada 2013 hingga 2014.

## Material

Sebanyak 48 tubuh buah *Ganoderma* (yang diasumsikan sebagai *G. boninense* berdasarkan morfologi tubuh buah) yang ditemukan di berbagai inang yang memiliki gejala penyakit busuk pangkal batang di berbagai daerah di Indonesia kemudian dikulturkan. Dua jenis isolat *Trichoderma* sp., yaitu *T. harzianum* dan *T. koningii* digunakan sebagai kontrol pada analisis. Daftar lengkap material yang dianalisis pada penelitian ini diuraikan pada Tabel 1.

## Isolasi dan kultur jamur

Isolasi *Ganoderma* dilakukan sesuai prosedur Yanti dan Susanto (2004) dari bagian tubuh buah jamur yang tumbuh di pangkal batang kelapa sawit menggunakan media *potato dextrose agar* (PDA). Isolasi dilakukan dengan cara mengupas/mengikis lapisan paling luar dengan ketebalan + 1 mm, memotong kecil-kecil dengan menggunakan skapel/pisau steril dengan ukuran + 1 cm<sup>3</sup>, merendam dalam larutan klorox (NaOCl) 10% selama + 10 menit, mencuci dengan akuades steril, dan mengeringkan menggunakan kertas filter steril. Potongan tubuh buah kemudian ditanam pada PDA. Bila dari potongan-



Tabel 1. Daftar isolat yang digunakan dalam penelitian dan asalnya.

Table 1. List of isolates used in the experiment and their origins.

Nomor	Kode isolat	Inang	Asal
1	KS_J-B-001	Kelapa Sawit	Jawa
2	KS_J-B-002	Kelapa Sawit	Jawa
3	KS_J-B-003	Kelapa Sawit	Jawa
4	KS_K-KB-001	Kelapa Sawit	Kalimantan
5	KS_K-KT-001	Kelapa Sawit	Kalimantan
6	KS_K-KB-002	Kelapa Sawit	Kalimantan
7	KS_K-KB-003	Kelapa Sawit	Kalimantan
8	KS_K-KB-004	Kelapa Sawit	Kalimantan
9	KS_K-KH-001	Kelapa Sawit	Kalimantan
10	KS_K-KH-002	Kelapa Sawit	Kalimantan
11	KS_K-KH-003	Kelapa Sawit	Kalimantan
12	KS_K-KT-002	Kelapa Sawit	Kalimantan
13	KS_P-P-001	Kelapa Sawit	Papua
14	KS_P-P-002	Kelapa Sawit	Papua
15	KS_P-P-003	Kelapa Sawit	Papua
16	KS_C-ST-002	Kelapa Sawit	Sulawesi
17	KS_C-ST-003	Kelapa Sawit	Sulawesi
18	KS_C-ST-004	Kelapa Sawit	Sulawesi
19	AI_S-SU-001	Alpukat	Sumatera
20	A_S-SU-002	Akasia	Sumatera
21	KS_S-SU-003	Kelapa Sawit	Sumatera
22	KS_S-SU-004	Kelapa Sawit	Sumatera
23	KS_S-SU-005	Kelapa Sawit	Sumatera
24	Pe_S-SU-007	Pejibaye	Sumatera
25	K_S-R-001	Kelapa	Sumatera
26	KS_S-R-002	Kelapa Sawit	Sumatera
27	KS_S-R-006 (Baru)	Kelapa Sawit	Sumatera
28	KS_S-SB-001	Kelapa Sawit	Sumatera
29	KS_S-NAD-001	Kelapa Sawit	Sumatera
30	KS_S-NAD-002	Kelapa Sawit	Sumatera
31	KS_S-NAD-003	Kelapa Sawit	Sumatera
32	KS_S-SU-013	Kelapa Sawit	Sumatera
33	Ar_S-SU-014	Aren	Sumatera
34	KS_S-SU-015	Kelapa Sawit	Sumatera
35	KS_S-R-003	Kelapa Sawit	Sumatera
36	KS_S-R-005	Kelapa Sawit	Sumatera
37	KS_S-BB-002	Kelapa Sawit	Sumatera
38	KS_S-BB-003	Kelapa Sawit	Sumatera
39	KS_S-J-002	Kelapa Sawit	Sumatera
40	KS_S-SS-001	Kelapa Sawit	Sumatera
41	KS_S-SS-002	Kelapa Sawit	Sumatera
42	KS_S-SS-003	Kelapa Sawit	Sumatera
43	KS_S-L-001	Kelapa Sawit	Sumatera
44	KS_S-L-002	Kelapa Sawit	Sumatera
45	KS_S-L-003	Kelapa Sawit	Sumatera
46	KS_S-L-004	Kelapa Sawit	Sumatera
47	KS_S-L-005	Kelapa Sawit	Sumatera
48	KS_S-L-006	Kelapa Sawit	Sumatera
49		<i>Trichoderma harzianum</i>	
50		<i>Trichoderma koningii</i>	

