

IDENTIFIKASI MOLEKULER DAN UJI PATOGENESITAS *Ganoderma* ASAL TANAMAN PINANG (*Areca catechu*) PADA TANAMAN KELAPA SAWIT (*Elaeis guineensis*)

Ribu Surbakti¹⁾, Condro Utomo²⁾, dan Agus Susanto

Abstrak Identifikasi dan karakterisasi 20 sampel *Ganoderma* asal 20 pohon tanaman pinang (*Areca catechu*) yang meliputi 10 isolat dari PTPN II, 6 dari PTPN IV, dan 4 dari PT SMART Indragiri Hilir Riau telah dilakukan. Diduga, isolat-isolat *Ganoderma* tersebut, sebagai sumber penyakit busuk pangkal batang (BPB) kelapa sawit. Identifikasi dilakukan dengan teknik molekuler dengan metode Moller dan diamplifikasi menggunakan primer ITS 1 - ITS 4, kemudian direstriksi dengan menggunakan enzim *Mlu* I yang spesifik untuk *Ganoderma* asal kelapa sawit. Hasil amplifikasi dari 20 DNA *Ganoderma* uji, hanya 8 sampel DNA terpotong oleh enzim *Mlu* I yang menghasilkan 2 fragmen dengan ukuran 513 bp dan 137 bp. Dari uji sekuensing hanya 5 sampel isolat *Ganoderma* yang terbaca yaitu 4 isolat pada daerah ITS 1 dan 1 isolat pada daerah ITS 4. Uji patogenesis semua isolat pada bibit kelapa sawit menunjukkan bahwa 8 isolat yang terpotong enzim *Mlu* I dapat menyebabkan penyakit busuk pangkal batang. Tetapi ada 2 isolat yang tidak terpotong oleh enzim *Mlu* I juga mampu menimbulkan penyakit busuk pangkal batang.

Kata Kunci: biomolekuler, patogenesis, *Ganoderma*, kelapa sawit, tanaman pinang.

Abstract Identification and characterization of the 20 samples of *Ganoderma* from 20 arecanut trees (*Areca*

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

¹⁾ Departemen Kimia FMIPA, Universitas Sumatera Utara
Jl. Bioteknologi No. 1 Kampus USU, Medan

²⁾ PT Smart Tbk

Agus Susanto (✉)
Pusat Penelitian Kelapa Sawit
Jl. Brigjen Katamsa 51, Medan, Indonesia.
Email : marihat_agus@yahoo.com

catechu) included 10 isolates of PTPN II, 6 isolates of PTPN IV, and 4 isolates of PT. SMART Indragiri Hilir. Riau had been conducted. It was suspected that the *Ganoderma* isolates were as inoculum source of basal stem rot disease of oil palm. Identification was carried out by molecular technique with Moller methods and then amplification using ITS 1 ITS 4 primers, and finally restriction using *Mlu* I enzyme which is specific to *Ganoderma* from oil palm. Amplification of 20 samples of *Ganoderma* DNA showed that only 8 DNA samples restricted by *Mlu* I which produced 2 DNA fragments with 513 bp and 137 bp length respectively. Only 5 samples could be obtained their sequence, namely 4 isolates in ITS 1 region and 1 isolate in ITS 4 region. Pathogenicity test using all isolates to inoculate oil palm seedling showed that 8 isolates could be restricted by *Mlu* I caused basal stem rot disease. But, there were two isolates could not be restricted by *Mlu* I also caused basal stem rot disease.

Keywords : biomolecular, pathogenicity, *Ganoderma*, oil palm, *Areca catechu*.

PENDAHULUAN

Pada dekade terakhir ini, epidemi penyakit busuk pangkal batang (BPB) yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma boninense* pada tanaman kelapa sawit sudah semakin meluas (Idris *et al.*, 2001; Susanto, 2002; Utomo, 2002). Pada beberapa lokasi perkebunan di Indonesia, penyakit ini telah menimbulkan kematian sampai 80% populasi tanaman kelapa sawit sehingga sangat merugikan (Idris *et al.*, 2001; Susanto, 2002; Utomo *et al.*, 2006; Utomo, 2002). Salah satu penyebab munculnya penyakit ini diduga berasal dari *Ganoderma* tanaman jenis palmae lain seperti kelapa, pinang, enau, rumbia, serdang, nibung, atau tanaman perkebunan lainnya (Susanto, 2002).

