

Sekuen *Internal Transcribed Spacer* (ITS) DNA ribosomal *Oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembanding

*Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA
Oncobasidium theobromae and other related fungi as comparison*

Agustin Sri MULYATNI¹⁾, Achmadi PRIYATMOJO²⁾ & Agus PURWANTARA¹⁾

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

²⁾ Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

Diterima tgl 15 Oktober 2010/Disetujui tgl 25 Januari 2011

Abstract

The objective of this research was to sequence ITS region from ribosomal DNA of *Oncobasidium theobromae*, and to compare the sequences to the isolates from Vietnam and Malaysia, and also to identify other related fungi species based on the homology of the ITS region. *O. theobromae* was isolated from three cocoa plantations in Indonesia that were Jember, Kendari, and Makasar. DNA was isolated from the fungal mycelia, and then amplified using ITS-4 and ITS-5 primers, resulted in DNA fragments of 600 bp and 700 bp for the isolate from Jember, 600 bp for the isolate from Kendari, and 700 bp for the isolate from Makasar. All of the fragments were successfully sequenced, except for 600 bp fragment of the isolate from Jember. The homology analysis using BLAST was confirmed that ITS sequences *O. theobromae* from Jember was homolog with *Rhizoctonia sp.* and *Ceratobasidium sp.*, whereas isolate from Kendari was homolog with *Botryosphaeria sp.* and isolate from Makasar was homolog with *Mycorrhizal basidiomycetes*. The sequences were then compared to the sequences of *O. theobromae* from Vietnam and Malaysia. Phylogenetic analyses using Clustal W program indicated that *O. theobromae* from Indonesia which is represented by isolates from Jember showed higher degree of similarity to isolates from Vietnam. On the contrary, isolates from Indonesia showed lower degree of similarity to isolates from Malaysia.

[Keywords: *Oncobasidium theobromae*, homology analysis, ITS, rDNA, VSD]

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sekuen daerah ITS dari DNA ribosomal jamur *Oncobasidium theobromae*, dan membandingkannya dengan sekuen jamur *O. theobromae* yang berasal dari Malaysia dan Vietnam, serta untuk mengidentifikasi spesies lain yang merupakan kerabat dekat *O. theobromae* dengan berdasarkan kemiripan sekuen ITSnya. Isolat jamur *O. theobromae* diisolasi dari tiga lokasi perkebunan kakao di Indonesia yaitu Jember, Kendari dan Makasar. DNA diisolasi dari miselium jamur. Amplifikasi daerah ITS menggunakan primer ITS-4 dan ITS-5 menghasilkan fragmen 600 bp dan 700 bp untuk isolat Jember, 600 bp untuk isolat Kendari dan 700 bp untuk isolat

Makasar. Semua fragmen berhasil disekuensing kecuali fragmen Jember 600 bp. Analisis homologi menggunakan BLAST menunjukkan fragmen isolat Jember 700 bp memiliki homologi tertinggi dengan *Rhizoctonia sp.* dan *Ceratobasidium sp.*, isolat Kendari 600 bp homolog dengan *Botryosphaeria sp.*, dan isolat Makasar homolog dengan *Mycorrhizal basidiomycetes*. Hasil sekuen tersebut kemudian dibandingkan dengan sekuen daerah ITS *O. theobromae* dari Malaysia dan Vietnam untuk mengetahui hubungan kekerabatannya. Analisis kekerabatan menggunakan program Clustal W menunjukkan *O. theobromae* dari Indonesia yang diwakili oleh isolat Jember berkerabat dekat dengan isolat Vietnam, akan tetapi tidak dengan isolat Malaysia.