potongan tersebut tumbuh miselium berwarna putih (*Ganoderma*) maka miselium diisolasi kembali ke dalam PDA pada petridish yang baru sampai dihasilkan isolat *Ganoderma* murni dalam satu petridish. Kultur *Ganoderma* diperoleh dengan menumbuhkan potongan isolat *Ganoderma* pada media potato dextrose cair selama 2 minggu.

#### Ekstraksi DNA

Sebanyak 50 mg miselium jamur yang sudah ditiriskan dari medium cair, digunakan dalam ekstraksi DNA menggunakan DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Kuantitas DNA hasil ekstraksi diukur menggunakan Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

#### *Amplified Fragment Length Polymorphism-Polymerase Chain Reaction (AFLP-PCR)*

AFLP-PCR dilakukan dengan menggunakan protokol Vos *et al.* (1995) yang dimodifikasi oleh Ningrum *et al.* (2014). Enam kombinasi primer selektif (EcoRI-AGG/MseI-CAC, EcoRI-ACA/MseI-CAG, EcoRI-AGG/MseI-CA, EcoRI-AGA/MseI-CTT, EcoRI-AGA/MseI-CAC dan EcoRI-ACA/MseI-CTT) digunakan dalam skrining. Pembacaan alel dilakukan dengan bantuan Software GeneMarker® version 2.4.0 (SoftGenetics LLC®).

#### Sekuensing daerah ITS

Daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 pada sampel yang dianalisis, diamplifikasi menggunakan primer ITS1 dan ITS4 (White *et al.*, 1990) dengan protokol PCR yang diuraikan oleh Wening *et al.* (2013). Dilakukan *direct sequencing* pada hasil amplifikasi menggunakan jasa komersial yang disediakan oleh 1stBASE (Malaysia).

Tabel 2. Jumlah lokus polimorfik tiap kombinasi primer selektif.

Table 2. Number of polymorphic loci of each selective combination primer.

Kombinasi primer selektif	Jumlah lokus polimorfik
EcoRI-AGG/MseI-CAG	44
EcoRI-AGA/MseI-CTT	27
EcoRI-AGG/MseI-CAC	41
Total	112

#### Penelusuran informasi ke database publik

Data sekuen daerah ITS untuk sampel yang dianalisis dikonfirmasi ke database NCBI menggunakan megablast (Purnamasari *et al.*, 2012).

#### Konfirmasi sifat patogenisitas

Identifikasi patogenisitas tiap isolat dilakukan dengan pemotongan sekuen daerah ITS dengan MluI dan SacI, *in silico*, menggunakan program pDRAW32 yang dikembangkan oleh AcaClone Software (<http://www.acaclone.com>).

#### Cluster analysis

Untuk tiap lokus AFLP, dilakukan skoring untuk tiap alel yaitu ada fragmen (skor=0) dan tidak ada fragmen (skor=1). Dendrogram dikonstruksi menggunakan metode Neighbor-Joining Tree, dengan bantuan MEGA versi 6 (Tamura *et al.*, 2013).

Untuk data sekuen daerah ITS: dilakukan *multiple alignment* menggunakan Clustal W dengan bantuan Bioedit versi 7.2.5 (Hall, 1999). Dendrogram dikonstruksi menggunakan DNAdist yang terdapat juga pada Bioedit versi 7.2.5 (Hall, 1999).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

##### **Kajian variabilitas genetik *G. boninense* menggunakan *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)***

Dari enam kombinasi primer selektif yang digunakan, hanya tiga kombinasi primer selektif yang menghasilkan profil AFLP yang jelas dan



mudah dibaca, serta menghasilkan data polimorfisme yang tinggi. Ketiga kombinasi primer selektif tersebut adalah EcoRI-AGG/MseI-CAG, EcoRI-AGA/MseI-CTT dan EcoRI-AGG/MseI-CAC. Total jumlah lokus adalah 112, keseluruhannya merupakan lokus polimorfik, sehingga rata-rata jumlah lokus polimorfik per kombinasi primer selektif adalah 37,33 (Tabel 2).

