

Analisis Keragaman Genetik Kelompok *Pleurotus* dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP)*

Analysis of Genetic Variability of Pleurotus group with Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP) Technique

Elis Nina Herliyana¹, Reny Meisetyani¹ dan Iskandar Z. Siregar¹

¹Departemen Silviculture, Fakultas Kehutanan IPB

ABSTRACT

The research was done in Forest Pathology Laboratory and Silviculture Laboratory, Forest Faculty, Bogor Agriculture University. The observed is to know the genetic variability of *Pleurotus* group and compare it with the morphological variability also applications of PCR-RFLP in *Pleurotus* group.

PCR-RFLP using the primers ITS1 and ITS4 can be applied to the *Pleurotus* group. The use of AluI restriction enzymes can give results ribbon cutting DNA from PCR-RFLP results. The result of genetic variability by PCR-RFLP showed differenced compare to genus and morphological variability.

Keyword: PCR-RFLP, *Pleurotus* group

PENDAHULUAN

Salah satu jenis hayati yang berasal dari hutan tropis Indonesia yang baru terungkap beberapa potensi dan manfaatnya adalah jamur. Jamur banyak ditemukan tumbuh liar baik itu di lantai hutan maupun menempel pada kayu.

Diantara jamur yang tumbuh di hutan tersebut ada yang dapat dimakan (sebagai bahan makanan dan obat) maupun yang tidak dapat dimakan (beracun). Menurut Chang dan Miles (1989, 1997) jamur telah dikonsumsi sebagai bahan makanan sejak zaman dahulu. Dari sekian banyaknya jenis jamur yang dapat dimakan, salah satunya adalah kelompok *Pleurotus* atau yang disebut dengan jamur tiram. Disebut tiram karena bentuk tudungnya menyerupai cangkang tiram. Kelompok *Pleurotus* termasuk family Pleurotaceae. Kelompok *Pleurotus* ini hanya mempunyai dua genus yaitu *Pleurotus* dan *Hohenbuehelia* (Herliyana et al. 2008).

Perbedaan bentuk morfologi dan warna merupakan penciri dari masing-masing spesies. Bentuk tudung, diameter tangkai dan panjang tangkai tubuh buah serta warna tubuh buah merupakan parameter untuk pengukuran morfologinya. Walaupun secara morfologi dapat diketahui dan dibedakan jenisnya namun secara genetik jenis jamur ini belum diketahui tingkat keragamannya.

Penelitian ini berusaha untuk mengetahui tingkat keragaman genetik isolat jamur tiram dengan melakukan analisis DNA menggunakan metode *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP)*. Dimana PCR-RFLP merupakan salah satu teknik penanda DNA yang kini biasa digunakan selain RAPD dan AFLP.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui keragaman morfologi dan genetik pada kelompok *Pleurotus*. Untuk membandingkan antara keragaman morfologi dan keragaman genetik serta aplikasi metode PCR-RFLP pada kelompok *Pleurotus*.

BAHAN DAN METODE

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beberapa isolat jamur kelompok *Pleurotus* yang diperoleh dari kultur koleksi Laboratorium Penyakit Hutan, Fakultas Kehutanan IPB. Isolat-isolat yang digunakan adalah : 12 isolat yang terdiri atas: Sp 3 (*Hohenbuehelia petaloides* EB4/ warna abu-abu cokelat), Sp 4 (*H. petaloides* EB7/ abu-abu cokelat), Sp 5 (*H. petaloides* EB6/ abu-abu cokelat), Sp 6 (*Pleurotus djamor* EB9/ merah), Sp 16 (*Pleurotus ostreatus* JP / putih), Sp 17 (*P. ostreatus* JT/ putih), Sp 18 (*Pleurotus abalonus* Abalon/cokelat abu-abu), Sp 19 (*P. ostreatus* JB/putih), Sp 21 (hasil mating *P. ostreatus* MA 35+ MA 36/ abu-abu), Sp 23 (*P. ostreatus* MA 35 B monokarion/ abu-abu), Sp 24 (*Pleurotus flabelatus* TM/ merah), dan Sp 25 (*Pleurotus cornicopy*TC/cokelat).

