

Analisis keragaman genetik *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan tanaman kakao dan tanaman pelindungnya menggunakan *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)*

Genetic diversity analysis of Ganoderma spp. associated with cocoa and its shade trees using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Hayati MINARSIH^{1),*)}, Dyah LINGGA NP²⁾, TW DARMONO¹⁾ & Elis Nina HERLIYANA³⁾

¹⁾Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Jl. Taman Kencana No. 1, Bogor 16151, Indonesia

²⁾Departemen Biokimia, Fakultas MIPA, Jl Agatis, Kampus Darmaga, IPB, Bogor 16680, Indonesia

³⁾Fakultas Kehutanan, Jl. Meranti, Kampus Darmaga, IPB, Bogor 16680, Indonesia

Diterima 19 Agustus 2010/Disetujui 3 Januari 2011

Abstract

Information on genetic diversity of *Ganoderma* spp. causing root rot disease in crops is important to develop a proper strategy for the control of *Ganoderma* disease. The objectives of this research were to study the genetic diversity of *Ganoderma* spp. associated with cacao and its shade trees (*Albizia falcataria*, *Swietenia mahogany*, *Adenathera microsperma* and *Leucaena leucocephala*) by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Forty five samples of *Ganoderma* spp. were used in this research. The results showed that DNA amplification using 10 arbitrary oligonucleotide primers produced 220 DNA fragments showing polymorphisms. The cluster analysis showed that 45 number of *Ganoderma* samples had a high variability with the coefficient value ranged from 0.71 to 0.91. Further analysis using Winboot software showed that three groups of *Ganoderma* spp. had a high degree of confidence (>50 %), which were *Ganoderma* samples from sengon (*Paraserianthes* sp.) of Tasikmalaya, sengon (*Paraserianthes* sp.) of Palembang, and mahogany of Jember; whereas the other groups of samples had a low degree of confidence (<50 %).

[Key words: *Ganoderma* spp., shading tree, sengon tree, RAPD marker, polymorphic]

Abstrak

Informasi tentang keragaman genetik *Ganoderma* spp. sebagai penyebab penyakit busuk akar pada tanaman perkebunan sangat diperlukan untuk menerapkan strategi yang tepat dalam upaya perlindungan tanaman perkebunan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan tanaman kakao dan tanaman pelindungnya (sengon, mahoni, saga dan lamtoro) dari berbagai wilayah di Indonesia menggunakan penanda molekuler *random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. Sebanyak 45 sampel *Ganoderma* spp digunakan dalam penelitian ini. Amplifikasi DNA dengan 10 primer terpilih menghasilkan 220 fragmen DNA yang menunjukkan adanya polimorfisme. Hasil analisis menunjukkan adanya keragaman yang cukup tinggi di antara sampel *Ganoderma* spp. dari pohon inang dan wilayah yang berbeda, dengan nilai koefisien 0,71-0,91. Berdasarkan analisis *bootstrap*

diketahui bahwa tiga kelompok sampel *Ganoderma* spp. memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi (>50 %) yaitu kelompok *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan pohon sengon asal Tasikmalaya, sengon Palembang, dan mahoni Jember; sedangkan pengelompokan lainnya menunjukkan tingkat kepercayaan yang rendah (<50 %).

[Kata kunci: *Ganoderma* spp., tanaman pelindung, sengon, marka RAPD, polimorfisme]

Pendahuluan

Tanaman kakao merupakan komoditas perkebunan penting dan banyak diusahakan oleh masyarakat di Indonesia. Dalam penanamannya, kakao memerlukan tanaman pelindung. Tanaman sengon (*Paraserianthes falcataria* (L.) Nielsen) merupakan salah satu tanaman hutan rakyat yang banyak diusahakan oleh masyarakat dalam sistem agroforestri di Indonesia (Iskandar, 2006; Riyanto, 2009). Selain menghasilkan kayu untuk berbagai keperluan industri, tanaman sengon juga ditanam sebagai penangun tanaman pertanian/perkebunan seperti kopi, kakao dan pisang. Salah satu kendala yang cukup berarti dalam pengusahaan tanaman kakao adalah terjadinya serangan penyakit akar yang disebabkan oleh cendawan *Ganoderma* spp. Tanaman pelindung terutama sengon diketahui peka terhadap *Ganoderma* dengan tingkat serangan berkisar antara 3-26% (Widyastuti, 2007). Serangan *Ganoderma* pada tanaman sengon terus meningkat dari tahun ke tahun, bahkan serangan setinggi 100 % dilaporkan terjadi pada tanaman sengon generasi kedua (Rumiyati *et al.*, 2002).

Ganoderma spp. merupakan salah satu cendawan golongan Basidiomycetes yang membentuk tubuh buah berupa lempengan keras menempel pada pangkal batang tanaman inang. Permukaan atas berwarna coklat kemerahan atau coklat tua, sedangkan bagian bawah berwarna putih kekuning-kuningan dimana terdapat berjuta-juta basidiospora (Widyastuti, 2007). *Ganoderma* dapat menyebabkan penyakit busuk akar yang serangannya baru diketahui ketika tingkat infeksi

*) Penulis korespondensi: hmiskan@yahoo.com

sudah kritis dan tanaman sudah sulit diselamatkan (Bassett & Peters, 2003; Mohd Su'ud *et al.*, 2007). Mekanisme penularan penyakit busuk akar terjadi melalui perpindahan spora *Ganoderma* spp. dari pohon yang terinfeksi atau kontak antara akar pohon yang sakit dengan pohon yang masih sehat (Flood *et al.*, 2000).

