



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

PREPARASI DNA CEPAT DAN UJI SENSITIFITAS SISTEM DIAGNOSIS Colletotrichum sp BERBASIS PCR

SKRIPSI



**NURUL RACHMAN
05112011**

**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2012**

BIODATA

Penulis dilahirkan di Jakarta Pusat Galur Kelurahan Tanah Tinggi, DKI Jakarta pada tanggal 21 Nopember 1988 sebagai anak pertama dari lima bersaudara, dari pasangan Bapak M. Salman Nasution dan Ibu Erlina Abdullah. Pendidikan Sekolah Dasar (SD) di tempuh di SDN Bumi Bekasi Baru IX Bekasi Timur, lulus tahun 1999. Sekolah Lanjutan Tingkat Pertama (SLTP) di tempuh di SLTP YAPPA Depok, lulus tahun 2002. Sekolah Menengah Kejuruan (SMK) di tempuh di SMF Lembaga Pendidikan Kesehatan Jakarta Selatan, lulus pada tahun 2005. Pada tahun 2005 penulis di terima di Fakultas Pertanian Universitas Andalas Program Studi Pemuliaan Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian.

Padang, Januari 2012

Nurul Rachman



KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadiran Allah Subhanahuwata'ala atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulisan skripsi ini dapat diselesaikan. Skripsi ini diberi judul **“Preparasi DNA Cepat Dan Uji Sensitifitas Sistem Diagnosis *Colletotrichum* sp Berbasis PCR.”**

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang setulusnya kepada Ibu Dr. Ir. Hj. Etti Swasti, MS dan Bapak Prof. Dr. sc. agr. Ir. H. Jamsari, MP sebagai dosen pembimbing yang telah banyak membantu, memberi petunjuk, saran - saran dan pengarahan. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada Ketua dan Sekretaris Jurusan Budidaya Pertanian dan semua pihak yang telah memberi semangat dan bantuan berharga selama penulis menyelesaikan skripsi ini. Penghormatan dan penghargaan yang setinggi-tingginya penulis sampaikan kepada kedua orang tua yang telah memberi semangat, bantuan dan do'a kepada penulis, sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini memiliki kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kepada pembaca untuk memberikan kritik dan saran yang bersifat konstruktif demi kesempurnaannya. Harapan penulis semoga skripsi ini bermanfaat untuk kemajuan ilmu pengetahuan terutama di bidang pertanian.

Padang, Januari 2012

N.R.

DAFTAR ISI

	<u>Halaman</u>
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xiv
I. PENDAHULUAN	1
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Jamur	4
2.2. Jamur Patogen Penyebab Penyakit Antraknosa.....	5
2.3. Senyawa Penyusun Dinding Sel Jamur	8
2.4. Bahan Genetik	10
2.5. Identifikasi dengan Metode PCR.....	10
2.6. Primer	11
III. BAHAN DAN METODE	14
3.1. Waktu dan Tempat.....	14
3.2. Bahan dan Alat	14
3.3. Metode Penelitian	15
3.4. Prosedur Kerja	15
3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan	16
3.4.2. Pemiakan Jamur.....	16
3.4.3. Ekstraksi Enzim <i>Sellulase</i> dan <i>Kitinase</i> Dari Bakteri	16
3.4.4. Uji Preparasi DNA	17
3.4.5. Amplifikasi DNA Dalam Menguji Sensitifitas Diagnosis <i>Colletotrichum</i> sp Dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR dan Kode Cc 7BP1-FR.....	19
3.5. Analisis Data.....	20
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1. Preparasi DNA.....	21

4.2. Studi Keberhasilan Teknik PCR Terhadap Hasil Preparasi DNA <i>Colletotrichum</i> sp.....	26
4.3. Amplifikasi DNA Dalam Menguji Sensitifitas Diagnosis <i>Colletotrichum</i> sp Dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR dan Kode Cc 7BP1-FR	27
4.3.1. Uji Sensitifitas Diagnosis <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR	27
4.3.2. Uji Sensitifitas Diagnosis <i>Colletotrichum capsici</i> Dengan Primer Spesifik Kode Cc7BP1-FR	30
V. KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1. Kesimpulan.....	32
5.2. Saran	32