Dendrogram kekerabatan genetik (Gambar 1) menunjukkan bahwa secara genetik, isolat *Trichoderma* sp. terpisah dengan isolat *Ganoderma* sp. Terpisahnya *Trichoderma* sp. (yang digunakan sebagai kontrol *out group*) dengan *Ganoderma* sp. merupakan salah satu indikasi bahwa jumlah polimorfisme yang digunakan cukup untuk melakukan kajian kekerabatan genetik sampel yang dianalisis. Strategi penggunaan kontrol *out group* tersebut pernah dilakukan oleh Wening et al. (2013). Isolat *Ganoderma* sp. tidak mengelompok berdasarkan asal geografis. Hal tersebut menunjukkan tingginya variabilitas genetik *Ganoderma* sp., walaupun terdapat pada lokasi yang berdekatan. Hal tersebut dapat terjadi karena tubuh buah yang digunakan untuk kajian ini, merupakan hasil rekombinasi DNA saat perkawinan secara seksual antar hifa yang berbeda. Hal ini juga mendukung teori bahwa salah satu penyebaran *Ganoderma* sp. adalah melalui penyebaran spora. Jika penyebaran *Ganoderma* sp. hanya melalui kontak akar antara tanaman terserang dan tanaman di sekitarnya, maka *Ganoderma* di suatu daerah memiliki keragaman genetik yang rendah. Isolat *Ganoderma* juga tidak mengelompok berdasarkan kesamaan inangnya. Hal ini menunjukkan luasnya kisaran inang patogen tersebut, sesuai dengan laporan Steyaert (1975) dan Abdullah et al. (2001).

Dendrogram hasil *cluster analysis* (Gambar 1) tersebut menunjukkan bahwa secara garis besar, terdapat 4 kelompok isolat *Ganoderma* pada sampel yang dikoleksi dari berbagai wilayah Indonesia. Pemilihan jumlah dan jenis isolat *Ganoderma* yang digunakan pada uji inokulasi buatan di pembibitan, dapat menggunakan hasil penelitian ini. Empat isolat yang mewakili masing-masing kelompok pada dendrogram merupakan perwakilan *Ganoderma* di seluruh wilayah Indonesia.

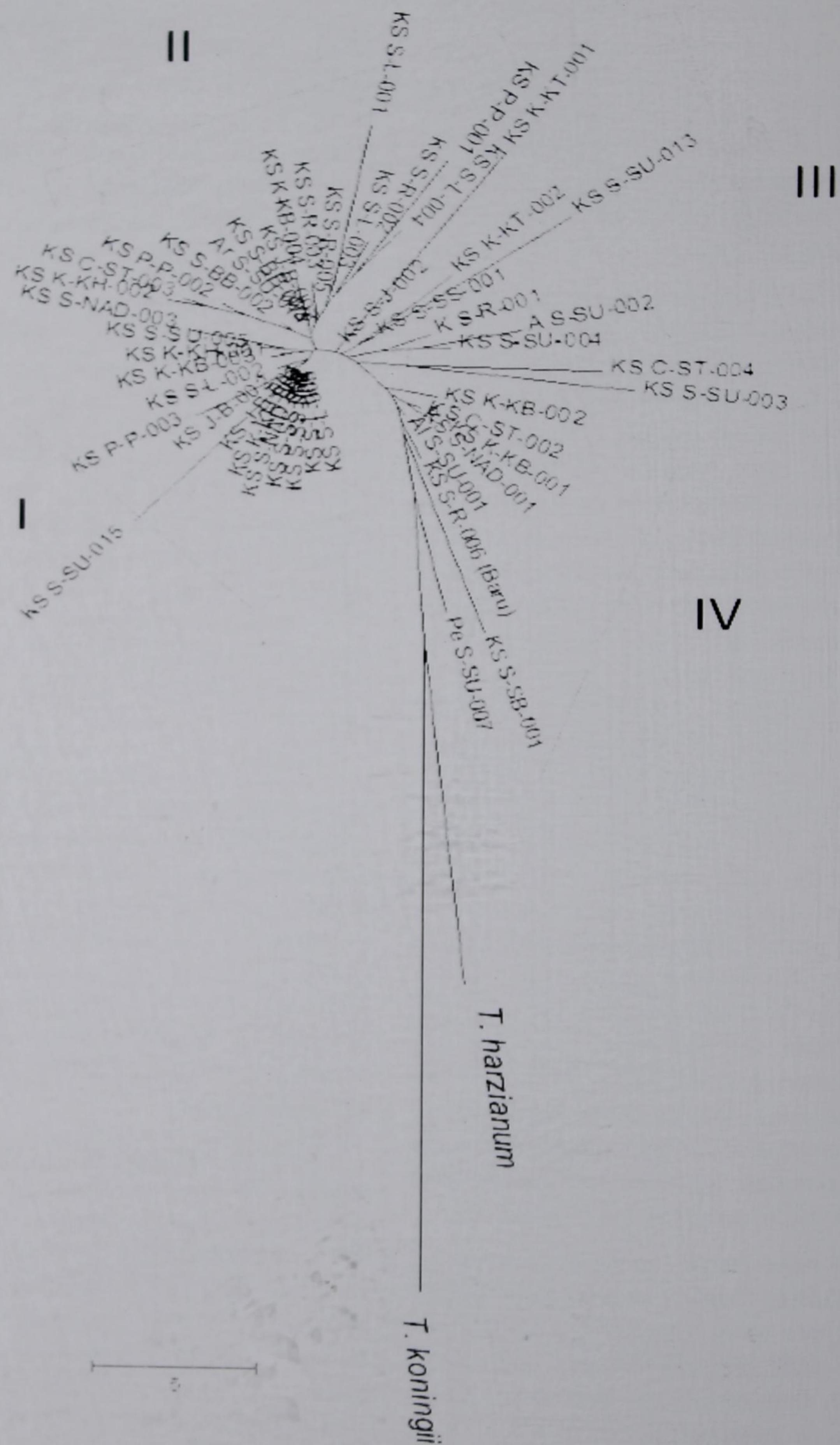
*Cluster analysis* yang dilakukan menggunakan AFLP merupakan sidik jari DNA genom isolat *Ganoderma* secara random (tidak mewakili daerah genom yang mengekspresikan sifat tertentu). Untuk memperoleh informasi pengelompokan isolat *Ganoderma* berdasarkan agresivitasnya, diperlukan *cluster analysis* menggunakan informasi daerah genom yang terkait mekanisme patogenisitas *Ganoderma*.