Penanda molekuler RAPD dihasilkan melalui proses amplifikasi DNA secara *in vitro* dengan PCR menggunakan primer acak (arbitrary). Prosedur RAPD lebih murah, lebih cepat, membutuhkan sampel DNA dalam jumlah lebih sedikit (0,5-50 ng), tidak memerlukan radioisotop, dan tidak terlalu membutuhkan keahlian untuk pelaksanaannya dibanding penanda lainnya seperti RFLP. Teknik RAPD telah banyak diaplikasikan dalam analisis keragaman genetik tanaman perkebunan, di antaranya kelapa sawit (Toruan-Mathius *et al.*, 2001), kakao (Faleiro *et al.*, 2002) dan karet (Nurhaimi-Haris *et al.*, 1998). Selain itu, teknik RAPD telah digunakan dalam beberapa penelitian analisis genetik mikroorganisme, di antaranya keragaman genetik *Staphylococcus aureus* (Morandi *et al.*, 2010). Aplikasi RAPD dalam analisis keragaman genetik dan identifikasi cendawan telah banyak dilakukan seperti pada *Phytophthora infestans* (Atheya *et al.*, 2005), *Aspergillus flavus* (Midorikawa *et al.*, 2008) dan *Colletotrichum truncatum* (Sant'Anna *et al.*, 2010). Saat ini penggunaan teknik molekuler untuk penetapan keragaman genetik *Ganoderma* spp. telah dilakukan (Suryanto *et al.*, 2005; Zakaria *et al.*, 2009). Namun demikian analisis kekerabatan *Ganoderma* pada tanaman kakao dengan tanaman pelindungnya sengon dan kerabatnya belum pernah dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman genetik *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan tanaman kakao dan tanaman pelindungnya (sengon, mahoni, saga dan lamtoro) dari berbagai wilayah di Indonesia. Hipotesis yang diajukan adalah adanya keragaman yang cukup tinggi di antara sampel *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan beberapa jenis pohon inang yang berbeda dari berbagai wilayah Indonesia. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi keragaman genetik *Ganoderma* spp. dan dapat dijadikan bahan pertimbangan dalam memilih tanaman pelindung sehingga tanaman utama dapat terhindar dari serangan penyakit busuk akar yang disebabkan oleh *Ganoderma* spp.

Bahan dan Metode

Bahan penelitian

Sampel yang digunakan berupa tubuh buah cendawan *Ganoderma* yang dipetik dari tanaman yang masih tumbuh di lapang maupun dari tunggul-tunggul batang pohon yang sudah mati. Tubuh buah *Ganoderma* spp. dipetik dari berbagai tanaman inang

dan beberapa daerah di Indonesia meliputi Jawa, Sumatera dan Kalimantan (Tabel 1).

Pembuatan medium tumbuh *Ganoderma* spp.

Komposisi medium tumbuh *Ganoderma* spp. terdiri atas; ekstrak ragi 20 g/L, pepton 5 g/L, dan agar Bacto 15 g/L. Bahan-bahan tersebut dilarutkan dengan akuades kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Antibiotik Streptomisin sebanyak 100 mg/L dan fungisida Benlate sebanyak 10 mg/L ditambahkan pada medium yang sudah diautoklaf pada suhu 30-40°C, kemudian dituang ke dalam cawan Petri steril dan didiamkan hingga padat.

Penyiapan isolat murni.

Isolat murni diperoleh dari 45 tubuh buah *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan pohon kakao, sengon, mahoni, dan lamtoro asal Tasikmalaya, Ciamis, Kediri, Jember, Lampung, Palembang, dan Kalimantan (Tabel 1). Tubuh buah *Ganoderma* spp. dipatahkan dengan tangan dan jaringan tubuh buah yang terletak di tengahnya (yang secara alami steril) diambil satu cuplikan menggunakan pinset steril kemudian diinokulasikan pada medium *malt extract agar* (MEA) dan diinkubasi pada suhu ruang selama 3-5 hari. Sebelum kultur *Ganoderma* spp. hasil isolasi digunakan, dilakukan peremajaan pada medium MEA. Miselia yang digunakan untuk bahan isolasi DNA merupakan hasil subkultur dalam medium cair yang telah dibilas dengan aquades steril dan disimpan dalam freezer bersuhu -60°C. Pertumbuhan morfologi miselia diamati.

Isolasi DNA dari isolat murni *Ganoderma* spp.

Isolasi DNA genomik dilakukan menggunakan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang telah dimodifikasi yaitu dengan penambahan β -merkaptotanol dan polyvinilpolypyrrolidone (PVPP) pada saat ekstraksi. Pengujian integritas DNA secara kualitatif dilakukan dengan elektroforesis gel agarosa 1 %. Pengukuran kuantitas DNA dilakukan dengan metode spektrofotometri menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang (λ) 230, 260 dan 280 nm.