Tabel 1. Bahan-bahan Ekstraksi DNA, PCR-RFLP dan Restriksi

No	Bahan-bahan		
	Ekstraksi DNA	PCR-RFLP	Restriksi
1.	Tris-HCL 1 M	H ₂ O	H ₂ O
2.	EDTA 0.5 M	Hot Star Mix	Buffer RE
3.	NaCl 5 M	Primer ITS 1	DNA
4.	CTAB 10%	Primer ITS 4	
5.	Merkap-etanol		Enzim restriksi
6.	PVP 1%	DNA	ALUI
7.	Akuades		HindIII

Tabel 2. Alat-alat ekstraksi DNA, PCR-RFLP dan Restriksi

No.	Kegiatan	Alat yang digunakan
1.	Ekstraksi DNA	pestel, mortal, vortex, desikator, freezer, water bath, pH meter dan tube 2 ml
2.	PCR-RFLP	Microtube 0.2 ml dan mesin PCR
3.	Restriksi	Microtube 0.2 ml dan water bath
4.	Umum	sarung tangan, pipet, pipet mikro, tips sentrifugasi, koleksi tabung, cetakan gel, bak elektroforasi, microwave, power supply, gelas piala, gelas ukur, timbangan analitik, pengaduk magnet, ultraviolet transimulator dan kamera digital

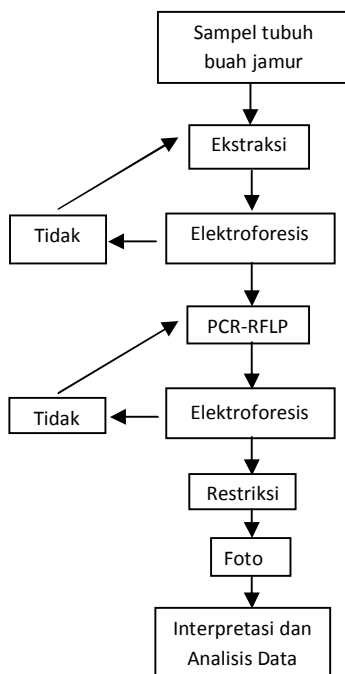
Metode Penelitian

Dalam penelitian ini dilakukan dalam dua tahap yaitu Tahap pertama adalah kultivasi jamur tiram dan Tahap kedua adalah analisis DNA dengan menggunakan PCR-RFLP dan restriksi pemotongan pita DNA dengan enzim restriksi *ALUI* dan *HindIII*. Kegiatan Tahap pertama penelitian meliputi:

1. Pembuatan media tumbuh jamur.
2. Sterilisasi media tumbuh jamur.
3. Inokulasi media.
4. Inkubasi media.
5. Penumbuhan tubuh buah jamur.
6. Pemeliharaan.

Pengamatan dilakukan terhadap sifat-sifat morfologi tubuh buah yang tumbuh, dengan pengambilan data terhadap diameter tudung, tinggi tangkai, diameter tangkai dan warna tubuh buah. Sampel diambil dari sebagian tubuh buah jamur yang tumbuh. Kegiatan Tahap kedua meliputi:

Prosedur penelitian nalisis genetik kelompok *Pleurotus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan prosedur teknik PCR-RFLP

Analisis Data

Hasil restriksi yang telah didapat melalui foto dari hasil elektroforesis kemudian dilakukan skoring pola pita yang muncul. Skoring dilakukan pada hasil perpotongan pita DNA, jika terjadi perpotongan maka mendapat nilai 1 dan jika tidak ada perpotongan diberi nilai 0. Hasil perhitungan kemudian dianalisis untuk mengetahui frekuensi dan keragaman dalam jenis dan antar populasi *Pleurotus* spp. dengan menggunakan software POPGENE Versi 1.3.1. Pengelompokan kekerabatan berdasarkan metode UPGMA (*Unweigthed Pair Group with Arithmetic Average*) (Nei 1973 dalam Yunanto 2006) dengan software NTSYS Ver 2.0 (Rohlf, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Keragaman Morfologi Kelompok *Pleurotus*

Keragaman morfologi kelompok *Pleurotus* dimulai dengan pengamatan terhadap pertumbuhan tubuh buahnya . Pengamatan dilakukan pada warna tubuh buah, diameter tudung tubuh buah dan panjang tangkai tubuh buah. Pengamatan ini dikhususkan untuk jamur tiram yang pengekstraksian DNA-nya dilakukan di Bogor, yaitu pada subjenis *P. ostreatus* JT, *Pleurotus ostreatus* JP, *H. petaloides* EB6 dan *P. ostreatus* JB.