#### Kajian variabilitas *G. boninense* berdasarkan sekuen daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2

Kajian variabilitas isolat berdasarkan sekuen daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 dilakukan pada beberapa sampel isolat, untuk konfirmasi dan pembanding terhadap kajian yang dilakukan dengan menggunakan AFLP, sehingga tidak perlu dilakukan untuk seluruh sampel isolat. Kajian melalui sekuen DNA tersebut dilakukan melalui kajian hasil amplifikasi daerah ITS, konfirmasi spesies melalui megablast terhadap database NCBI dan *cluster analysis*.

Amplifikasi daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 menggunakan primer spesifik menghasilkan produk fragmen DNA berukuran 631 bp hingga 657 bp. Hasil megablast yang dilakukan terhadap database NCBI menunjukkan bahwa spesies yang dianalisis adalah *G. boninense* atau *Ganoderma* sp. (Tabel 3). Strategi identifikasi yang sama pernah dilaporkan oleh Purnamasari et al. (2012), dimana spesies yang diidentifikasi adalah *Ganoderma* sp., *Ganoderma boninense*, *Fomitopsis ostreiformis* dan *Ganoderma aff. steyaertanum*.

Tabel 4 menunjukkan bahwa hasil amplifikasi daerah ITS dapat dipotong dengan M<sub>1</sub>uL dan S<sub>a</sub>cI. Pemotongan sekuen daerah ITS dengan M<sub>1</sub>uL, *in silico*, menghasilkan potongan DNA berukuran sekitar 529 bp dan 114 bp. Sedangkan pemotongan sekuen daerah ITS hasil amplifikasi menggunakan S<sub>a</sub>cI, *in silico*, menghasilkan potongan DNA berukuran sekitar 123 bp dan 520 bp. Hal ini menunjukkan bahwa isolat *Ganoderma* tersebut merupakan spesies patogen kelapa sawit (Utomo et al., 2005). Karena isolat *Ganoderma* tidak hanya diisolasi dari inang kelapa sawit, hal ini mendukung teori luasnya kisaran inang *Ganoderma* yang patogenik terhadap kelapa sawit.



Gambar 1. Dendrogram kekerabatan genetik 48 isolat *G. boninense* dari wilayah Indonesia menggunakan 112 lokus AFLP.

Figure 1. Dendrogram of genetic relationship of 48 *G. boninense* isolates of Indonesia by using 112 AFLP loci.



Tabel 3. Hasil identifikasi isolat sampel berdasarkan blast sekuen ITS terhadap database NCBI.  
Table 3. Result of identification of isolates by blasting of ITS sequence to NCBI database.