Seleksi primer untuk amplifikasi DNA

Sebanyak 20 primer oligonukleotida acak dari Operon yaitu OPC 1-20 digunakan untuk mengamplifikasi beberapa sampel DNA, dengan program RAPD-PCR (Tabel 2). Produk PCR kemudian diuji dengan elektroforesis gel agarosa untuk melihat pita-pita yang terbentuk. Dari pita-pita yang dihasilkan, dipilih primer-primer yang dapat menghasilkan pita dengan intensitas tinggi dan berjumlah relative banyak. Sepuluh primer terpilih yaitu OPC 01, OPC 02, OPC 03, OPC

Tabel 1. Tanaman inang dan lokasi asal sampel *Ganoderma* spp.Table 1. Host plants and origin of *Ganoderma* spp. samples

Nomor sample <i>Sample's number</i>	Kode sample <i>Sample's code</i>	Pohon inang <i>Host plant</i>	Asal wilayah/daerah <i>Origin of location</i>
1	P2	Sengon	Pawon, Kediri
2	P4	Sengon	Pawon, Kediri
3	P5	Sengon	Pawon, Kediri
4	P6	Sengon	Pawon, Kediri
5	P7	Saga	Pawon, Kediri
6	10	Sengon	Tasikmalaya
7	GL2	Sengon	Ciamis
8	G12(2)	Sengon	Tasikmalaya
9	G16(1)	Sengon	Tasikmalaya
10	G17(3)	Sengon	Tasikmalaya
11	KW1	Mahoni	Kaliwining, Jember
12	KW2	Mahoni	Kaliwining, Jember
13	KW3	Mahoni	Kaliwining, Jember
14	KW4	Mahoni	Kaliwining, Jember
15	KW5	Kakao	Kaliwining, Jember
16	KW6	Kakao	Kaliwining, Jember
17	KW7	Sengon laut	Kaliwining, Jember
18	KW8	Lamtoro	Kaliwining, Jember
19	PL1	Sengon	Palembang
20	PL2	Sengon	Palembang
21	PL3	Sengon	Palembang
22	PL4	Sengon	Palembang
23	PL5	Sengon	Palembang
24	PL6	Sengon	Palembang
25	PL7	Sengon	Palembang
26	PL8	Sengon	Palembang
27	L2	Sengon	Lampung
28	K2	Sengon	Kalimantan Selatan
29	K5	Sengon	Kalimantan Selatan
30	K3	Sengon	Kalimantan Selatan
31	T3	Sengon	Tasikmalaya
32	T5	Sengon	Tasikmalaya
33	T6	Sengon	Tasikmalaya
34	T8	Sengon	Tasikmalaya
35	T9	Sengon	Tasikmalaya
36	T10	Sengon	Tasikmalaya
37	T11	Sengon	Tasikmalaya
38	T12	Sengon	Tasikmalaya
39	T17	Sengon	Tasikmalaya
40	T14	Sengon	Tasikmalaya
41	T16	Sengon	Tasikmalaya
42	T18	Sengon	Tasikmalaya
43	T19	Sengon	Tasikmalaya
44	T20	Sengon	Tasikmalaya
45	T21	Sengon	Tasikmalaya

04, OPC 05, OPC 08, OPC 12, OPC 13, OPC 14, dan OPC 15 selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi seluruh sampel.

Amplifikasi DNA dengan metode RAPD

Sampel DNA *Ganoderma* spp. disiapkan dalam konsentrasi 100 µg/mL. Larutan mix (Fermentas) dibuat dengan mencampurkan 2,5 µL bufer PCR, 0,5 µL dNTPs 10 mM, 0,3 µL Taq DNA polimerase, dan

19,7 µL NFW ke dalam tabung Eppendorf. Selanjutnya ke dalam tabung mikro dimasukkan 1 µL primer, 1 µL DNA sampel, dan 23 µL larutan mix. Reaksi PCR dilakukan dengan program sebagai berikut: satu siklus denaturasi awal pada suhu 92°C selama dua menit; satu siklus berikutnya yang terdiri atas denaturasi pada suhu 92°C selama tiga menit 30 detik, *annealing* pada suhu 35°C selama satu menit, dan eksistensi pada

suhu 72°C selama dua menit; dilanjutkan dengan 44 siklus yang terdiri atas denaturasi pada suhu 92°C selama satu menit, penempelan pada suhu 35°C selama satu menit, dan ekstensi pada suhu 72°C selama dua menit; kemudian dilanjutkan dengan reaksi pada suhu 72°C selama tujuh menit. Hasil amplifikasi kemudian diseparasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,4 % dan divisualisasikan dengan UV transiluminator.

Analisis polimorfisme

Data yang diperoleh dari pemotretan gel hasil RAPD berupa pita-pita DNA diurutkan dari batas bawah sumur sampai batas bawah pita yang masih tampak. Analisis data didasarkan pada ada atau tidaknya pita. Profil pita diterjemahkan ke dalam bentuk biner dengan ketentuan nilai 0 untuk tidak ada pita dan 1 untuk ada pita pada satu posisi yang sama dari nomor-nomor sampel yang dibandingkan. Pengelompokan data matriks (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram dilakukan dengan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) menggunakan program *Numerical Taxonomy and Multivariate System* (NTSYS) versi 2.02 (Tarinzhad *et al.*, 2005). Studi statistika untuk mengetahui derajat ketelitian data UPGMA dilakukan dengan analisis *bootstrap* menggunakan program *Winboot* (Yap & Nelson, 1996).

Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA dari isolat murni Ganoderma spp.

Isolasi *Ganoderma* spp. dapat dilakukan dengan dua cara yaitu secara langsung dari tubuh buah atau secara tidak langsung dari akar atau bagian tubuh tanaman yang terinfeksi. Isolat murni *Ganoderma* spp. tumbuh sebagai miselium berwarna putih yang menyebar ke arah samping (Gambar 1). Banyaknya miselium yang diperoleh beragam berdasarkan jenis *Ganoderma* spp. dan usia pertumbuhannya. Beberapa sampel *Ganoderma* spp. menunjukkan tingkat pertumbuhan yang berbeda. Berdasarkan pengamatan, faktor yang sangat berpengaruh adalah usia isolat awal. Isolat yang masih muda cenderung mengalami pertumbuhan yang lebih cepat dibandingkan dengan isolat sejenis yang berusia lebih tua.