Keempat jamur tiram ini merupakan hasil dari penumbuhan selama kurang lebih empat bulan, dengan waktu inokulasi pada bulan September yang ditumbuhkan pada media campuran serbuk gergaji, kapur, dedak dan gips atau dinamakan *baglog* dengan ukuran 0.5 kg. Pada waktu penumbuhan suhu dan kelembaban lingkungan disesuaikan dengan kebutuhan tumbuh jamur tiram.

Pengamatan morfologi luar pada *P. ostreatus* JT, *Pleurotus ostreatus* JP, dan *P. ostreatus* JB mempunyai tubuh buah berwarna putih. Ketiga subjenis tersebut mempunyai bentuk pinggiran tudung tubuh buah yang bergelombang, memiliki tangkai berkisar antara 1.6 – 2.5 cm.

Tabel 6. Pengelompokan *Pleurotus* berdasarkan warna tubuh buah

No.	Warna Tubuh buah	Kode Isolat	Nama Isolat
1.	Putih	<i>Pleurotus</i> sp16 <i>Pleurotus</i> sp17 <i>Pleurotus</i> sp19	<i>Pleurotus ostreatus</i> JP <i>P. ostreatus</i> JT <i>P. ostreatus</i> JB
2.	Abu	<i>Pleurotus</i> sp21 <i>Pleurotus</i> sp23	hasil mating <i>P. ostreatus</i> MA 35+ MA 36 <i>P. ostreatus</i> MA 35 B monokarion
3.	Coklat	<i>Pleurotus</i> sp25	<i>Pleurotus cornicopy</i> TC
4.	Merah	<i>Pleurotus</i> sp6 <i>Pleurotus</i> sp24	<i>Pleurotus djamor</i> EB9 <i>Pleurotus flabelatus</i> TM
5	Abu-abu coklat	<i>Pleurotus</i> sp 3 <i>Pleurotus</i> sp 4 <i>Pleurotus</i> sp 5 <i>Pleurotus</i> sp 18	<i>H. petaloides</i> EB4 <i>H. petaloides</i> EB7 <i>H. petaloides</i> EB6 <i>Pleurotus abalonus</i> Abalon

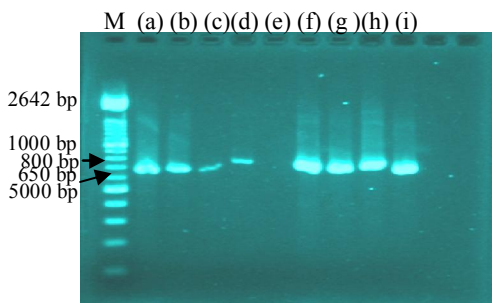
Analisis Keragaman Genetik Kelompok *Pleurotus*

Pengamatan dilakukan setelah tubuh buah muncul dari media tumbuh atau *baglog*, kemudian sebagian tubuh buah dan tangkai diambil dan disimpan dalam kantong plastik berisi silika gel dan disimpan dalam *freezer*. Tubuh buah dan tangkai tersebutlah yang digunakan dalam ekstraksi DNA. Kegiatan yang pertama dilakukan untuk melakukan analisis keanekaragaman genetik setelah pengambilan sampel adalah ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA menggunakan metode CTAB (*Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) yang telah dimodifikasi (Murray and Thompson 1980).

Hasil ekstraksi diperlukan untuk mengetahui kualitas DNA, sehingga dapat ditentukan pengenceran yang diperlukan untuk proses selanjutnya yaitu PCR-RFLP. Pengenceran DNA yaitu hasil ekstraksi DNA yang didapatkan dicampur aquabides. Perbandingan antara DNA dan aquabides disesuaikan dengan besarnya pengenceran.

Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphisms (PCR-RFLP)

Kegiatan selanjutnya adalah PCR-RFLP dengan menggunakan pasangan primer *universal* untuk jamur yaitu ITS1 dan ITS4. Wilayah ribosomal DNA (rDNA) *Internal Transcribed Spacer* (ITS) mempunyai peranan penting dalam investigasi sistematik molekular untuk angiosperma pada tingkat intergenik dan interspesifik. ITS ini dapat digunakan untuk membedakan antara tanaman berbunga, bryophytes, dan beberapa ordo dari alga dan fungi, termasuk fungi yang patogenik dan non patogenik (Jobes dan Thien, 1997).