Jumlah spesies *Ganoderma* yang ada di seluruh dunia belum diketahui secara pasti, tetapi diperkirakan ada sekitar 60 spesies dan yang dapat menyerang kelapa sawit berjumlah 12 spesies yang 5 diantaranya terdapat di Indonesia yaitu *G. lucidum* (W curt Fr) Karts, *G. boninense* Pat, *G. aplanatum*, *G. laccatum*, *G. tropicum* (Moncalvo *et al.*, 2000; Moncalvo, 1998; Moncalvo, 2000; Utomo *et al.*, 2006; Utomo, 2002).

Pada saat ini pengembangan perkebunan kelapa sawit tidak hanya pada tanah mineral saja tetapi juga dilakukan untuk daerah-daerah marginal seperti rawa-rawa dan berasal dari konversi tanaman lain seperti kelapa, karet, kakao, dan lain-lain. Pengembangan kelapa sawit di daerah-daerah di atas ternyata menghadapi masalah penyakit *Ganoderma* yang lebih berat dan lebih sulit dikendalikan.

Salah satu faktor pembatas dalam pengendalian penyakit BPB tadi adalah kelangkaan metode diagnosa yang akurat untuk mendeteksi keberadaan *Ganoderma* sedini mungkin. Beberapa metode telah dikembangkan untuk mendeteksi keberadaan *Ganoderma* seperti penggunaan media selektif (Idris *et al.*, 2001; Trevor *et al.*, 1999), antibodi monoklonal yang diaplikasikan pada ELISA (Pingoud *et al.* 2003; Utomo *et al.*, 1997; Wu, 2001) dan menggunakan teknik reaksi berantai polimerase (PCR) (Utomo *et al.*, 2006; Utomo, 2002). Dengan penemuan teknik PCR ini, perkembangan analisis biomolekuler menjadi semakin cepat dan telah banyak digunakan untuk mendiagnosa berbagai penyakit dalam berbagai bidang termasuk kriminilitas (Dubay, 2006; Hong and Jung, 2004; Sambrook and Russel, 2001; Yuwono, 2006). Untuk deteksi dalam bidang mikologi daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari ribosomal (r) DNA telah dipilih sebagai target untuk mendesain primer spesifik untuk deteksi dalam PCR karena daerah tersebut bersifat seragam dalam satu spesies tetapi akan beragam sekuennya untuk spesies yang berbeda (Moncalvo *et al.*, 2000; Moncalvo, 2000; Utomo *et al.*, 1997; Utomo *et al.*, 2006; Utomo, 2002). Faktor kedua adalah belum diketahui epidemiologi atau kisaran inang masing-masing isolate *Ganoderma* dari berbagai palmae. Padahal sangat sering kita menemukan *Ganoderma* pada tanaman palmae lain di sekitar perkebunan kelapa sawit.

Penelitian ini bertujuan untuk menjawab epidemiologi isolat *Ganoderma* yang berasal dari tanaman palmae khususnya pinang bersifat patogenik pada tanaman kelapa sawit. Penelitian ini diharapkan

dapat bermanfaat sebagai informasi apabila akan menanam kelapa sawit di daerah yang banyak tanaman pinangnya atau konversi dari tanaman pinang.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Bahan yang digunakan terdiri dari 20 badan buah *Ganoderma* yang bersumber dari 20 tanaman pinang baik tanaman pinang mati maupun tanaman pinang hidup. Pemilihan sampel ini didasarkan pada banyaknya tanaman kelapa sawit yang terserang penyakit BPB pada lokasi yang berbatasan dengan tanaman pinang (tunggul pinang) atau tanaman jenis palmae lainnya.

Ekstraksi DNA Metode Moller

Isolat murni diperoleh dari 20 badan buah melalui irisan tipis (1 x 1 x 1 cm) dari setiap badan buah yang disterilisasi dengan kloroks kemudian ditanam pada media PDA sampai tumbuh miselium. Miselium murni hasil isolasi kemudian diinokulasikan pada media cair MaltYeast ekstrak selama 40 hari pada temperatur kamar untuk mendapatkan 50 mg berat kering. Miselium kemudian disaring dengan kertas Whatman no 1 lalu dicuci dengan air dan dikeringkan pada 70°C selama satu malam di dalam oven (Gottlieb *et al.*, 2000; Trevor *et al.*, 1999).