DNA yang telah diisolasi dari isolat murni selanjutnya dikarakterisasi secara kualitatif menggunakan elektroforesis gel agarosa 1 %. Ukuran DNA total *Ganoderma* spp. yang diisolasi adalah sekitar 12000 bp (Gambar 2). Isolasi DNA yang dilakukan dengan metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) memberikan hasil yang cukup baik, dilihat dari kualitas dan kuantitas DNA yang diperoleh. Berdasarkan pengukuran, konsentrasi DNA yang diperoleh cukup baik, yaitu berkisar antara 105-2575 µg/mL. Jumlah ini sudah mencukupi untuk dijadikan stok dalam analisis, karena

RAPD hanya membutuhkan DNA dalam jumlah kecil (0,5-50 ng). Kemurnian DNA yang digambarkan oleh nilai rasio absorbansi pada 260 dan 280 nm berkisar antara 1,069 dan 1,918. Nilai absorbansi yang rendah pada beberapa sampel *Ganoderma* spp. kemungkinan disebabkan oleh banyaknya polisakarida yang terkandung dalam sampel miselium *Ganoderma* spp. yang diisolasi.

Seleksi primer dan amplifikasi DNA

Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA total *Ganoderma* dipilih dari 20 primer yang tersedia yaitu OPC 01-OPC 20. Hasil amplifikasi menunjukkan bahwa sebanyak 18 primer dapat menghasilkan fragmen DNA pada kedua sampel, satu primer menghasilkan fragmen hanya pada satu sampel, dan satu primer tidak menghasilkan fragmen pada kedua sampel (data tidak ditunjukkan). Selanjutnya dipilih sepuluh primer yang menghasilkan fragmen pada kedua sampel secara jelas dan mudah dibedakan, yaitu OPC 01, OPC 02, OPC 03, OPC 04, OPC 05, OPC 08, OPC 12, OPC 13, OPC 14, dan OPC15. Kesepuluh primer ini selanjutnya digunakan untuk mengamplifikasi 45 sampel DNA *Ganoderma* spp.

Analisis polimorfisme

Dari hasil amplifikasi 45 sampel DNA *Ganoderma* spp. menggunakan 10 primer acak terpilih, diperoleh 220 fragmen DNA. Gambar 3. memperlihatkan pola pita yang dihasilkan oleh primer OPC 01 dan OPC 03 pada 45 sampel *Ganoderma* spp. Ukuran fragmen yang dihasilkan sangat bervariasi antara 150 bp sampai 2000 bp. Hal ini disebabkan oleh primer yang bersifat acak dan menempel secara acak pula pada bagian genom yang sesuai. Dari total 220 fragmen yang dihasilkan, hampir seluruhnya merupakan fragmen polimorfik, ini menunjukkan bahwa keragaman genetik antar sampel *Ganoderma* spp. yang dianalisis cukup tinggi. Berdasarkan pola pita elektroforesis tersebut, selanjutnya dibuat pengelompokan sampel *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan berbagai jenis pohon pelindung (sengon, mahoni, saga dan lamtoro) dan juga kakao, ditunjukkan dengan dendrogram yang divalidasi dengan analisis bootstrap seperti ditunjukkan pada Gambar 4. Nilai koefisien menunjukkan angka kedekatan antar nomor sampel *Ganoderma* spp. secara genetik, sedangkan angka-angka pada batang menunjukkan derajat ketelitian data yang dianalisis menggunakan *WinBoot*. Nilai koefisien yang dihasilkan berkisar antara 0,71 dan 0,91. Hasil penelitian Hseu *et al.* (1996) yang melaporkan analisis RAPD pada beberapa isolat *Ganoderma lucidum* kompleks menghasilkan nilai koefisien yang kurang lebih mendekati yaitu sebesar

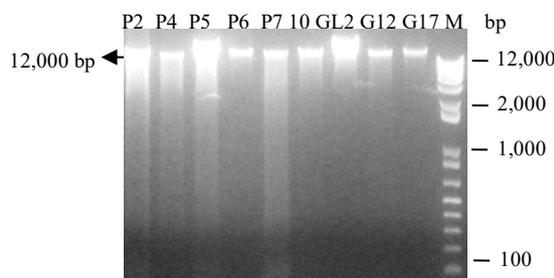
Tabel 2. Primer yang digunakan beserta urutan basanya
 Table 2. Primers used with the sequences

Primer Primer	Urutan basa Sequences
OPC-01	TTCGAGCCAG
OPC-02	GTGAGGCGTC
OPC-03	GGGGGTCTTT
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-05	GATGACCGCC
OPC-06	GAACGGACTC
OPC-07	GTCCCGACGA
OPC-08	TGGACCGGTG
OPC-09	CTCACCGTCC
OPC-10	TGTCTGGGTG
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPC-12	TGTCATCCCC
OPC-13	AAGCCTCGTC
OPC-14	TGCGTGCTTG
OPC-15	GACGGATCAG
OPC-16	CACACTCCAG
OPC-17	TTCCCCCAG
OPC-18	TGAGTGGGTG
OPC-19	GTTGCCAGCC
OPC-20	ACTTCGCCAC



Gambar 1. Isolat murni *Ganoderma* spp. yang ditumbuhkan di medium malt extract agar (MEA).

Figure 1. *Ganoderma* spp. pure isolate cultured in malt extract agar media (MEA)



Gambar 2. Elektroforegram sembilan sampel DNA total *Ganoderma* spp. M = marker 1kb plus DNA ladder. Kode sampel tertera pada Tabel 1.