[Kata kunci: *Oncobasidium theobromae*, analisis homologi, ITS, rDNA, VSD]

Pendahuluan

Penyakit *vascularstreak dieback* (VSD) merupakan penyakit penting pada kakao yang disebabkan oleh jamur *Oncobasidium theobromae* Talbot dan Keane. Patogen menginfeksi tanaman melalui daun muda, kemudian tumbuh menyerang ranting dan cabang sehingga menyebabkan mati pucuk (*dieback*). Serangan pada tanaman di pembibitan atau tanaman muda dapat mematikan tanaman, sedangkan pada tanaman dewasa yang sudah menghasilkan menyebabkan tanaman merana, produksi turun dan mati (Guest & Keane, 2007). Kehilangan produksi yang disebabkan oleh VSD di Asia mencapai 30.000 ton (Anonim, 2006). Di Indonesia serangan VSD dapat menurunkan produktivitas hingga 40 % dari 1.100 kg menjadi 660 kg/ha/tahun. Hal ini mengakibatkan kehilangan produksi sekitar 198.000 ton/tahun atau setara dengan 3,96 triliun/tahun (Anonim, 2010).

Jamur *O. theobromae* dapat diisolasi dari daun atau ranting tanaman sakit, tetapi sulit untuk dibiakkan dalam bentuk biakan murni yang menghasilkan spora di laboratorium. Jamur akan berhenti tumbuh setelah satu atau dua kali subkultur sehingga inokulasi buatan di laboratorium atau rumah kaca tidak dapat dilakukan untuk menguji patogenitas di antara isolat dan resistensi tanaman kakao (Halimah & Sukamto, 2006).

Uji resistensi selama ini tergantung pada infeksi alami di lapangan. Hingga saat ini belum diketahui variasi dalam patogenisitas di antara isolat dari berbagai daerah atau negara, karena studi ke arah itu masih terkendala oleh kesulitan membiakkan patogen di laboratorium (Keane, 2000). Pendekatan yang paling mudah yaitu dengan melakukan analisis pada tingkat DNA.

DNA ribosomal (rDNA) adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom. Pada eukariot deret rDNA terletak pada nukleus/inti dan mitokondria. Daerah rDNA dipisahkan antara satu dengan yang lainnya oleh suatu pembatas yang disebut *spacer*. Subunit rDNA baik yang besar maupun yang kecil dipisahkan oleh ETS (*external transcribed spacer*) dan IGS (*intergenic spacer*). Kedua pembatas tersebut kadang-kadang disebut NTS (*nontranscribed spacer*). Jamur termasuk organisme eukariotik, pada rDNA jamur terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S dan 28S yang di antaranya terdapat daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005).

ITS adalah suatu urutan RNA dari proses transkripsi utama yang berada antar prekursor ribosomal subunit dan dihilangkan pada proses *splicing* ketika RNA *precursor* tanda molekul yang struktural diproses ke dalam suatu ribosom. Organisme eukaryotik mempunyai dua daerah ITS; ITS-1 terletak di antara 18S gen dan 5.8S gen, dan ITS-2 terletak di antara 5.8S dan 28S gen. Ketiga gen ribosom tersebut mempunyai tingkat konservasi yang sangat tinggi (Gomes *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005). Daerah ITS biasanya mengalami perubahan atau mutasi sehingga dapat berbeda atau bervariasi di antara spesies. Sekuen rDNA subunit kecil 18S berkembang relatif lambat dan digunakan untuk studi hubungan kekerabatan pada tingkat spesies suatu organisme sedangkan daerah ITS dan IGS pada unit pengulangan rRNA berkembang lebih cepat dan memungkinkan terjadinya variasi di antara spesies dan populasi (Jamil, 2005). Urbez-Torres *et al.* (2006) menganalisis daerah ITS *Botryosphaeria* spp. penyebab penyakit kanker pada anggur di California. Hasil analisisnya menunjukkan isolat *Botryosphaeria* spp. tersebut berkerabat dekat dengan isolat yang berasal dari Australia, Perancis dan Portugis. Oleh karena itu studi untuk mengetahui variasi genetik di tingkat DNA perlu dilakukan. Tujuan dari penelitian ini adalah membandingkan sekuen ITS rDNA *O. theobromae* yang berasal dari Indonesia dengan negara lain. Isolat *O. theobromae* dari Indonesia berasal dari Jember sedangkan isolat *O. theobromae* luar negeri berasal dari Malaysia dan Vietnam.