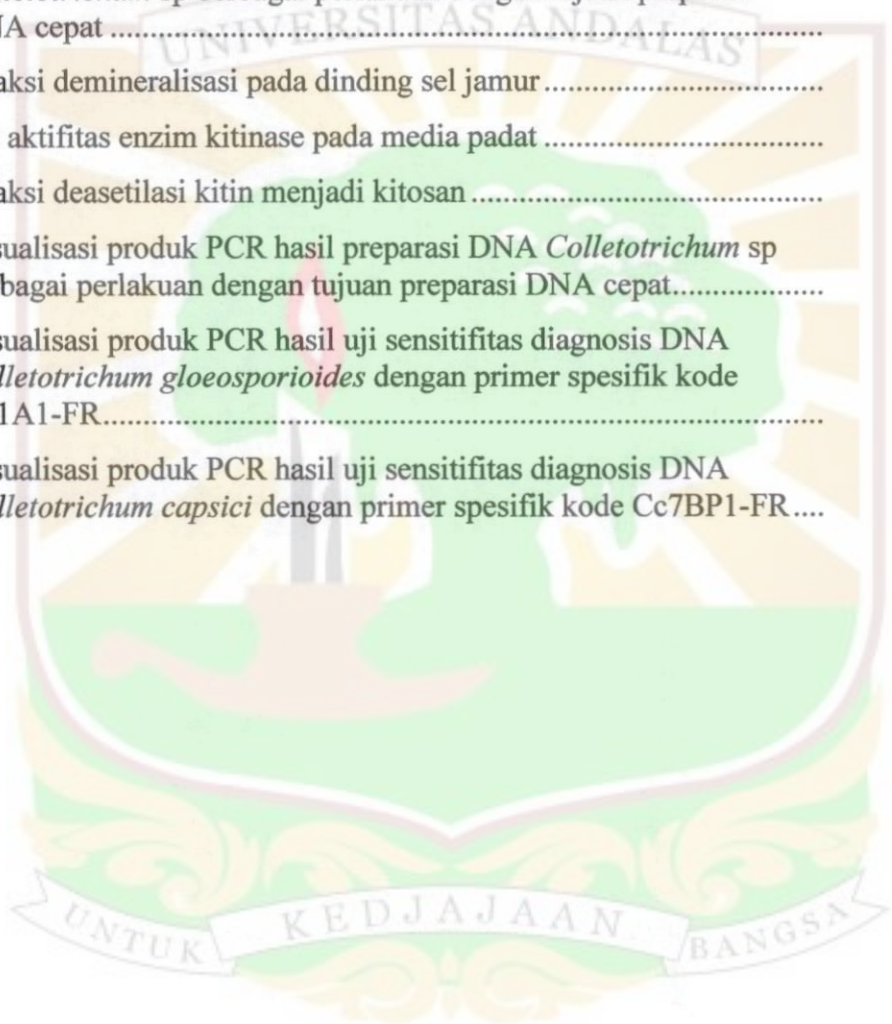
DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN



DAFTAR GAMBAR

<u>Gambar</u>	<u>Halaman</u>
1. Diagram arsitektur dinding pada bagian hifa dewasa dari <i>Neurospora crassa</i> (ascomycota)	9
2. Alur kegiatan kerja penelitian.....	15
3. Visualisasi hasil elektroforesis isolasi DNA genom jamur <i>Colletotrichum</i> sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat	21
4. Reaksi demineralisasi pada dinding sel jamur	25
5. Uji aktifitas enzim kitinase pada media padat	26
6. Reaksi deasetilasi kitin menjadi kitosan	26
7. Visualisasi produk PCR hasil preparasi DNA <i>Colletotrichum</i> sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat.....	27
8. Visualisasi produk PCR hasil uji sensitifitas diagnosis DNA <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> dengan primer spesifik kode Cg1A1-FR.....	28
9. Visualisasi produk PCR hasil uji sensitifitas diagnosis DNA <i>Colletotrichum capsici</i> dengan primer spesifik kode Cc7BP1-FR....	30



DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

1. Konsentrasi yang diperoleh dari hasil isolasi DNA genom jamur *Colletotrichum* sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat dengan menggunakan marker lambda DNA 50 ng/ μ L..... 23



DAFTAR LAMPIRAN

<u>Lampiran</u>	<u>Halaman</u>
1. Jadwal kegiatan penelitian	36
2. Dokumentasi penelitian.....	37
3. Komposisi media CMC cair dan media kitin cair	38
4. Protokol isolasi DNA genomik menggunakan genomic DNA purification kit PROMEGA USA	39



PREPARASI DNA CEPAT DAN UJI SENSITIFITAS SISTEM DIAGNOSIS *Colletotrichum* sp BERBASIS PCR

ABSTRAK

Penelitian yang berjudul “Preparasi DNA Cepat dan Uji Sensitifitas Diagnosis *Colletotrichum* sp Berbasis PCR” telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas pada bulan Juli 2010 sampai bulan Agustus 2010. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan metode preparasi DNA yang cepat dalam sistem diagnosis *Colletotrichum* sp berbasis PCR dan untuk menetapkan tingkat sensitifitas pengujian berbasis PCR tersebut.