Sebanyak 50 mg miselium kemudian digerus di dalam lumpang porselen dengan penambahan N₂ cair serta serbuk PVPP sampai diperoleh serbuk halus (Yuwono, 2006), kemudian disuspensikan ke dalam 500 µl *buffer* pengekstraksi Moller dan ditambah dengan 5 µl larutan Proteinase K dan diinkubasi pada 65°C selama 1 jam di dalam *water bath* (Hong and Jung, 2004; Manning, 2002). Kedalamnya ditambahkan 140 µl larutan NaCl, kemudian 65 µl larutan *cetyltrimethyl ammonium bromida* (CTAB) dan diinkubasi pada 65°C selama 10 menit. Selanjutnya ditambahkan dengan satu volume larutan kloroform : isoamyl alkohol (KIAA), dan diinkubasi pada 0°C selama 10 menit. Larutan kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm pada temperatur kamar selama 10 menit. Larutan bagian atas didekantasi ke dalam tabung Ependorf baru dan ditambah dengan 225 µl larutan ammonium asetat 5 M kemudian divorteks kemudian disimpan pada 0°C selama 30 menit. Larutan hasil pendinginan disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 5 menit pada temperatur kamar.

Cairan bagian atas didekantasi ke dalam tabung ependorf baru, kemudian ditambah dengan 1 ul larutan enzim ribonuklease dan diinkubasi pada 37°C di dalam *water bath* selama 10 menit, lalu didinginkan pada es. Larutan hasil pendinginan ditambahkan larutan isopropanol dingin lalu disimpan pada 20°C selama 30 menit, kemudian disentrifugasi pada 13.000 rpm selama 10 menit pada temperatur kamar. Cairan bagian atas dibuang secara perlahan-lahan dan hati-hati agar endapan DNA yang melekat pada dinding tabung tidak ikut terbuang. Endapan yang diperoleh di cuci dengan alkohol 70% lalu dikeringkan pada 50°C selama 5 menit (Landgraf and Wolfer-Heiner, 2003; Meldrum, 2000a; Meldrum, 2000b; Utomo *et al.*, 2006; Utomo, 2002). Endapan yang diperoleh dilarutkan dengan larutan *buffer* TE dan disimpan pada 20°C. Larutan hasil ekstraksi ini kemudian diuji kemurniannya dengan metode elektroforesis gel agarose 1,5% setelah diwarnai dengan Etidium Bromida dan diperoleh pita tunggal sesuai dengan ukuran DNA *marker* yang diproduksi oleh Gibco BRL Life Technologies Inc Gaithersburg-USA.

Metode Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi menggunakan penciri primer ITS1-ITS 4 dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Primer diurutkan dengan program komputer Oligo 40 2109 dan analisis primer dilakukan dengan metode *Rychlik* dan metode *Road* yang disesuaikan dengan urutan nukleotida ITS 1-ITS 4 DNA *Ganoderma* patogen kelapa sawit. Urutan nukleotida ini di buat oleh *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) dengan nomor akses X 78749.

Struktur ITS 1, 5 – TCCGTAGGTGAACCTGCGG – 3
(*forward primer*).

Struktur ITS 4, 5 – TCCTCCGCTTATTGATATGC – 3
(*reverse primer*).

Prosedur amplifikasi PCR menggunakan metode Niefold dan Schober Butin. Komposisi pereaksi untuk amplifikasi PCR : 2,5 µl larutan 10 X *buffer* PCR, 1,0 µl larutan MgCl₂, 2,5 µl campuran dNTPs (Promega USA), 0,5 µl larutan ITS 1, 0,5 µl larutan primer ITS 4, 2,0 µl larutan DNA hasil ekstraksi, 0,4 µl larutan Tag DNA polimerase (Mira Diagnostica GmbH Germany), 13,4 µl air suling sehingga total volume 22,8 µl. Thermocycler MJ-Research Programable Thermo-Cycler Type PTC 100-MJ Research Inc Massachuset USA di program

sebagai berikut. Denaturasi pada 95°C selama 5 menit dan denaturasi selanjutnya pada 95°C selama 45 detik. Penapisan primer dilakukan pada 52°C selama 35 detik, sedangkan pemanjangan rantai (*extension*) pada 72°C selama 50 detik, kemudian diinkubasi pada 4°C selama 10 menit (Botwell, 2003; Dubay, 2006; Martin *et al.*, 2000; Pingoud *et al.*, 2003; Sambrook and Russel, 2001; Yuwono, 2006). Hasil amplifikasi diuji dengan metode elektroforesis dan diperoleh pita tunggal sebesar 650 bp.