Kode Isolat	Hasil Megablast	Kode aksesi
KS_J-B-002	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_K-KB-001	<i>Ganoderma</i> sp. BP-16	JN400513.1
KS_K-KT-001	<i>Ganoderma</i> sp. BP-17	JN400513.1
KS_K-KB-003	<i>Ganoderma boninense</i> strain GBLS	KF164430.1
KS_K-KH-001	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_K-KT-002	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_P-P-002	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_C-ST-002	<i>Ganoderma</i> sp. BP-16	JN400513.1
KS_S-SU-003	<i>Ganoderma boninense</i> strain GBLS	KF164430.1
KS_S-SU-004	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-SU-005	<i>Ganoderma</i> sp. BL-9	JN400510.1
Pe_S-SU-007	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
K_S-R-001	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-R-002	<i>Ganoderma</i> sp. BP-16	JN400513.1
KS_S-SB-001	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-NAD-001	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-SU-013	<i>Ganoderma</i> sp. BP-16	JN400513.1
Ar_S-SU-014	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-SU-015	<i>Ganoderma</i> sp. BP-16	JN400513.1
KS_S-SS-003	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-L-001	<i>Ganoderma</i> sp. BRIUMSc	JN234429.1
KS_S-L-004	<i>Ganoderma boninense</i> strain GBLS	KF164430.1

Cluster analysis menggunakan informasi sekuen ITS menghasilkan dendrogram yang menunjukkan bahwa isolat *Ganoderma* sp. tidak mengelompok berdasarkan asal geografis atau asal inang (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan hasil yang ditunjukkan oleh analisis kekerabatan genetik menggunakan informasi profil AFLP (Gambar 1).

### Pembahasan Umum

Kajian kekerabatan genetik isolat *Ganoderma* sp. pernah dilaporkan oleh Wicaksono *et al.* (2011) menggunakan RAPD, Miller *et al.* (1999) menggunakan RFLP-mtDNA, Zheng *et al.* (2009) menggunakan AFLP dan ITS-AFLP, serta Purnamasari *et al.* (2012)

menggunakan keragaman sekuen ITS. Pada penelitian ini, kajian kekerabatan genetik isolat *Ganoderma* yang dianalisis dilakukan dengan menggunakan AFLP karena sensitivitas teknik tersebut untuk analisis sub-spesies (Zheng *et al.*, 2009). Kajian genetik menggunakan informasi sekuen daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 digunakan untuk konfirmasi identitas spesies, kajian variabilitas sekuen dan konfirmasi analisis kekerabatan genetik menggunakan AFLP.

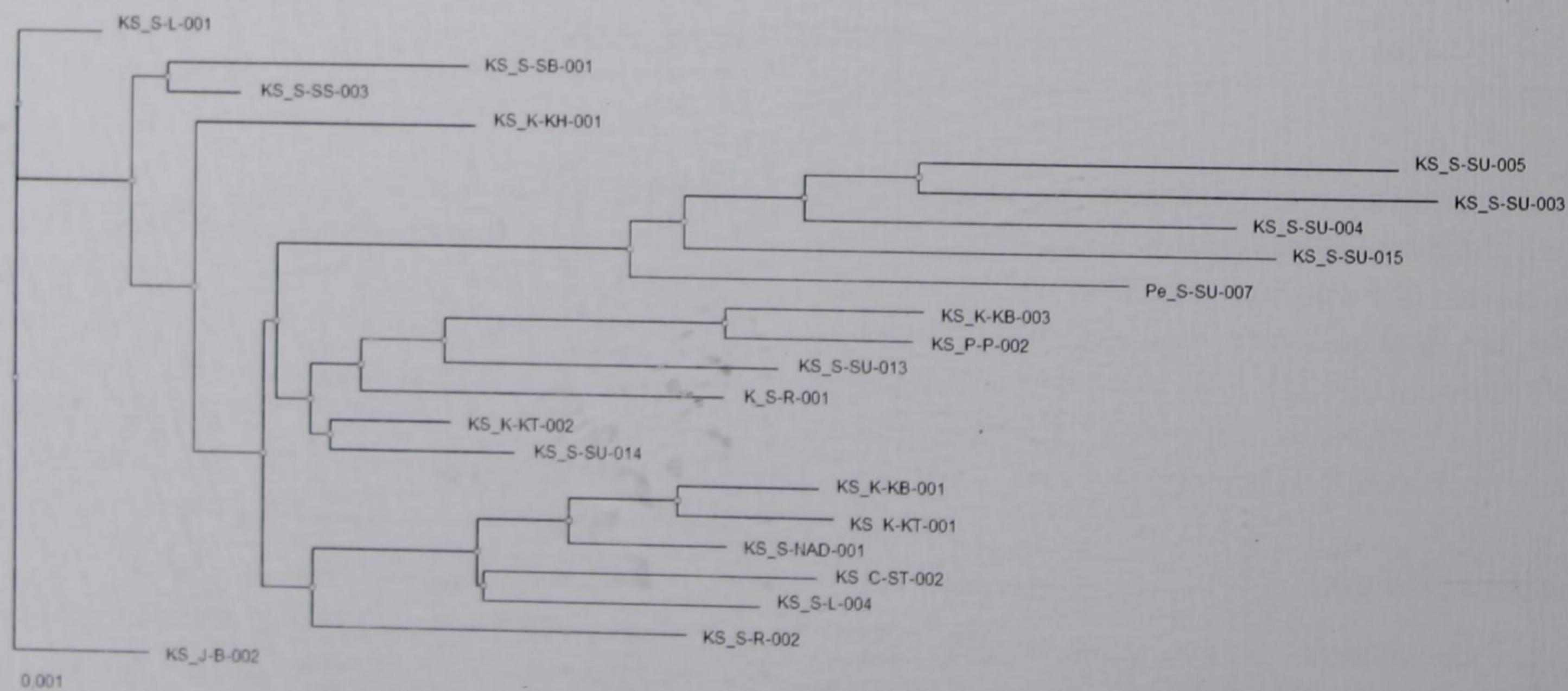
Kajian kekerabatan genetik menggunakan AFLP menunjukkan bahwa pengelompokan isolat *Ganoderma* di Indonesia, secara genetik tidak berdasarkan pada asal geografi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Miller *et al.* (1999)