Bahan dan Metode

Isolasi dan pembiakan jamur

Jamur *O. theobromae* diisolasi dari ranting tanaman kakao yang menunjukkan gejala VSD. Sampel berasal dari sentra produksi utama kakao yaitu Jember (Jawa Timur), Kendari (Sulawesi Tenggara) dan Makassar (Sulawesi Selatan). Isolasi dilakukan dengan cara ranting dipotong 10 cm, dikupas kulit luarnya kemudian didesinfeksi dengan cara direndam menggunakan 1% Na-hipoklorit selama dua menit. Setelah dicuci dengan air steril dua kali masing-masing satu menit, ranting dipotong dengan ukuran panjang 1-3 cm dengan gunting steril, kemudian ditiriskan di atas kertas saring steril dan ditumbuhkan di atas medium *water agar*. Miselia jamur yang tumbuh dipisahkan dari agar, kemudian digunakan untuk bahan ekstraksi DNA.

Ekstraksi DNA genomik *O. theobromae* dan PCR

Ekstraksi DNA genomik dari *O. theobromae* dilakukan menggunakan metoda Castillo yang dimodifikasi dengan penambahan PVP dan β -merkaptotanol (Toruan-Mathius *et al.*, 1997). Amplifikasi potongan daerah ITS rDNA isolat sampel dilakukan dengan mesin PCR menggunakan pasangan primer umum ITS4/ITS5. Amplifikasi dilakukan pada campuran reaksi 25 μ L yang mengandung 17,5 μ L air steril, 2,5 μ L 10 kali bufer PCR +MgCl₂, 1 μ L dNTPs 10 mM, 1 μ L dari masing-masing primer (50 ng/ μ L), 0,5 μ L *Taq* polymerase (1,5 U) dan 1 μ L DNA (10-100 ng/ μ L) *O. theobromae*. Reaksi PCR menggunakan mesin PCR Personal Biometra dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi awal pada suhu 94°C selama lima menit, 35 siklus (94°C selama satu menit, 50°C selama satu menit, dan pada suhu 72°C selama satu menit 30 detik), dan ekstensi akhir pada suhu 72°C selama lima menit.

Elektroforesis

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dalam gel agarose 1% dalam larutan TBE 0.5X. Sebanyak 10 μ L DNA hasil PCR dicampur dengan 2 μ L *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumur gel elektroforesis. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan di atas UV transluminator dan didokumentasikan menggunakan GelDoc.

Purifikasi hasil PCR

DNA hasil PCR dipurifikasi menggunakan *Axygen PCR Purification Kit*. Fragmen DNA dalam gel dipotong menggunakan skalpel, kemudian dimasukkan dalam tabung Eppendorf 2 mL dan ditimbang. Bufer DE-A (100 mg sebanding dengan 100 μ L volume bufer) ditambahkan pada potongan agar di dalam tabung, kemudian diinkubasi pada suhu 75°C selama delapan menit dengan *divortex* setiap dua menit. Campuran kemudian ditambah 0,5 volume bufer DE-B dan dikocok sampai homogen. Berturut-turut dilakukan pemindahan larutan 800 μ L ke dalam tabung dan kolom baru kemudian disentrifus 11.000 rpm selama satu menit, setelah itu cairan dalam tabung penampung dibuang. Hal yang sama dilakukan pula pada larutan 500 μ L bufer W1 dan 700 μ L bufer W2 sampai larutan habis, penambahan bufer W2 dilakukan dua kali. Kolom dipindahkan ke tabung Eppendorf 1,5 mL kemudian dilakukan elusi DNA menggunakan *eluent* 20-30 μ L tepat di bagian tengah kolom, dan didiamkan satu menit. DNA murni diperoleh setelah kolom disentrifus 11.000 rpm selama satu menit. Hasil purifikasi diverifikasi pada gel agarosa.