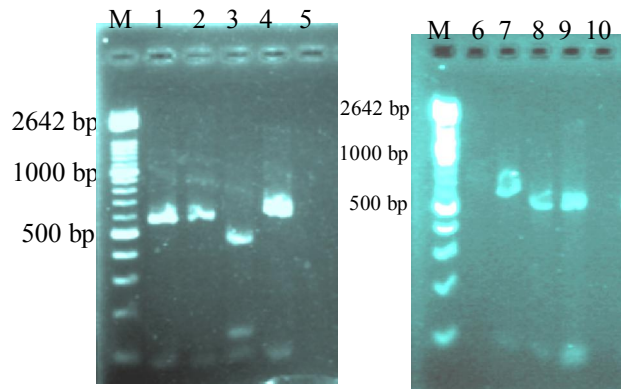


Gambar 2. Hasil elektroforesis PCR-RFLP pada isolat *Pleurotus* spp. : (a) *Pleurotus djamora* EB9; (b) *P. ostreatus* JT; (c) *Pleurotus ostreatus* JP; (d) *H. petaloides* EB4; (e) *H. petaloides* EB7 (f) *P. ostreatus* JB; (g) *Pleurotus abalonus* Abalon; (h) *H. petaloides* EB6.

Pada PCR-RFLP tersebut juga diikutsertakan kontrol negatif, yaitu produk PCR tanpa DNA. Dalam penelitian lain yang dilakukan Mirhendi *et al.* (2006) pasangan universal spesifik fungi (ITS1 dan ITS4) dapat dengan sukses untuk mengamplifikasi daerah ITS untuk semua ragi yang diuji, menghasilkan *singel* produk PCR-RFLP secara tepat pada 510-870 bp. Hasil amplifikasi PCR-RFLP kedelapan isolat kelompok *Pleurotus* terletak antara 650 bp-800 bp.

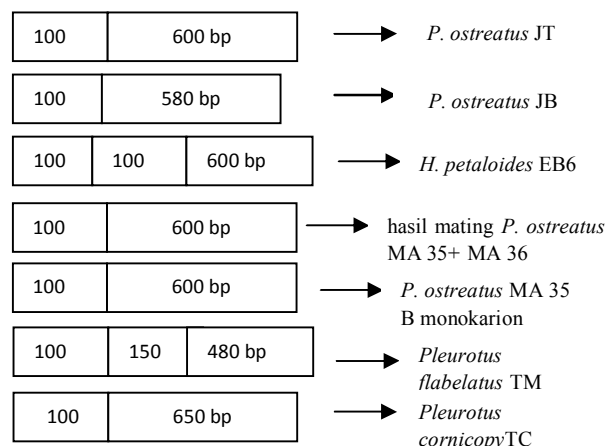
Restriksi

Enzim restriksi (atau endonuklease restriksi) memotong DNA pada daerah yang spesifik (Brown, 1991). *ALUI* dengan daerah sekuen yaitu 5'AGCT dan 3'TCGA yang memotong pada G dan C. *HindIII* dengan daerah sekuen 5'AAGCTT dan 3'TTCGAA memotong pada A dan A. Enzim endonuklease restriksi dimanfaatkan di dalam analisis molekular struktur khromosom dan gen (pemetaan DNA), analisis proses degenerasi sel yang dikaitkan dengan perubahan sisi restriksi khusus dan analisa keterkaitan filogenetik dengan perbandingan sisi restriksi khusus pada gene-gen penting seperti haemoglobin (Suhartono, 1989). Hasil elektroforesis dengan enzim restriksi *ALUI* menunjukkan adanya perpotongan yaitu dari hasil produk PCR sebesar 700 bp menjadi 600 bp.



Gambar 3. Hasil elektroforesis restriksi Kelompok *Pleurotus* dengan enzim restriksi *ALUI*: 1. *P. ostreatus* JT; 2. *Pleurotus ostreatus* JP; 3. *P. ostreatus* JB; 4. *H. petaloides* EB6; 5. Kontrol negatif; 6. hasil mating *P. ostreatus* MA 35+ MA 36; 7. *P. ostreatus* MA 35 B monokarion; 8. *Pleurotus flabelatus* TM; 9. *Pleurotus cornicopy*TC; 10. Kontrol negatif

H. petaloides EB6 mempunyai potongan pita DNA pada 90 bp, 100 bp dan 600 bp. Perpotongan pita 90 bp dan 100 bp pada *H. petaloides* EB6 terlihat menyatu, tetapi apabila lebih teliti sebenarnya ada dua pita perpotongan. Jumlah total perpotongan pada setiap pita DNA, mempunyai nilai *base pair* yang sama dengan hasil PCR-RFLP untuk tiap jenisnya.