Uji restriksi DNA produk PCR menggunakan enzim restriksi *Mlu* 1 dan sekuensing

DNA hasil amplifikasi kemudian diuji dengan metode restriksi menggunakan enzim *Mlu* 1. Posisi pemotongan DNA patogen kelapa sawit oleh enzim *Mlu* 1 pada situs :



Sedangkan DNA lain tidak di potong oleh enzim ini.

Prosedur restriksi menurut metode Utomo C, Warner, Niefold dan Desaing (Utomo *et al.*, 2006). Komposisi larutan restriksi terdiri dari 7,0 µl produk PCR, 1,0 µl *buffer Mlu* 1 (Gibco BRL Life Technologies Eggenstein Germany), 1,5 µl air suling. Total volume 10 µl. Diinkubasi pada 37°C selama 3 jam lalu diuji dengan metode elektroforesis menghasilkan 2 fragmen sebesar 537 bp dan 113 bp sesuai standar. Sekuensing urutan nukleotida DNA hasil amplifikasi dilakukan di Lab. Eijkman Institute (Garret and Grisham, 2005).

Uji patogenesis di rumah kaca

Uji patogenesis dilakukan dengan metode kayu karet (Susanto, 2002). Disediakan 30 buah potongan kayu karet bebas kulit ukuran (10 x 5 x3) cm. Disterilisasi pada 121°C selama 1 jam. Didinginkan pada temperatur kamar dan setelah dingin diinokulasikan dengan miselium murni *Ganoderma* pada temperatur kamar sampai semua permukaan kayu karet tertutupi oleh miselium *Ganoderma*.

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok dengan 3 ulangan. Setiap polibeg perlakuan diisi dengan tanah, lalu disiram dengan air sehingga tanah menjadi padat dengan ketinggian tanah mencapai 15cm. Inokulasi dilakukan dengan meletakkan inokulum *Ganoderma* dalam kayu karet dengan jarak

15 cm dari permukaan tanah. Pengamatan dilakukan setiap bulan dengan melihat perkembangan akar kelapa sawit dan gejala yang muncul.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji molekuler

Kemurnian DNA hasil ekstraksi diuji dengan metode elektroforesis menghasilkan pita tunggal sesuai standar terkecuali untuk sampel 3 dan 8 yang menghasilkan 2 pita. Hasil pemotongan oleh enzim *Mlu* 1 menghasilkan 2 fragmen yang jelas untuk sampel nomor 6, 7, 12, dan 13, sedang sampel 2 tidak terpotong, dan sampel 10 kurang jelas. Hasil pemotongan oleh enzim *Mlu* 1 untuk sampel 3, 5, 9 dan 14 dalam bentuk samar.

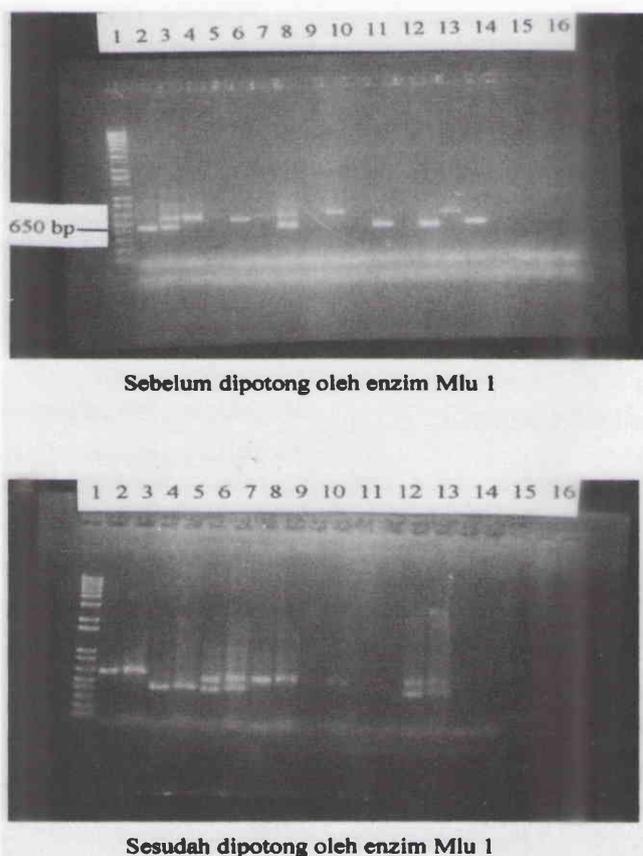
Gambar uji elektroforesis produk PCR menggunakan penciri primer ITS 1 – ITS 4 sebelum dan sesudah direkriski oleh enzim *Mlu* 1 adalah sebagai berikut:

Sekuensing DNA diperlukan untuk membandingkan urutan nukleotida DNA hasil ekstraksi dengan

urutan nukleotida DNA patogen kelapa sawit yang tersimpan pada Bank Gen yang terdapat di USA ataupun pada *European Molecular Biology (EMB)* yang terdapat di Eropa. Hasil sekuensing DNA yang dapat dibaca adalah 2 ITS 1 untuk sampel 1, 3 ITS 1 dan 3 ITS 4 untuk sampel 3, 7 ITS 1 untuk sampel 8 dan 9 ITS 1 untuk sampel 19.

Hasil ini menunjukkan bahwa isolat-isolat *Ganoderma* itu berbeda meskipun berasal dari inang yang sama yaitu pinang. Hal ini dapat dilihat untuk uji pemotongan dengan enzim *Mlu* 1 dan sekuensing DNA untuk daerah ITS 1 dan ITS 4. Hubungan antara pemotongan dengan enzim *Mlu* 1, sekuensing DNA, dan morfologi tubuh buah dapat dilihat pada Tabel 1.

Dari tabel di atas dapat dilihat bahwa DNA produk PCR dari P1, P12, P14, P15 dan P18 dapat dipotong oleh enzim *Mlu* 1 (+), tetapi hasil sekuensing DNA nya tidak terbaca (tidak sesuai dengan kontrol) atau (-) sehingga untuk ke 4 sampel ini diperlukan data lain untuk pengelompokannya apakah termasuk kelompok *G. boninense* atau bukan (ragu).



Gambar 1. Hasil elektroforesis yang diikuti pemotongan dengan enzim *Mlu* 1.

Tabel 1. Hubungan antara pemotongan dengan enzim *Mlu 1*, sekuensing DNA, dan morfologi *Ganoderma*.

Kode	Pemotongan oleh enzim <i>Mlu 1</i>	Hasil Pembacaan Sekuensing DNA pada daerah		Kelompok <i>Ganoderma</i>
		ITS 1	ITS 4	
P1	P6+ (terpotong)	-	-	- (ragu)
P2	(tidak terpotong)	+ (terbaca)	- (tidak)	<i>G. boninense</i>
P3	+	+	+	<i>G. boninense</i>
P4	-	-	-	-
P5	-	-	-	-
P6	-	-	-	-
P7	+	+	-	<i>G. boninense</i>
P8	-	-	-	-
P9	-	-	-	-
P10	-	-	-	-
P11	-	-	-	-
P12	+	-	-	<i>G. boninense</i>
P13	-	-	-	-
P14	+	-	-	<i>G. boninense</i>
P15	+	-	-	<i>G. boninense</i>
P16	-	-	-	-
P17	-	-	-	<i>G. boninense</i>
P18	+	-	-	<i>G. boninense</i>
P19	+	+	-	kontrol
P20	-	-	-	-

Sampel 3 (P3) DNA-nya dapat dipotong oleh enzim *Mlu 1*, hasil sekuensing DNA pada daerah ITS 1 - ITS 4 dapat dibaca (sesuai kontrol) maka sudah dapat dipastikan termasuk kelompok *G. boninense*. Sampel 7 (P7) dan sampel 19 (P19) DNA-nya dapat dipotong oleh enzim *Mlu 1*, hasil sekuensing pada daerah ITS 1 dapat dibaca (sesuai kontrol) maka keduanya termasuk kedalam kelompok *G. boninense*, walaupun pada daerah ITS4 tidak terbaca.