Figure 2. Electrophoregram of nine *Ganoderma* spp. total DNA samples. M = 1kb plus DNA ladder marker. Samples codes are listed in Table 1.

0,60-0,89. Kisaran nilai koefisien pada *Ganoderma* spp. menggambarkan bahwa latar belakang genetik sampel-sampel *Ganoderma* spp. yang dianalisis tergolong cukup dekat, mengingat sampel-sampel yang dianalisis masih berada dalam satu genus. Nilai koefisien dan tingkat kepercayaan yang cukup tinggi dihasilkan pada kelompok T14 sengan Tasik – T20 sengan Tasik (koef. 0,91 dengan tingkat kepercayaan 100%), PL1 sengan Palembang – PL2 sengan Palembang (koef. 0,82 dengan tingkat kepercayaan 88,6 %), serta KW2 mahoni – KW3 mahoni Jember (koef. 0,82 dengan tingkat kepercayaan 55,2 %) (Gambar 4). Masing-masing kelompok tersebut merupakan sampel *Ganoderma* spp. yang menginfeksi jenis pohon yang sama dan berasal dari wilayah yang

sama. Pola seperti ini terjadi pula pada kelompok lain dengan koefisien yang lebih kecil.

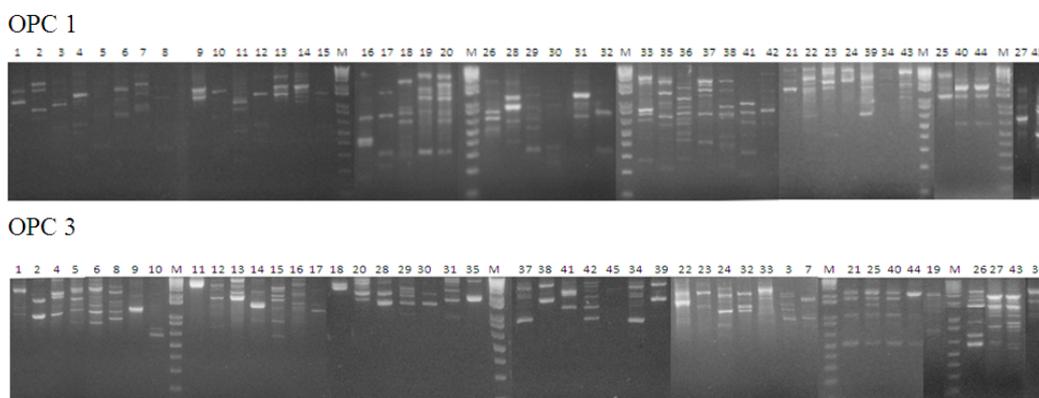
Analisis statistika menggunakan perangkat lunak *Winboot* menghasilkan derajat ketelitian yang rendah pada beberapa sampel (<50 %), artinya pengelompokan pada kelompok tersebut menghasilkan pola yang sama pada 1000 kali pengulangan sebanyak kurang dari 50 %. Hal ini mungkin disebabkan oleh tingkat *reproducibility* metode RAPD yang rendah (Bardakci, 2001). Kemungkinan lainnya adalah disebabkan oleh sifat primer yang acak sehingga sulit didapatkan situs penempelan yang spesifik pada genom *Ganoderma*. Menurut Bustamam & Moeljopawiro (1998), agar pengelompokan memiliki signifikansi yang tinggi

(90-100 %), perlu dilakukan penelusuran primer-primer yang mampu mengelompok dengan tingkat kepercayaan lebih tinggi, serta penggunaan primer yang lebih banyak dan beragam agar daerah genom *Ganoderma* yang teramplifikasi dapat semakin terwakili. Pada penelitian ini, hanya digunakan sepuluh primer yang pemilihannya didasarkan pada kemampuan primer menghasilkan fragmen yang cukup banyak dan tegas.

Dendogram yang dihasilkan dari analisis 45 sampel *Ganoderma* spp. dapat dikelompokkan ke dalam lima kelompok besar pada nilai koefisien 0,766 (Gambar 4). Secara umum terlihat bahwa sampel-sampel cenderung mengelompok menurut jenis pohon inang yang diinfeksi. Pengelompokan berdasarkan pohon inang ini kemungkinan dapat digunakan untuk memperkirakan tingkat virulensi ataupun pola penularan penyakit busuk akar yang disebabkan oleh *Ganoderma* di antara tanaman perkebunan (kakao) dan pohon pelindungnya yaitu sengon, mahoni, saga dan lamtoro. Kelompok satu, dua, dan empat terdiri atas sampel-sampel *Ganoderma* spp. yang hanya menginfeksi pohon sengon. Kelompok tiga menunjukkan sedikit perbedaan dengan masuknya sampel *Ganoderma* spp. dari pohon kakao (KW5) ke dalam kelompok tersebut. Hal ini dapat berarti terdapat kemiripan genetik yang cukup dekat antara *Ganoderma* asal pohon sengon dan kakao, yang mengindikasikan bahwa penyakit busuk akar pada kakao dapat disebabkan pula oleh *Ganoderma* spp. dari sengon dan atau sebaliknya. Hal tersebut ditunjang pula oleh hasil uji patogenesis isolat *Ganoderma* spp. asal kakao ke sengon. Kemungkinan ini dapat digunakan sebagai pertimbangan untuk penggunaan pohon sengon sebagai pelindung tanaman kakao. Sedangkan kelompok lima merupakan kelompok besar yang terdiri