Sekuensing dan analisis BLAST

Hasil PCR yang sudah dipurifikasi kemudian disekuensing menggunakan sekuensing otomatis mesin ABI 3130xl *Genetic Analyzer* di Lembaga Eijkman, Jakarta, menggunakan primer ITS4/ITS5. Hasilnya dianalisis dengan BLAST pada situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Hal ini bertujuan memastikan primer memotong tepat pada bagian ITS dan untuk mengidentifikasi spesies jamur lain yang tersimpan dalam database NCBI yang berkerabat dekat dengan *O. theobromae*.

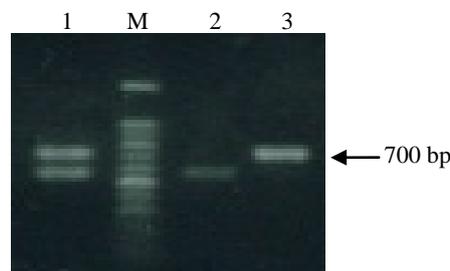
Pembandingan sekuen

Sekuen *O. theobromae* asal Indonesia (Jember, Makasar dan Kendari) kemudian dibandingkan dengan sekuen *O. theobromae* yang berasal dari Malaysia dan Vietnam. Data sekuen *O. theobromae* dari Malaysia dan Vietnam diperoleh dari Department of Botany, La Trobe University, Melbourne, Australia. Selain data tersebut sekuen juga akan dibandingkan dengan data sekuen jamur spesies lain yaitu *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Puccinia*, *Fusarium* dan *Stachybotrys* yang ada di GenBank ncbi. Pembandingan sekuen dilakukan menggunakan program Clustal W secara online di alamat <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>.

Hasil dan Pembahasan

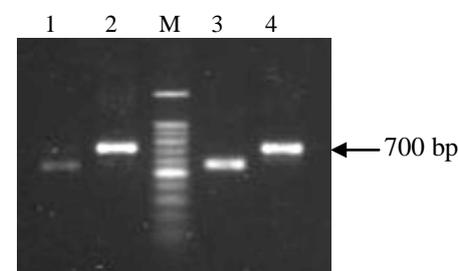
Amplifikasi ITS *O. theobromae*

Amplifikasi daerah ITS menggunakan primer umum yaitu ITS4/ITS5 menghasilkan fragmen sebesar 600 bp dan 700 bp untuk isolat Jember, 700 bp untuk isolat Makasar, dan 600 bp untuk isolat Kendari (Gambar 1). Variasi ukuran fragmen hasil amplifikasi 600 bp dan 700 bp disebabkan oleh adanya variasi panjang daerah ITS masing-masing rDNAnya. Hal ini disebabkan daerah ITS sebagai daerah yang tingkat konservasinya rendah sedangkan daerah subunit kecil 18S, 5.8S, subunit besar 28S diketahui sebagai daerah yang sangat konservatif. Selain itu variasi yang sangat signifikan dapat terjadi karena adanya delesi, insersi, atau substitusi antara spesies dalam ITS (Peay *et.al*, 2008). Keempat produk PCR hasil amplifikasi menggunakan primer ITS4/ITS5 yang telah dipurifikasi disajikan pada Gambar 2.



Gambar 1. Profil elektroforesis hasil PCR menggunakan pasangan primer ITS4 dan ITS5. (lajur 1: Jember; 2: Kendari; 3: Makasar; M; Marker 100 bp)

Figure 1. Electrophoretic profile of PCR product using primer pair of ITS4/ITS5. (lane 1: Jember; 2: Kendari; 3: Makasar; M: marker).



Gambar 2. Pita-pita hasil purifikasi. (Lajur 1: Jember 600 bp; 2: Jember 700 bp; 3: Kendari 600 bp; 4: Makasar 700 bp; M: Marker 100 bp)

Figure 2. Fragments as results of purification. (Lane 1: Jember 600 bp; 2: Jember 700 bp; 3: Kendari 600 bp; 4: Makasar 700 bp; M: Marker 100 bp)