Metode penelitian ini dilakukan dengan dua metode yaitu, metode deskriptif (pengamatan karakteristik fragmen hasil proses amplifikasi dengan primer spesifik) dan metode eksperimen (preparasi DNA cepat dan uji sensitifitas).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa dalam preparasi DNA menggunakan: a) protokol kit PROMEGA akan memakan waktu sekitar 2 jam 50 menit, b) metode enzimatis akan memakan waktu sekitar 30 menit, c) metode preparasi DNA dengan senyawa kimia tertentu akan memakan waktu sekitar 45 menit. Untuk proses elektroforesis masing-masing metode memakan waktu sekitar 15 menit. Efektifitas preparasi DNA dengan menggunakan beberapa metode percobaan tersebut dapat ditunjukkan dari rata-rata konsentrasi DNA yang dihasilkan dan intensitas produk PCR DNA hasil isolasi.

Sensitifitas dari primer spesifik kode Cg1A1-FR dan primer spesifik Cc7BP1-FR masing-masingnya adalah 1 fg/ μ L. Hal ini dapat memudahkan diagnosis dalam rangka memantau sejak dini keberadaan jamur patogen tersebut di lapangan.

Kata kunci : *Colletotrichum* sp, preparasi DNA cepat, uji sensitifitas, primer spesifik.



RAPID DNA PREPARATION AND SENSITIVITY TEST OF *Colletotrichum* sp PCR-BASED DIAGNOSIS SYSTEM

ABSTRACT

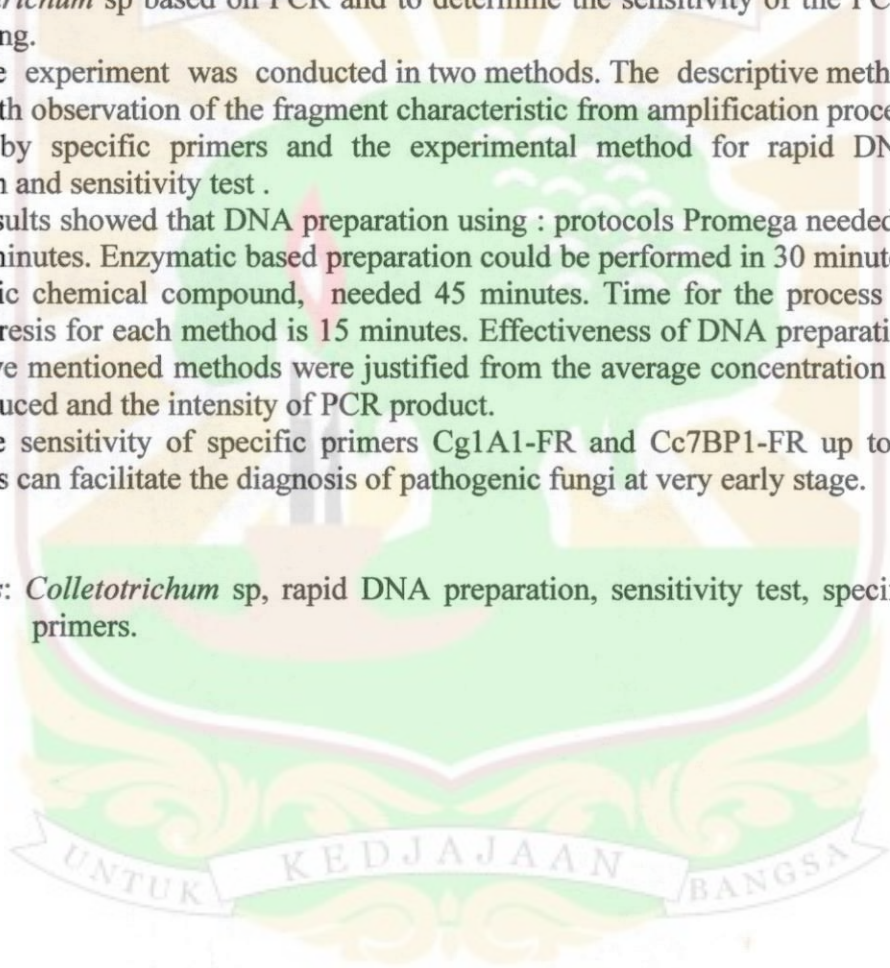
The study, entitled "Rapid DNA Preparation and Sensitivity Test of *Colletotrichum* sp PCR-Based Diagnosis System" was done in the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Andalas University since July 2010 to August 2010. The purpose of this study was to obtain a rapid DNA preparation method in the diagnosis system of *Colletotrichum* sp based on PCR and to determine the sensitivity of the PCR-based testing.