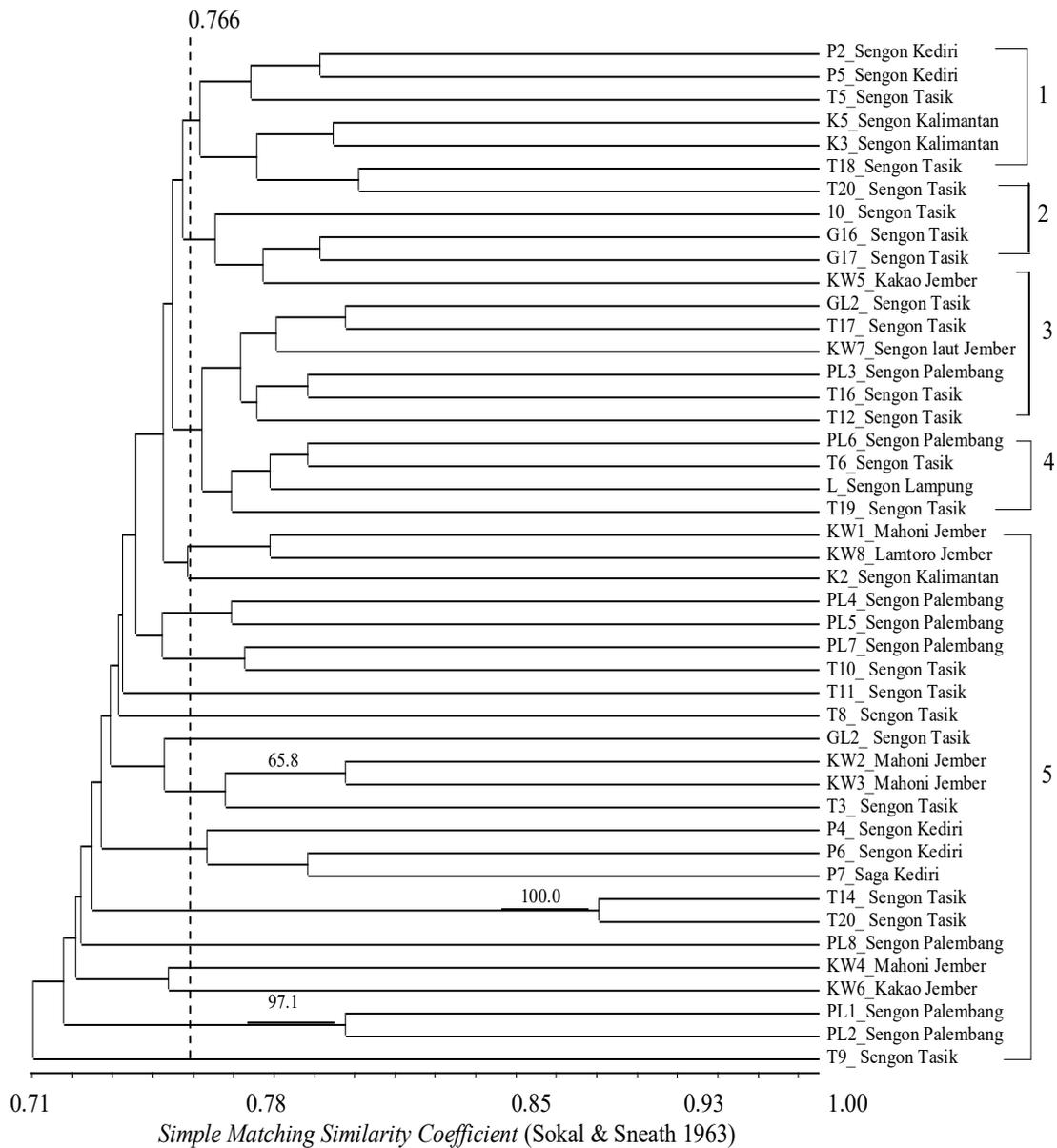
dari gabungan antara *Ganoderma* spp. yang menyerang sengon dan juga mahoni, lamtoro dan kakao dari berbagai daerah. Adanya sampel *Ganoderma* spp. pada kakao dalam kelompok tersebut juga dapat mengindikasikan bahwa adanya kedekatan genetik antara *Ganoderma* pada kakao dan tanaman pelindungnya.

Di antara 37 nomor sampel *Ganoderma* spp. yang menyerang tanaman sengon, hasil analisis menunjukkan bahwa kedekatan genetik cenderung terjadi pada sampel-sampel yang berasal dari wilayah yang sama (Gambar 5). Dendogram yang terbentuk juga dapat dikelompokkan menjadi lima kelompok besar berdasarkan nilai koefisien 0,766. Berdasarkan wilayah tempat tumbuhnya, secara umum sampel-sampel dari wilayah yang sama sebagian besar mengelompok secara berdekatan seperti pada kelompok satu dan lima didominasi oleh sengon dari Tasikmalaya, sedangkan kelompok empat didominasi oleh sengon dari Palembang. Hal ini mengindikasikan bahwa *Ganoderma* spp. pada wilayah yang sama memiliki latar belakang genetik yang cukup dekat. Beberapa sampel berbeda wilayah terlihat berdekatan dan terletak dalam satu kelompok dengan sampel *Ganoderma* berbeda wilayah, yaitu sampel *Ganoderma* Lampung, KW7 Jember, PL6 Palembang, dan P6 Kediri, dengan tingkat kepercayaan yang rendah (<50 %). Adanya beberapa sampel yang mengelompok dengan sampel lain dari wilayah yang berbeda kemungkinan berkaitan dengan sejarah migrasi sampel dari satu wilayah ke wilayah lainnya. Hal ini perlu ditelusuri lebih lanjut untuk mempelajari pola penyebaran *Ganoderma* spp. di Indonesia. Untuk mendapat pola penyebaran *Ganoderma* spp. yang lebih jelas perlu dilakukan kajian lebih jauh dengan jumlah sampel yang lebih banyak dan variatif serta primer yang lebih banyak dan teruji.