Sampel 2 (P2) DNA-nya tidak terpotong oleh enzim *Mlu 1*, tetapi hasil sekuensing DNA pada daerah ITS1 dapat dibaca, maka dapat dipastikan P2 termasuk kelompok *G. boninense* karena hasil sekuensing merupakan data yang lebih akurat dibanding pemotongan oleh enzim *Mlu 1*. Untuk sampel P4, P5, P6, P8, P9, P10, P11, P13, P16, dan P17 tampaknya bukan spesies *G. boninense*.

Uji Patogenisitas

Pada uji patogenisitas ini dapat dilihat bahwa masa inkubasi *Ganoderma* asal pohon pinang

berbeda-beda dan yang cepat adalah umur 4 bulan. Tanda penyakit yang muncul adalah tumbuhnya tubuh buah pada pangkal batang. Tetapi kondisi tanaman masih dapat bertahan dan masih tetap hidup. Matinya bibit kelapa sawit dimulai pada bulan keenam perlakuan. Bibit kelapa sawit mati akibat *Ganoderma* ini kira-kira pada bulan kesembilan yang ditandai dengan munculnya tubuh buah dan mengeringnya seluruh tanaman. Dengan demikian pada bulan kesembilan ini sudah dapat dilihat apakah jamur *Ganoderma* ini sebagai patogen atau tidak.

Hasil uji patogenisitas ini juga selalu berkorelasi dengan pemotongan dengan enzim *Mlu 1*. Ada yang terpotong dengan enzim *Mlu 1* tetapi *Ganoderma* tidak bersifat patogen, meskipun sebagian besar terpotong oleh enzim *Mlu 1* bersifat patogen ke tanaman kelapa sawit. Ada juga isolat yang tidak terpotong oleh enzim *Mlu 1* tetapi juga bersifat patogen ke tanaman kelapa sawit. Ada kemungkinan besar jamur ini bukan spesies *G. boninense*. Hubungan antara pemotongan enzim *Mlu 1* dengan uji patogenisitas dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 2. Hasil uji patogenesis pada bibit kelapa sawit setelah 9 bulan aplikasi.

Pembahasan

Salah satu sulitnya pengendalian *Ganoderma* adalah rumitnya epidemiologi pathogen *Ganoderma*.

Kisaran inang dari *Ganoderma* sangat luas dan tidak hanya famili palmae saja. Salah satu inang *Ganoderma* adalah tanaman pinang yang secara sengaja atau tidak sengaja sering berdekatan dengan kebun kelapa sawit.

Tabel 2. Hubungan antara pemotongan dengan enzim *Mlu 1* dan uji patogenesis.

Isolat	Pemotongan dengan enzim <i>Mlu 1</i>	Uji Patogenesis
P1	P6+ (terpotong)	+
P2	(tidak terpotong)	+
P3	+	+
P4	-	+
P5	-	-
P6	-	-
P7	+	+
P8	-	-
P9	-	-
P10	-	-
P11	-	-
P12	+	+
P13	-	-
P14	+	+
P15	+	+
P16	-	-
P17	-	-
P18	+	+
P19	+	+
P20	-	-

Untuk menjawab apakah *Ganoderma* yang berasal dari pohon pinang dapat menular ke tanaman kelapa sawit harus diuji secara akurat. Uji tersebut harus secara biomolekuler dan sekaligus uji patogenisitas.

Pada uji biomolekuler diperoleh hasil bahwa kemurnian DNA satu pita tunggal (murni) kecuali untuk isolate P 8 menghasilkan 2 pita (tidak murni) dan untuk P11 tidak teramati karena DNA-nya terlalu sedikit. Hal ini diduga untuk isolate P 11 miselium murni hasil isolasi sebagai bahan baku untuk ekstraksi DNA sudah terlalu tua sehingga tidak semuanya terekstraksi secara sempurna. Kemurnian DNA hasil ekstraksi dapat pula di lihat dari hasil pemotongan oleh enzim *Mlu 1*.

Bila proses ekstraksi DNA tidak sempurna maka baik protein maupun RNA ikut terekstraksi sehingga menghalangi pemotongan DNA oleh enzim *Mlu 1* sehingga 2 fragmen sebesar 537 bp dan 113 bp tidak terbentuk (Garret & Grisham, 2005; Meldrum, 2000a; Pingoud *et al.*, 2003). Inokulasi pada media cair MY ekstrak bertujuan untuk memudahkan sel-sel miselium jamur agar mudah digerus dan untuk memperoleh 50 mg berat kering (Botwell, 2003; Sambrook & Russel, 2001; Yuwono, 2006; Utomo, 2002).