Tabel 4. Pemotongan hasil amplifikasi daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 menggunakan Mlul dan SacI.

Table 4. Cutting of amplified product of ITS1-5,8S rDNA-ITS2 region by using Mlul and SacI.

Kode Isolat	Mlul	Sacl
KS_J-B-002	+	+
KS_K-KB-001	+	+
KS_K-KT-001	+	+
KS_K-KB-003	+	+
KS_K-KH-001	+	+
KS_K-KT-002	+	+
KS_P-P-002	+	+
KS_C-ST-002	+	+
KS_S-SU-003	+	+
KS_S-SU-004	+	+
Pe_S-SU-007	+	+
K_S-R-001	+	+
KS_S-R-002	+	+
KS_S-SB-001	+	+
KS_S-NAD-001	+	+
KS_S-SU-013	+	+
Ar_S-SU-014	+	+
KS_S-SU-015	+	+
KS_S-SS-003	+	+
KS_S-L-001	+	+
KS_S-L-004	+	+

Keterangan: + : bisa terpotong



Gambar 2. Dendrogram kekerabatan genetik isolat *Ganoderma* menggunakan sekuen ITS.

Figure 2. Dendrogram of genetic relationship of *Ganoderma* isolates by using ITS sequence.



dan Purnamasari *et al.* (2012). Hal ini menunjukkan tingginya variabilitas genetik *Ganoderma* yang disebabkan oleh rekombinasi DNA saat perkawinan antar hifa yang berbeda (Miller *et al.*, 1999). Hasil *cluster analysis* juga tidak menunjukkan pengelompokan *Ganoderma* sp. berdasarkan jenis inangnya. Hal ini menunjukkan luasnya kisaran inang *Ganoderma*. Hasil pengelompokan tersebut berguna sebagai salah satu petunjuk untuk menentukan isolat *Ganoderma* Indonesia yang digunakan untuk uji inokulasi buatan *Ganoderma* di pembibitan. Jenis isolat yang digunakan dapat merupakan perwakilan dari kelompok genetik yang ada. Diharapkan, persilangan yang telah teruji toleran terhadap *Ganoderma* dari uji inokulasi buatan dengan sampel isolat yang berdasarkan hasil kajian tersebut, toleran terhadap kisaran genetik *Ganoderma* yang luas di seluruh wilayah Indonesia.

Perlu dipahami bahwa hasil analisis kekerabatan genetik isolat *Ganoderma* pada penelitian ini merupakan kekerabatan genetik secara umum, karena profil AFLP yang diperoleh tidak merujuk pada daerah genom tertentu. Kajian keragaman genetik *Ganoderma* perlu dikembangkan pada gen-gen khusus yang terlibat pada mekanisme patogenisitas *Ganoderma*. Dengan pendekatan tersebut, diharapkan akan diperoleh informasi yang lebih mewakili keragaman *Ganoderma* berdasarkan agresivitas dan patogenisitasnya terhadap kelapa sawit.