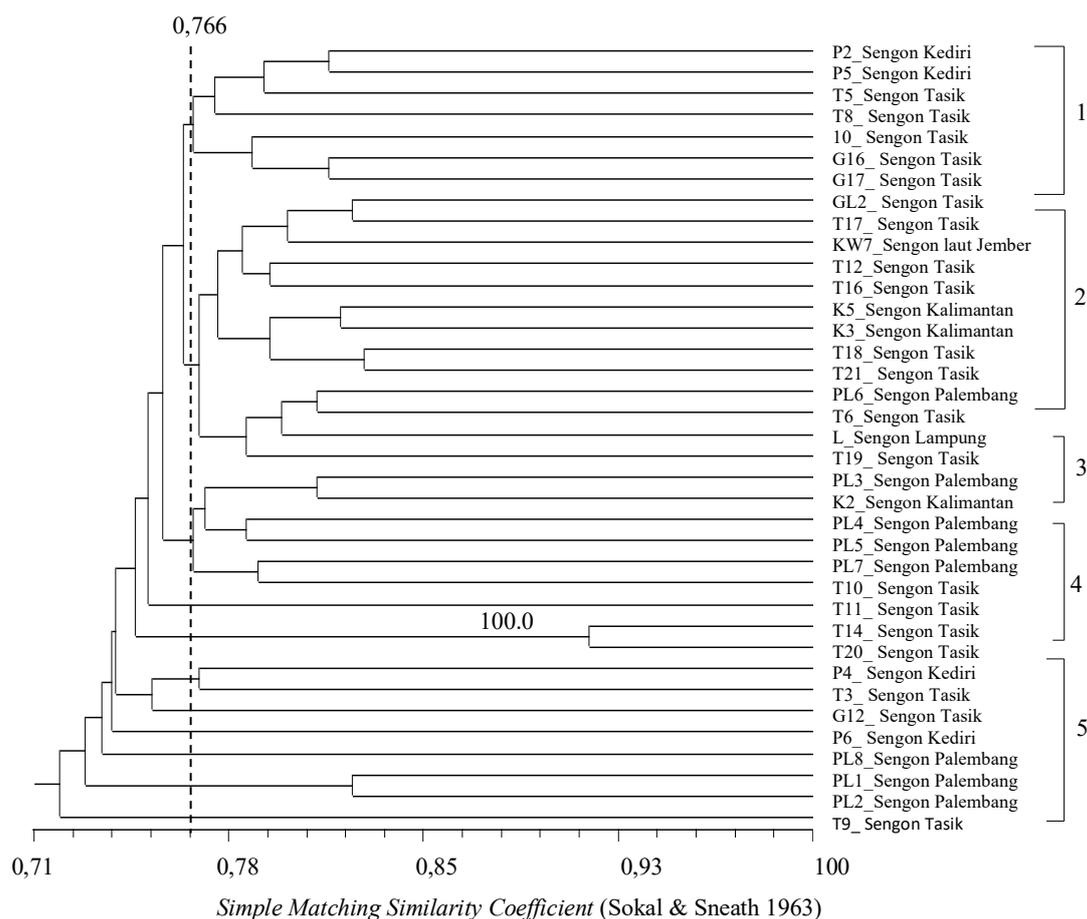
Gambar 3. Hasil amplifikasi 15 sampel DNA *Ganoderma* spp. menggunakan primer OPC 01 dan OPC 03. 1-45: nomor sampel *Ganoderma* dari berbagai wilayah di Indonesia. M= marker 1kb plus DNA ladder.

Figure 3. Amplification products of 15 *Ganoderma* spp. DNA using primer OPC 01 and OPC 03, 1-45: samples number of *Ganoderma* from various locations in Indonesia. M= 1kb plus DNA ladder marker.



Gambar 4. Dendrogram kemiripan genetik 45 sampel *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan beberapa jenis pohon (sengon, mahoni, lamtoro, saga dan kakao) dari berbagai wilayah di Indonesia berdasarkan metode UPGMA menggunakan 10 primer

Figure 4. Dendrogram of genetic similarity of 45 *Ganoderma* spp. samples associated with several plants (sengon, mahoni, lamtoro, saga and cocoa) from various locations in Indonesia, based on UPGMA method using 10 primers.



Gambar 5. Dendrogram kesamaan genetik 37 sampel *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan pohon sengon dari berbagai wilayah di Indonesia berdasarkan metode UPGMA menggunakan sepuluh primer.

Figure 5. Dendrogram of genetic similarity of 37 *Ganoderma* spp. samples associated with sengon tree from various locations in Indonesia based on UPGMA method using 10 primers.

Kesimpulan

Penanda molekuler *random amplified polymorphic DNA* menghasilkan polimorfisme yang tinggi sehingga dapat digunakan untuk menguji keragaman genetik *Ganoderma* spp. Analisis kluster dengan metode UPGMA menggunakan perangkat lunak NTSYS versi 2,02 menghasilkan dendrogram dengan nilai koefisien 0,71-0,91. Pengelompokan sampel *Ganoderma* spp. yang berdekatan cenderung terjadi di antara sampel-sampel dari pohon inang dan wilayah yang sama, namun beberapa sampel menunjukkan pola yang berbeda. *Ganoderma* yang menginfeksi sengon terlihat memiliki kedekatan genetik dengan yang menginfeksi kakao. Dengan demikian juga memiliki potensi untuk menginfeksi tanaman kakao dan sebaliknya.