The experiment was conducted in two methods. The descriptive method dealing with observation of the fragment characteristic from amplification process produced by specific primers and the experimental method for rapid DNA preparation and sensitivity test.

Results showed that DNA preparation using : protocols Promega needed 2 hours 50 minutes. Enzymatic based preparation could be performed in 30 minutes, and specific chemical compound, needed 45 minutes. Time for the process of electrophoresis for each method is 15 minutes. Effectiveness of DNA preparation using above mentioned methods were justified from the average concentration of DNA produced and the intensity of PCR product.

The sensitivity of specific primers Cg1A1-FR and Cc7BP1-FR up to 1 fg/ μ L. This can facilitate the diagnosis of pathogenic fungi at very early stage.

Key words: *Colletotrichum* sp, rapid DNA preparation, sensitivity test, specific primers.



I. PENDAHULUAN

Serangan penyakit antraknosa pada buah cabai disebabkan oleh jamur *Colletotrichum capsici* dan *Colletotrichum gloeosporioides*. Penyakit tersebut menyebabkan kerugian yang sangat besar baik di daerah tropis maupun di subtropis (Agrios, 1997).

Oleh karena itu, dalam rangka meningkatkan keberhasilan penanganan pengendalian serangan penyakit antraknosa maka dibutuhkan suatu sistem diagnosis yang lebih tepat, cepat dan akurat. Alternatif yang bisa digunakan dalam mendeteksi keberadaan jamur penyebab penyakit antraknosa adalah dengan menggunakan teknik molekuler seperti yang telah dilakukan pada beberapa jenis tanaman maupun patogen penyebab penyakit dan organisme lainnya (Jamsari, 2004).

Salah satu tahapan dalam teknik molekuler yang penting adalah teknik isolasi DNA. Menurut Jamsari (2007), prinsip dasar isolasi DNA adalah upaya untuk membebaskan materi genetik dari dinding sel dan ikatan protein-protein histon yang terutama sekali terletak di dalam inti sel dengan mengupayakan tingkat kerusakan baik mekanis maupun fisis seminimal mungkin terhadap materi genetik tersebut. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam kegiatan isolasi DNA adalah keutuhan ukuran molekul DNA, efektifitas isolasi, kemurnian DNA hasil isolasi dan praktis serta ekonomis.

Teknik isolasi DNA dengan mengupayakan kerusakan sel dan jaringan yang memanfaatkan senyawa kimia tertentu belum banyak dilakukan orang. Pemanfaatan senyawa kimia dianggap lebih praktis karena dapat menghindari perusakan sel dan jaringan dibanding dengan proses penggerusan disamping itu juga lebih ekonomis karena senyawa tersebut mudah di dapat serta waktu yang dibutuhkan dalam mengisolasi DNA suatu organisme relatif lebih cepat.

Teknik isolasi DNA yang memanfaatkan senyawa kimia harus memperhatikan jenis senyawa kimia penyusun dinding sel organisme. Dengan demikian dapat ditentukan jenis senyawa kimia yang akan digunakan dalam proses pemecahan dinding sel, sehingga isi sel dan DNA yang terdapat pada sitoplasma akan keluar dan memudahkan proses isolasi DNA.

Pada umumnya sel-sel eukaryot jamur memiliki struktur dan kompartemen yang kompleks dan terdiri dari golongan senyawa-senyawa yang sulit dihancurkan secara mekanis maupun dicerna secara enzimatis (Jamsari, 2008). Senyawa kimia utama yang menyusun dinding sel jamur adalah polisakarida dengan perkiraan sekitar 80-90% sedangkan protein dan lemak sekitar 10-20%. Komposisi senyawa kimia dinding sel tidak sama untuk semua jenis jamur. Pada umumnya dinding sel jamur terdiri atas selulosa dan kitin (Darnetty, 2005).