Amplifikasi PCR DNA hasil ekstraksi menggunakan penciri primer ITS 1 - ITS 4 semuanya memberikan hasil positif sebesar 650 bp. Pemilihan primer ITS 1 - ITS 4 karena menurut hasil penelitian terdahulu, primer ini juga dapat digunakan untuk karakterisasi golongan *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Magnaporthe* (Martin *et al.*, 2000; Moncalvo *et al.*, 2000; Utomo *et al.*, 2006). Daerah ITS dari 8 DNA *Ganoderma* pinang dapat dipotong oleh enzim *Mlu 1* menghasilkan 2 fragmen sebesar 537 bp dan 113 bp. Menurut hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa daerah ITS DNA *G. boninense* juga menghasilkan 2 fragmen sebesar 537 bp dan 113 bp, sehingga dapat diambil kesimpulan sementara bahwa isolat *Ganoderma* pinang tersebut termasuk kedalam spesies *G. boninense* (Moncalvo, 1998; Utomo *et al.* 2006; Utomo, 2002).

Uji patogenisitas sangat dibutuhkan sebagai uji terakhir apakah isolate-isolat *Ganoderma* tersebut sebagai patogen atau tidak pada tanaman kelapa sawit. Sampai saat ini belum ada yang melaporkan tanaman kelapa sawit yang resisten terhadap *Ganoderma*. Perbedaan yang ada pada tingkat kejadian penyakit. Hasil uji patogenisitas ini menegaskan bahwa memang sebagian besar yang terpotong oleh enzim *Mlu 1* dapat menyebabkan penyakit *Ganoderma* pada bibit kelapa

sawit. Tetapi yang sangat menarik adalah ada isolat yang tidak terpotong oleh enzim *Mlu 1* tetapi mampu menyebabkan penyakit *Ganoderma* juga atau sebaliknya mampu terpotong oleh enzim *Mlu 1* tetapi kurang mampu menyebabkan penyakit *Ganoderma*.

Mekanisme merusaknya *Ganoderma* pada tanaman kelapa sawit berdasarkan aktivitas enzim-enzim pendegradasi komposit kayu tanaman seperti enzim lignin peroksidase, selulase dan laccase yang di produksi oleh *Ganoderma* (Trevor *et al.*, 1999). Kesimpulan kedua yang dapat ditarik adalah *Ganoderma* yang menyerang pohon pinang adalah tidak satu spesies. Dari hasil pengamatan ini menunjukkan bahwa isolate yang berasal dari pinang hidup lebih agresif daripada isolat yang berasal dari pinang mati. Hal ini diduga karena untuk mendegradasi komposit kimia pembentuk struktur batang tanaman pinang hidup lebih sulit dibanding dengan tanaman yang sudah mati (Pingoud *et al.*, 2003; Trevor *et al.*, 1999).

Manfaat yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan penanaman kelapa sawit atau strategi pengendalian *Ganoderma* itu sendiri. Apabila kita akan menanam kelapa sawit yang di daerah tersebut banyak terdapat tanaman pohon pinang atau akan mengkonversi tanaman pinang tindakan yang tepat adalah sanitasi pohon pinang tersebut sebelum menanam. Sedangkan untuk strategi pengendalian adalah apabila ada tanaman pohon pinang terinfeksi *Ganoderma* di dekat kebun kelapa sawit sebaiknya dilakukan pengutipan tubuh buah *Ganoderma* yang diikuti oleh sanitasi tanaman terinfeksi.

KESIMPULAN

Berdasarkan uji biomolekuler dan uji patogenisitas dapat disimpulkan bahwa *Ganoderma* yang menyerang pohon pinang adalah beragam. Ada yang bersifat patogen pada kelapa sawit yaitu isolat P1, P2, P3, P4, P7, P12, P14, P15, P18, dan P19, sedangkan isolat P5, P6, P8, P9, P10, P11, P13, P16, P17, dan P20 tidak bersifat patogen pada tanaman kelapa sawit.

DAFTAR PUSTAKA

- Botwell, D. 2003. DNA microarrays a molecular cloning manual. Cold Spring Harbour Lry Press New York .386 - 402.