Daftar Pustaka

- Atheya I, BP Singh, SK Chakrabarti & D Pattanayak (2005). Genetic diversity and differentiation of Indian isolates of *Phytophthora infestans* as revealed by RAPD analysis. *Indian J Exp Biol* 43 (9) 817-23
- Bardakci F (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J Biol* 25, 185-196.
- Bassett K & RN Peters (2003). *Ganoderma*: a significant root pathogen. *Arboricultural services Inc. Pub.* Diunduh dari: <http://www.arboricultural.com/articles/ganoderma.htm> [Des 2009].
- Bustamam M & S Moeljopawiro (1998). Pemanfaatan teknologi sidikjari DNA di bidang pertanian. *Zuriat* 9 (2), 77-90.

- Faleiro FG, MM Yamada, UV Lopes, ASG Faleiro, RCS Bahia, LMC Gomes, RC Santos & RF Santos (2002). Genetic similarity of *Theobroma cacao* L. accessions maintained in duplicate at the cacao research center germplasm collection based on RAPD markers. *Crop Breed and Appl Biotech* 2(3), 439-444.
- Flood J, Y Hasan, PD Turner & EB O'Grady (2000). The spread of *Ganoderma* from its infective sources in the field and its implications for management of the disease in oil palm. In: Flood J *et al.* eds. *Ganoderma Diseases of Perennial Crops*. CABI Publishing. p.101-112.
- Hseu R-S, H-H Wang, H-F Wang & J-M Moncalvo (1996). Differentiation and grouping of isolates of the *Ganoderma lucidum* complex by random amplified polymorphic DNA-PCR compared with grouping on the basis of internal transcribed spacer sequences. *App Env Microbiol* 62 (4), 1354-1363.
- Iskandar MI (2006). Pemanfaatan kayu hutan rakyat sengon (*Paraserianthes falcataria* (L) Nielsen) untuk kayu rakitan. Dalam: *Prosiding Seminar Hasil Litbang Hasil Hutan*. Bogor, Pusat penelitian dan Pengembangan Hasil Hutan, p. 183-195.
- Midorikawa GEO, MRR Pinheiro, BS Vidigal, MC Arruda, FF Costa, GJ Pappas Jr, SG Ribeiro, F Freire & RNG Miller (2008). Characterization of *Aspergillus flavus* strain from Brazillian Brazil Nuts and cashew by RAPD and ribosomal DNA analysis. *Lett Appl Microbiol* 47 (1), 12-18.
- Mohd Su'ud M, PIA Loonis & AS Idris (2007) Towards automatic recognition and grading of *Ganoderma* infection pattern using fuzzy systems. *Int J Biomed Sci* 2, 1306-1216.
- Morandi S, M Brasca, R Lodi, L Brusetti, C Andrighetto & A Lombardi (2010). Biochemical profiles, restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and multilocus variable number tandem repeat analysis (MLVA) for typing *Staphylococcus aureus* isolated from dairy products. *Res Vet Sci* 88 (3), 427-435.
- Nurhaimi-Haris, S Woelan & A Darussamin (1998). RAPD analysis of genetic variability in plant rubber (*Hevea brasiliensis* Muell Arg.) clones. *Menara Perkebunan* 66 (1), 9-19.
- Orozco-Castillo, KJ Chalmers, R Waugh & W Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genet* 87, 332-339.
- Riyanto (2009). Penjarangan selektif dalam upaya peningkatan riap diameter hutan rakyat sengon. *Tekno Hutan Tanaman* 2 (3), 115-120.
- Rumiyati, Sismindari & SM Widyastuti (2002). Toksisitas ekstrak air tubuh buah *Ganoderma* spp. terhadap larva udang *Artemia selina* Leach. *Majalah Farmasi Indonesia*, 13 (1), 44-49.
- Sant'Anna JR, CT Miyamoto, LJ Rosada, CCS Franco, EN Kaneshima, & MAA Castro-Prado (2010). Genetic relatedness of Brazillian *Colletotrichum truncatum* isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. *Biol Res* 43, 51-62.
- Suryanto D, S Andriani & K Nurtjahja (2005). Keragaman genetik *Ganoderma* spp. dari beberapa tempat di Sumatra Utara. *J Ilmiah Pertanian Kultura* 40 (2), 70-76.
- Tarinhezad A, A Sabouri & SA Mohammadi (2005). Statistical software NTSYS PC application in plant breeding. In: *The 7th Conference of Iran Statistics*. Allame Tobatabaci University, September 2005. Teheran, 10 p.
- Toruan-Mathius N, SII Bangun & M Bintang (2001). Analisis abnormalitas tanaman kelapa sawit (*Elaeis guineensis* Jacq) hasil kultur jaringan dengan teknik *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). *Menara Perkebunan* 69(2), 58-70.
- Widyastuti SM (2007). *Peran Trichoderma* spp. dalam *Revitalisasi Kehutanan di Indonesia*. Yogyakarta, Gadjah Mada University Press, 255p.
- Yap IV & RJ Nelson (1996). *WinBoot: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine The Confidence Limits of UPGMA-based dendograms*. Manila, International Rice Research Institute.
- Zakaria L, NSB Saleh & M Zakaria (2009). Molecular analysis of *Ganoderma* species from different host in Peninsula Malaysia. *J Biol Sci* 1, 12-20.