Proses pemecahan dinding sel pada jamur biasanya menggunakan metode penggerusan miselia jamur hasil biakan pada media padat atau kumpulan miselia jamur hasil biakan pada media cair. Namun, cara tersebut dianggap kurang cepat untuk keperluan tindakan penanganan pengendalian jamur patogen penyebab penyakit antraknosa tersebut di lapangan.

Di dalam penelitian ini, akan dicoba beberapa percobaan dalam rangka pemecahan dinding sel jamur patogen penyebab antraknosa yaitu, proses *demineralisasi*, *pendegradasian* senyawa selulosa pada dinding sel jamur, *deasetilasi* kitin menjadi kitosan pada dinding sel jamur dan pelarutan senyawa kitosan atau *pendegradasian* senyawa kitin pada dinding sel jamur sehingga memudahkan proses isolasi DNA.

Sistem deteksi molekuler berbasis PCR merupakan salah satu teknik yang dianggap cepat dan akurat. Dalam hal ini prinsip utama yang harus dipenuhi adalah kemampuan untuk mengidentifikasi kehadiran molekul-molekul DNA jamur patogen penyebab penyakit antraknosa pada tahap sedini mungkin meskipun populasi patogen di dalam salah satu bagian tanaman masih dalam jumlah yang sangat sedikit (Jamsari, 2008). Keberhasilan sistem deteksi molekuler berbasis PCR sangat ditentukan oleh ada tidaknya situs penempelan primer dan juga oleh kemurnian dan keutuhan DNA cetakan. Di samping itu jumlah molekul DNA cetakan akan sangat menentukan keberhasilan sistem diagnosis tersebut.

Berdasarkan hasil penelitian Hidayat (2010), didapatkan 2 kombinasi primer yang mampu mendeteksi keberadaan jamur patogen penyebab penyakit antraknosa pada tanaman cabai. Untuk mendeteksi keberadaan jamur *Colletotrichum gloeosporioides* digunakan primer dengan kode Cg1A1, Primer

tersebut terdiri dari primer Cg1A1-F 5' TTACTGGAAGGTAACGCCGAG 3' dan Cg1A1-R 5' AGAAGGATGAGGCTGGCTGG 3'. Sedangkan untuk mendeteksi jamur *Colletotrichum capsici* digunakan primer dengan kode Cc7BP1, primer tersebut terdiri dari primer Cc7BP1-F 5' ATGGTCAAGTTCTCGCGA-TAGC 3' dan Cc7BP1-R 5' GATGCCACGATCTCGCATCG 3'.

Kedua primer spesifik tersebut selanjutnya perlu diketahui tingkat sensitifitasnya. Berapa jumlah minimum molekul DNA yang masih dapat dipergunakan dalam sistem diagnosis yang telah dikembangkan sebelumnya. Hal ini sangat berguna agar pada aplikasi di lapangan dapat memberikan informasi yang tepat jika dipergunakan dalam peramalan perkembangan penyakit antraknosa pada benih, bibit dan buah tanaman sehingga dapat dilakukan penanganan dan pengendalian penyebaran penyakit secepat mungkin.

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah: i) untuk mendapatkan metode preparasi DNA yang cepat dalam sistem diagnosis *Colletotrichum* sp berbasis PCR, dan ii) untuk menetapkan tingkat sensitifitas pengujian berbasis PCR tersebut.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat baik secara aplikatif maupun akademik. Dari segi aplikatif diharapkan dengan melakukan penelitian tersebut maka dapat sejak dini mendeteksi potensi serangan penyakit antraknosa pada benih atau bibit yang akan digunakan sebagai bahan perbanyakan.

Berdasarkan kerangka pikir pada latar belakang yang diuraikan di atas, maka dapat dirumuskan hipotesis sebagai berikut : 1) pemanfaatan senyawa tertentu berpengaruh terhadap preparasi DNA *Colletotrichum* sp dalam sistem deteksi dini, 2) beberapa konsentrasi DNA berpengaruh dalam menentukan jumlah minimum molekul DNA yang masih dapat dipergunakan dalam sistem diagnosis berbasis PCR.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Jamur

Menurut Tjitrasona (1967), “fungus adalah salah satu golongan organisme heterotrofik yang oleh sebahagian ahli dipandang sebagai tumbuh – tumbuhan tingkat rendah (*Thallophyta*). Golongan tumbuhan tersebut tidak mengandung klorofil dan dapat bersifat polifiletik dari beberapa golongan algae (merah dan hijau) atau monofiletik dari algae hijau yang *filamentous*. Sementara beberapa ahli lainnya dipandang sebagai suatu dunia (*regnum*) bebas (*independent*) bersifat monofiletik dari flagellata tak berwarna atau *proteomyxa* kompleks. Fase asimilatif berupa misellium atau hifa dan tubuh buahnya juga terdiri dari tenunan misellium. Hidup sebagai parasit atau saprofit.