Hasil *cluster analysis* menggunakan AFLP didukung oleh *cluster analysis* menggunakan informasi sekuen daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2, dimana pengelompokan isolat *Ganoderma* di Indonesia, secara genetik tidak berdasarkan asal geografi. Kajian variabilitas sekuen daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 dapat digunakan untuk melakukan identifikasi spesies, karena DNA pada daerah tersebut bervariasi pada tingkat genus dan spesies (Schmitt *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, sampel yang dianalisis merupakan isolat *Ganoderma boninense* atau *Ganoderma* sp. Identifikasi spesies *Ganoderma* dengan pendekatan yang sama juga telah dikembangkan oleh Wong *et al.* (2012) pada kelapa sawit dan Mohanty *et al.* (2011) pada tanaman selain kelapa sawit.

Isolat *Ganoderma* yang dianalisis telah terkonfirmasi merupakan patogen kelapa sawit melalui uji pemotongan daerah ITS1-5,8S rDNA-ITS2 dengan Mlul dan Sacl. Pada kenyataannya, isolat *Ganoderma* tersebut tidak semuanya diisolasi dari kelapa sawit. Hal ini menunjukkan bahwa *Ganoderma* tersebut memiliki kisaran inang yang luas, yang didukung dari hasil kajian kekerabatan genetik yang menunjukkan bahwa isolat *Ganoderma* tidak mengelompok berdasarkan kesamaan inangnya. Tingginya variabilitas genetik *Ganoderma* menimbulkan hipotesa bahwa terdapat keragaman yang tinggi pada mekanisme patogenisitas *Ganoderma*. Hal ini menyarankan bahwa pengendalian *Ganoderma* dengan menggunakan beberapa pendekatan secara terpadu (Susanto, 2009) merupakan pendekatan yang terbaik.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kajian variabilitas genetik *Ganoderma* isolat Indonesia telah memberikan pengetahuan mengenai keragaman genetik *Ganoderma* dari berbagai wilayah di Indonesia, epidemiologi patogen, manajemen isolat yang digunakan pada uji inokulasi buatan di pembibitan, serta pendekatan pengendalian penyakit yang tepat. Penelitian lebih lanjut perlu dilakukan untuk mengetahui keragaman isolat pada gen-gen yang terlibat pada mekanisme patogenisitas *Ganoderma*.

## KESIMPULAN DAN SARAN

### Kesimpulan:

- *Cluster analysis* menggunakan AFLP dan sekuen ITS menunjukkan bahwa *Ganoderma* isolat Indonesia tidak mengelompok berdasarkan asal inang atau jenis inang.
- Isolat *Ganoderma* yang dianalisis pada penelitian merupakan *Ganoderma* sp. atau *G. boninense* dan merupakan *Ganoderma* patogenik pada kelapa sawit.