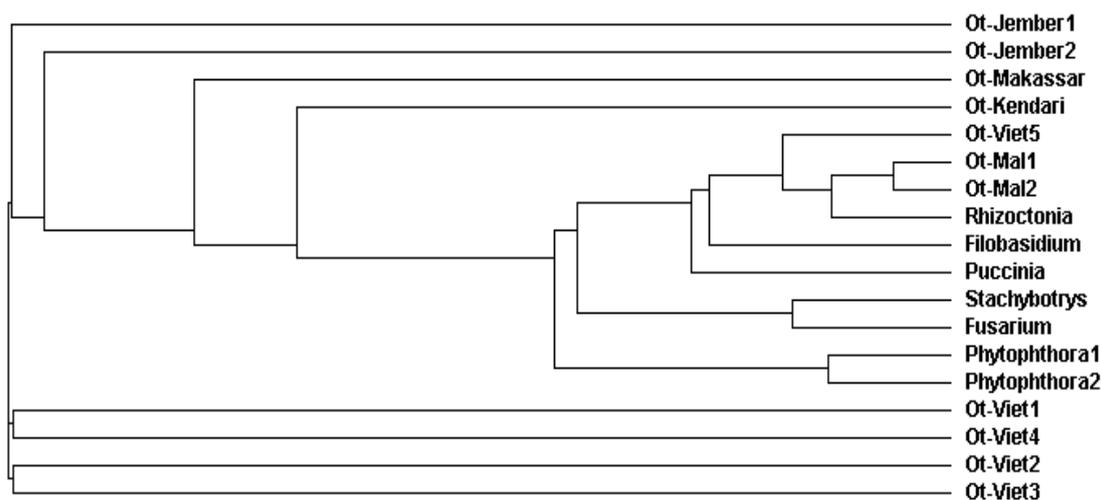
ITS dari *O. theobromae*

Hasil sekuensing daerah ITS kemudian dianalisis BLAST untuk memastikan bahwa primer memotong tepat pada daerah ITS. Hasil BLAST menunjukkan semua gen mempunyai kesamaan dengan daerah ITS spesies jamur lain. Hal ini menunjukkan bahwa PCR berhasil mengamplifikasi daerah ITS. Namun terdapat perbedaan pada hasil BLAST antara ketiga isolat tersebut. Isolat Jember mempunyai tingkat homologi paling tinggi dengan ITS *Rhizoctonia* sp. Isolat Kendari mempunyai tingkat homologi paling tinggi dengan ITS *Botryosphaeria* sp, sedangkan isolat Makassar mempunyai tingkat homologi paling tinggi dengan *Mycorrhizal basidiomycetes*. Hasil ini menunjukkan DNA jamur yang didapatkan dari Jember merupakan DNA *O. theobromae* karena hasil BLAST daerah ITS *O.theobromae* yang berasal dari Malaysia dan Vietnam juga mempunyai tingkat homologi tertinggi dengan *Rhizoctonia* sp. *O. theobromae* dan *Rhizoctonia* sp. yang termasuk dalam famili *Ceratobasidiaceae*. Sedangkan *O. theobromae* asal Kendari dan Makassar bukan *O. theobromae* melainkan jamur endofit lain yang berasosiasi dengan jaringan tanaman terserang VSD.

Pembandingan sekuen

Hasil sekuen ketiga isolat *O. theobromae* kemudian dibandingkan dan dianalisis kekerabatannya

dengan data sekuen *O. theobromae* asal Malaysia, dan Vietnam serta dengan spesies jamur lain dari database NCBI yaitu *Puccinia psidii* (EF599768), *Filobasidium capsuligenum* (EF532832), *Fusarium* sp. (EF611096), *Stachybotrys elegans* (DQ369856), *Phytophthora1* (DQ286726), *Phytophthora2* (AY594197). Hasil perbandingan dan analisis kekerabatan menggunakan pohon filogenetik dapat dilihat pada Gambar 3. Hasil penjejajaran sekuen gen ITS menggunakan program Clustal W menunjukkan tingkat kekerabatan antara 1%-98%. Semakin tinggi nilai presentase maka kekerabatannya semakin dekat. Tingkat kekerabatan paling tinggi adalah Ot-Viet2 dan Ot-Viet3 yaitu 98%. Kemudian Ot-Jember1 dengan Ot-Viet2, Ot-Jember1 dengan Ot-Viet3, Ot-Viet2 dengan Ot-Viet4, Ot-Viet3 dengan Ot-Viet4 sebesar 97 %. Isolat Ot-Jember2 yang merupakan hasil isolasi dari sampel Jember sangat dekat dengan Ot-Viet dengan tingkat similaritas 92 %. Hal tersebut dapat digunakan sebagai dasar untuk mendesain primer spesifik untuk mendeteksi jamur patogen yang menginfeksi jaringan tanaman secara alami (Utomo & Tambajong, 2003). Primer spesifik seperti ini sangat bermanfaat untuk mendeteksi *O. theobromae* pada jaringan kakao atau jaringan tanaman lain yang dapat menjadi inang alternatif. Hal ini penting dilakukan mengingat tanaman inang alternatif *O. theobromae* belum pernah dilaporkan (Keane, 2000; Guest & Keane, 2007).