Gambar 4. Pemotongan pita DNA dengan enzim restriksi *ALUI* pada Kelompok *Pleurotus*

Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menskoring pola perpotongan pita DNA. Apabila ada pita perpotongan maka diberi nilai 1 dan jika tidak ada diberi nilai 0. Dalam tabel 8 merupakan hasil skoring perpotongan pita DNA yang terjadi pada ketujuh sampel. Dalam Finkeldey (2005), variasi terjadi oleh ada tidaknya situs pengenalan (*recognition sites*) untuk enzim restriksi spesifik.

Tabel 8. Hasil skoring pemotongan dengan enzim estriksi *AluI*

Lokus	Individu <i>Pleurotus</i>						
	sp. 16	sp. 19	sp. 5	sp. 21	sp. 23	sp. 24	sp. 25
L-1	0	0	1	0	0	0	0
L-2	1	1	1	1	1	1	1
L-3	0	0	0	0	0	1	0
L-4	0	0	0	0	0	1	0
L-5	0	1	0	0	0	0	0
L-6	1	0	1	1	1	0	0
L-7	0	0	0	0	0	0	1

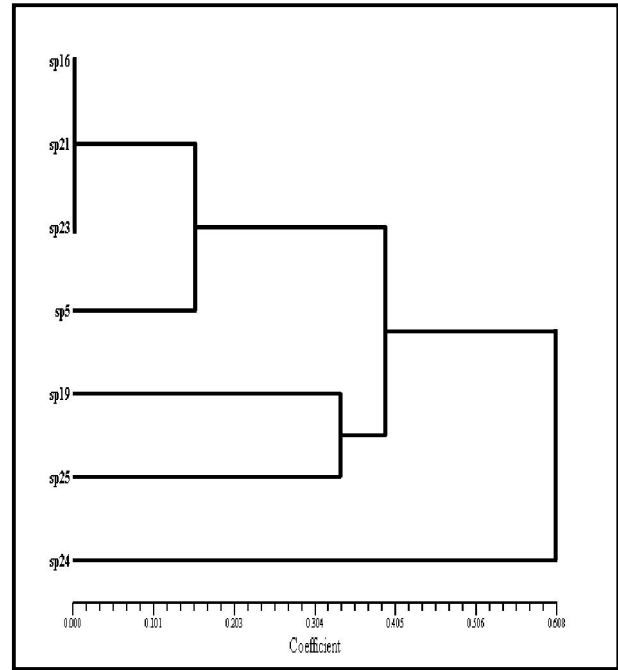
Dari hasil skoring maka terdapat 7 lokus yang menunjukkan pola perpotongan pita DNA. Hasil ini kemudian dimasukkan kedalam progam *Software* POPGEN 1.3.1 untuk diolah lebih lanjut guna mengetahui jarak genetik dan dendogram jarak genetik. Dalam tabel 9, menunjukkan angka-angka jarak genetik pada Kelompok *Pleurotus*.

Tabel 9. Jarak genetik antar jenis Kelompok *Pleurotus*

Jenis <i>Pleurotus</i>	sp. 16	sp. 19	sp. 5	sp. 21	sp. 23	sp. 24	sp. 25
sp. 16	****						
sp. 19	0.3365	****					
sp. 5	0.1542	0.5596	****				
sp. 21	0.0000	0.3365	0.1542	****			
sp. 23	0.0000	0.3365	0.1542	0.0000	****		
sp. 24	0.5596	0.5596	0.8473	0.5596	0.5596	****	
sp. 25	0.3365	0.3365	0.5596	0.3365	0.3365	0.5596	****

Dengan menggunakan dendogram jarak genetik, pengelompokan atau klaster antara Kelompok *Pleurotus* lebih terlihat jelas. Hasil dari analisis keragaman morfologi dan genetika ternyata berbeda. Jika secara morfologi jamur tersebut sama tetapi ternyata secara genetika berbeda.