### Saran:

Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui keragaman isolat pada gen-gen yang terlibat pada mekanisme patogenisitas *Ganoderma*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, F., N. Jayanthi, G.N. Ilias dan N. Malik (2001). Properties of substrate inocula and plant hosts in disease establishment by *Ganoderma boninense*. PIPOC 2001 International Palm Oil Congress, Kuala Lumpur.
- Camus-Kulandaivelu, L., M. Maxime, T.J. Sheong, K. Christophe, T. Durand-Gasselin, S.S.R.S. Alwee dan F. Breton (2014). Identification of Laccase Genes in *Ganoderma boninense* Draft Genome Assembly. IOPC, Nusa Dua, Bali. Indonesian Oil Palm Research Institute
- Darmono, T. (2011). Strategi berperang melawan *Ganoderma* pada perkebunan kelapa sawit. Simposium Nasional dan Lokakarya *Ganoderma* "Sebagai Patogen Penyakit Tanaman dan Bahan Baku Obat Tradisional", Bogor.
- Durand Gasselin, T., N. Turnbull, H. de Franqueville, F. Breton, S. Jeyen, I. Syahputra dan B. Cochard (2014). Screening methodology to select oil palm planting material partially resistant to *Ganoderma boninense*. International Oil Palm Conference, Bali.
- Flood, J., Y. Hasan dan H. Foster (2002) Ganoderma diseases of oil palm-an interpretation from Bah Lias Research Station. Planter 78:689–710.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Idris, A.S. (2009). Basal stem rot in Malaysia: Biology, economic importance, epidemiology, detection and control. the International Workshop of Awareness, Detection and Control of Oil Palm Devastating Diseases, Kuala Lumpur.
- Miller, R.N.G., M. Holderness, P.D. Bridge, G.F. Chung dan M.H. Zakaria (1999) Genetic diversity of *Ganoderma* in oil palm plantings. Plant Pathology 48:595–603.
- Mohanty, P.S., N.S.K. Harsh dan A. Pandey (2011) First report of *Ganoderma resinaceum* and *G. weberianum* from north India based on ITS sequence analysis and micromorphology. Mycosphere 2:469–474.
- Ningrum, D.A., S. Wening dan S. Hanum (2014). Screening of AFLP Primers for Molecular Variability Test in Wild Type Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) from Cameroon. 2014 International Oil Palm Conference, Nusa Dua, Bali. IOPRI
- Purnamasari, M.I., C. Prihatna, A.W. Gunawan dan A. Suwanto (2012) Isolasi dan Identifikasi Secara Molekuler *Ganoderma* spp. yang Berasosiasi dengan Penyakit Busuk Pangkal Batang di Kelapa Sawit. Jurnal Fitopatologi Indonesia 8.
- Schmitt, I., A. Crespo, P.K. Divaka, J.D. Fankhauser, E. Herman-Sackett, K. Kalb, M.P. Nelsen, N.A. Nelson, E. Rivas-Plata, A.D. Shimp, T. Widholm dan H.T. Lumbsch (2009) New primers for promising single-copy genes in fungal phylogenetics and systematics. Persoonia 23:35-40.
- Steyaert, R.L. (1975) G. applanatum, G. boninense, G. uecidum, G. philippi, G. tornatum, and G. zonatum. CMI Descr. Pathog. Fungi Bact.:443-448.
- Susanto, A. (2009). Basal stem rot in Indonesia: Biology, economic importance, epidemiology, detection and control. International Workshop of Awareness, Detection and Control of Oil Palm Devastating Diseases, Kuala Lumpur.
- Susanto, A., A.E. Prasetyo dan S. Wening (2013) Laju Infeksi *Ganoderma* pada Empat Kelas Tekstur Tanah. Jurnal Fitopatologi Indonesia 9:39-46.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski dan S. Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30:2725-2729.
- Utomo, C., S. Werner, F. Niepold dan H.B. Deising (2005) Identification of *Ganoderma*, the causal agent of basal stem rot disease in oil palm using a molecular method. Mycopathologia 159:159–170.
- Virdiana, I., J. Flood, B. Sitepu, Y. Hasan, R. Aditya dan S. Nelson (2012) Integrated disease management to reduce future *Ganoderma*



- infection during oil palm replanting. *Planters* 88:383-393.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Friters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper dan M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Wening, S., R. Faizah, H.Y. Rahmadi, Y. Yenni, dan A.R. Purba (2013) Sidik jari DNA plasma nutfah kelapa sawit koleksi Pusat Penelitian Kelapa Sawit. *Jurnal Penelitian Kelapa Sawit* 21:1-9.
- Wening, S., A.E. Prasetyo, A. Susanto, H.Y. Rahmadi, Y. Yenni dan A.R. Purba (2013). Keragaman sekuen gen kitinase: Identifikasi penanda toleransi kelapa sawit terhadap *Ganoderma*. Pertemuan Teknis Kelapa Sawit 2013, Jakarta. PPKS.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee dan J. Taylor (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J., editors, *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic Press, New York. p. 315-322.
- Wicaksono, W.A., R.F. Buana dan E.C. Situmorang (2011) Analisis keragaman genetik *Ganoderma boninense* dari beberapa perkebunan berdasarkan Marka Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *BioTeknoSawit-Jatrophia* 1:25-31.
- Wong, L.-C., C.-F.J. Bong, dan A.S. Idris (2012) *Ganoderma Species Associated with Basal Stem Rot Disease of Oil Palm*. *American Journal of Applied Sciences* 9:879-885.
- Yanti, F. dan A. Susanto (2004) Cara praktis isolasi tubuh buah *Ganoderma boninense* pada medium potato dextrose agar (PDA). *Warta Pusat Penelitian Kelapa Sawit* 12:11-14.
- Zheng, L., D. Jia, X. Fei, X. Luo dan Z. Yang (2009) An assessment of the genetic diversity within *Ganoderma* strains with AFLP and ITS PCR-RFLP. *Microbiological Research* 164:312—321.