Gambar 3. Dendrogram kekerabatan jamur *Oncobasidium theobromae* asal Indonesia, Malaysia, Vietnam dan spesies jamur lain berdasarkan sekuen ITS.

Figure 3. Dendrogram of *Oncobasidium theobromae* from Indonesia, Malaysia, Vietnam compared with other species based on ITS sequences.

Kesimpulan

Primer ITS4 dan ITS5 dapat mengamplifikasi daerah ITS jamur *O. theobromae*. *O. theobromae* dari Jember homolog dengan *Rhizoctonia*, *O. theobromae* dari Kendari homolog dengan *Botryosphaeria sp*, dan *O. theobromae* dari Makasar homolog dengan *Mycorrhizal basidiomycetes*. *O. theobromae* yang berasal dari Indonesia yang diwakili isolat Jember berkerabat dekat dengan *O. theobromae* yang berasal dari Vietnam.

Daftar Pustaka

- Anonim (2006). *The World's Cocoa Problems*. Taken from: http://www.dropdata.org/cocoa/cocoa_prob.htm. [24 Juli 2006].
- Anonim (2010). Lebih fokus dengan gernas kakao. *Warta Penelitian dan Pengembangan Tanaman* 32(2), 1-12.
- Guest D & P Keane (2007). Vascular-streak dieback: A new encounter disease of cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia caused by the obligate basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. *Phytopathol* 97, 1654-1657.
- Gomes EA, MC Kasaya, EG deBarros, AC Borgs & EF Araujo (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genet Mol Biol* 25(4), 477-483
- Halimah D & S Sukamto (2006). Sejarah dan perkembangan penyakit vascular streak dieback (VSD) di Indonesia. *Warta Pusat Penelitian Kopi dan Kakao* 22(3), 107-119.
- Jamil I (2005). Analisis sekuen daerah its DNA ribosom (rDNA) dan desain primer untuk mendeteksi *Phytophthora palmivora* Butl pada kakao. Bogor, Institut Pertanian Bogor. *Tesis*.
- Keane PJ (2000). Biology control and methods for study of vascular streak dieback. In: *Selection for Resistance and Quality in Cocoa in Indonesia*. Project Handbook ACIAR 2001-2004. p. 60-67.
- O'Brien HE, JLParrrent, JA Jackson, JM Moncalvo & R Vilgalys (2005). Fungal communities' analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Environ. Microbiol* 71, 5544-5550.
- Peay KG, PG Kennedy PG & TD Bruns (2008). Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58, 799-810.
- Toruan-Mathius N, T Hutabarat & D Suhendi (1997). The use of RAPD to evaluate genetic variability of hybrid parent in *Theobromae cacao* L. plants. *Menara Perkebunan* 65 (2), 53-63.
- Urbez-Torres JR, GM Leavitt, TM Voegel & WD Gubler (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. associated with grapevine cankers in California. *Plant Diseases* 90, 1490-1503.
- Utomo C & D Tambajong (2003). Desain primer spesifik untuk deteksi ganoderma penyebab penyakit busuk pangkal batang pada tanaman kelapa sawit. *J Penelitian Kelapa Sawit* 11, 23-37.