Teknik PCR-RFLP dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4 memetakan DNA pada daerah khuHsus ribosom. Dalam Kimball (1998), ribosom merupakan struktur yang paling kecil yang tersuspensi di dalam sitoplasma. Ribosom merupakan situs dan pada ribosom itulah tempat berlangsungnya sintesis protein.



Gambar 5. Dendogram Kelompok *Pleurotus*

KESIMPULAN

Berdasarkan dari hasil penelitian yang telah dilakukan, memberikan beberapa kesimpulan. Keragaman morfologi pada kelompok *Pleurotus* dapat dilihat dari warna tubuh buah jamur tiram. Dari 8 isolat yang digunakan secara morfologi dapat dikelompokkan ke dalam jamur tiram putih (*P. ostreatus* JT, *Pleurotus ostreatus* JP dan *P. ostreatus* JB), berwarna abu (hasil mating *P. ostreatus* MA 35+ MA 36 dan *P. ostreatus* MA 35 B monokarion), berwarna merah (*Pleurotus flabelatus* TM) dan berwarna coklat (*Pleurotus cornicopy*TC) dan berwarna abu-abu coklat (*Hohenbuehelia petaloides* EB4, *H. petaloides* EB7, *H. petaloides* EB6, dan *Pleurotus abalonus* Abalon).

Jika dibandingkan antara keragaman morfologi dan genetika terdapat perbedaan. Pengelompokan jamur tiram secara genetik berdasarkan dendogram memberikan hasil bahwa hasil mating *P. ostreatus* MA 35+ MA 36, *P. ostreatus* MA 35 B monokarion dan *Pleurotus ostreatus* JP berada dalam satu klaster. Kemudian *H. petaloides* EB6 tergabung dalam klaster pertama. Klaster berikutnya *P. ostreatus* JB dan *Pleurotus flabelatus* TM, *Pleurotus cornicopy*TC tidak tergabung dalam keduanya.

PCR-RFLP dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4 dapat diaplikasikan pada jamur kelompok *Pleurotus*. Penggunaan enzim restriksi *ALUI* dapat memberikan hasil pemotongan pita DNA hasil PCR-RFLP.

DAFTAR PUSTAKA

- Bernard J. 1998. *Molecular Biotechnology, Principles and Application of Recombinant DNA*. University of Waterloo. Waterloo Ontario Canada.
- Brown TA. 1991. Pengantar Kloning Gen (Terjemahan oleh : Prof. Soemati Ahmad Muhammad dan Praseno). Yogyakarta: Yayasan Essentia Medica.
- Chang ST, Miles PG. 1989. *Genetics and Breeding of Edible Mushroom*. Hongkong: Gordon and Breach science Publisher. Unesco.
- Chang ST, Miles PG. 1997. *Mushroom Biology*. London: World Scientific Publishing.
- Finkeldey R. 2005. *Pengantar Genetika Hutan Tropis*. E. Jamhuri, I.Z. Siregar, U.J. Siregar dan A.W. Kertadikara, penerjemah. Göttingen : Institute of Forest Genetics and Forest Tree Breeding Georg-August-University-Göttingen. Terjemahan dari : *An Introduction to Tropical Forest Genetics*.
- Ferrer C, *et al.* 2001. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. Spain. <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/39/8/2873>. [15 Februari 2006].
- Jobs DV, Thien LB. 1997. A Conserved Motif in the 5.8S Ribosomal RNA (rRNA) Gene is a Useful Diagnostic Marker of Plant Internal Transcribe Spacer (ITS) Sequence. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:326-334.
- Tian MC, Shang YZ, Zhuang JY, Wang Q, Kakishima M. 2004. Morphological and molecular phylogenetic analysis of *Melampsora* species on popUlar in China. *Mycoscience* 45:56-66.
- Mirhendi H, Makimura K, Khoramizadeh M, Yamaguchi H. 2006. A One-Enzyme PCR-RFLP Assay for Identification of Six Medically Important *Candida* Species. *Jpn. J. Med. Mycol.* 47:225-229.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Bogor: Pustaka Wirausaha Muda dan USESE Foundation.
- Suhartono TM. 1989. *Enzim Dan Bioteknologi*. Bogor:Departemen Pendidikan dan Kebudayaan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.