- Dubay, R. C. 2006. A text book of biotechnology. S. Chand & Company CTD Ram Nagar New Delhi.
- Garret, R. H. and Grisham C. M. 2005. DNA sequencing automated. Biochemistry third Edition International edition Thomson Learning Inc Singapore.
- Gottlieb, A.M, E. Ferrer, and Wright. 2000. rDNA Analysis AS an aid to the taxonomy of spesies of *Ganoderma*. Mocological Research. Cambridge University. Press Madrid. Spanyol.
- Hong, S.G. and H.S. Jung. 2004. Phylogenetic analysis of *Ganoderma* base on nearly complete mitochondrial smallsubunitri-bosomal DNA sequences. *Micologia* 96 : 742 - 755.
- Idris, A.S., D. Arifin, T. Wat, and A. Swinburne. 2001. Ditrubution of *Ganoderma* stem rot of oil palm in relation to the enviromental condition in peninsular Malaysia. Proc PIPOC 2001. International Palm Oil Congres (Agricltur) Malaysia.
- Landgraf, A. and Wolfer-Heiner. 2003. Tag DNA Polymerase with particular emphasis on its use in PCR protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc. Totowa N. Y.16 : 31 -52.
- Manning. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 : 1912 - 1934.
- Martin, C., D. Roberts, M. Van-der-Weidi, R. Russeau, G. Jannes, T. Smith, and M. Maher. 2000. Development of PCR - based line probe assay for identification of fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 38 : 10. 3735 - 3742.
- Meldrum, D. 2000a. Outomation for genomics part one. Preparation for Sequencing Genomics Research 10 :1081 - 1092.
- Meldrum, D. 2000b. Automation for genomics parth two. Sequencer microarrays and future trends. *Genomics Research* 10 : 1288 - 12303.
- Moncalvo, J. M. 1998. Phylogeny of *Ganoderma*. Botany Departement Duke University Durhan N.C. 27708 U.S.A. in International Workshop on *Ganoderma* Disease MARDI Serdang Malaysia.
- Moncalvo, J. M. 2000. Systematics of *Ganoderma* in Flood J.P. Bridge & M. Holderness (eds). *Ganoderma* Disease of Perennial Crops CABI Publishing U.K 23 46.
- Moncalvo, J. M., F. M. Lutzoni, S.A. Rehner, J. Jonhson, and R.Vilgalys. 2000. Phylogenetic relationship of agaric fungi based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Syst. Biol.* 49 : 278-305.
- Pingoud, A., J. Alves, and R. Geiger. 2003. Restriction enzymes. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Totowa N.Y.16 : 107 - 163.
- Sambrook, J. and D. W. Russel. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York 2 : 818 - 825.
- Susanto, A. 2002. Kajian pengendalian hayati *Ganoderma boninensis* Pat. penyebab penyakit busuk pangkal batang kelapa sawit. Disertasi Program Doktor Program Pasca Sarjana IPB Bogor .
- Yuwono, T. 2006. Teori dan aplikasi polymerase chian reaction. Penerbit Andi Yogyakarta 17 - 45.
- Trevor, M. D., K. Souza, Boominathan, and C.A. Reddy. 1999. Isolation of laccase gene specific sequence from white rot and brown rot fungi by PCR Americana Society for Microbiology.
- Utomo, C, F. Niefold, and C. Moller. 1997. Study on variability of *Ganoderma* in oil palm by Elisa Technique. *Indonesian Journal of Oil Palm Research* vol 5 no 1 : 27 - 50.
- Utomo, C. 2002. Studies on molecular diagnosis for detection, identification and differentiation of *Ganoderma*, The causal agent of basal stem rot disease in oil palm. Doctoral Disertation of Agricultural Sciences of the Faculty of Agricultural Sciences Martin Luther University Halle-Wittenberg Germany.
- Utomo, C., F. Niefold, D. Tambajong, and H. B. Desing. 2006. Molecular characterization of pathogenic *Ganoderma* in oil palm based on intragenic spacer 1 (ISG 1). Prosiding International Oil Palm Conference, Bali Indonesia 2006. Pusat Penelitian Kelapa Sawit.
- Wu, R. 2001. Development of enzyme-based methods for DNA sequencing analysis and application in genomic projects. *Methods in Enzymology* 67 : 431 - 468.