Menurut Darnetty (2005), jamur adalah organisme hidup yang tidak mempunyai klorofil yang mirip dengan tumbuhan sederhana dengan beberapa pengecualian, mempunyai dinding sel dan biasanya tidak bisa bergerak (*non motil*). Walaupun jamur mempunyai sel reproduktif yang bisa bergerak (*motil*) dan berkembang biak dengan spora, namun jamur tidak mempunyai akar, batang dan daun seperti halnya tumbuhan.

Ainsworth (1973) cit Darnetty (2005) menyebutkan, karakteristik utama dari jamur sebagai berikut :

- a. Bersifat heterotrofik (tidak melakukan fotosintesa) dan absorptif untuk memenuhi kebutuhan nutrisinya.
- b. *Talus/tubuh/soma*, berada pada dan dalam substrat, uniselular atau berupa benang (misellium) bersepta atau tidak, umumnya *non motil* dan beberapa ada yang *motil* seperti *Zoospora*.
- c. Dinding sel jelas bentuknya, umumnya terdiri dari kitin dan selulosa.
- d. Status inti : eukaryotik (inti sejati), berinti banyak (multinukleat), misellium homokaryotik atau heterokaryotik, dikaryotik, haploid atau diploid.
- e. Siklus hidup sederhana sampai kompleks.

- f. Sistem reproduksi, ada yang aseksual atau seksual, homotalik atau heterotalik.
- g. *Sporokarp* : mikroskopis sampai makroskopis dan memperlihatkan differensiasi jaringan yang terbatas.
- h. Terdapat dimana-mana sebagai saprofit, simbion dan parasit.
- i. Distribusi : *kosmopolitan*.

2.2. Jamur Patogen Penyebab Penyakit Antraknosa

Antraknosa merupakan suatu gejala nekrotik hipoplasia, seperti puru, yang pelukaannya cekung, terjadi pada batang, buah atau bunga dari tanaman (Mardinus, 1984). Serangan penyakit antraknosa pada tanaman disebabkan oleh jamur *Colletotrichum capsici* dan *Colletotrichum gloeosporioides* (Semangun, 1989; Suryaningsih, 1996).

Jamur terdiri dari empat kelas yaitu, *Phycomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* dan *Deuteromycetes* (fungi imperfecti/jamur tidak sempurna) (Darnetty, 2005). Jamur patogen penyebab penyakit antraknosa merupakan jamur tingkat tinggi, kelas *ascomycetes*, dan pada umumnya menghasilkan spora seksual (Mardinus, 1984).

Spesies *Colletotrichum* penyebab penyakit antraknosa ini selain *Colletotrichum capsici* juga disebabkan *Colletotrichum gloeosporioides* (Suryaningsih, 1996). Secara morfologis jamur ini dapat dibedakan dari terbentuk atau tidaknya *setae*. Pada jamur *Colletotrichum capsici* terbentuk *setae* sedangkan pada jamur *Colletotrichum gloeosporioides* tidak terbentuk *setae* (Walker, 1952 cit Maryam, 2001). Konidia jamur *Colletotrichum capsici* berbentuk bulan sabit sedangkan jamur *Colletotrichum gloeosporioides* berbentuk batang dengan ujung yang membulat (Semangun, 1989).

Pertumbuhan koloni jamur *Colletotrichum capsici* pada media PDA (*Potato Dekstrose Agar*) berbentuk lingkaran konsentris berwarna abu – abu kehitaman. Areal misellia tumbuh jarang seperti rambut halus dan berkumpul ke arah pusat. Setelah beberapa hari terbentuk *aservuli* berwarna putih kotor, orange muda sampai orange terang kemudian berubah menjadi abu – abu gelap (Halliday, 1980). Spesies *Colletotrichum gloeosporioides* mempunyai bentuk pertumbuhan

yang hampir mirip dengan *Colletotrichum capsici* tetapi warna koloninya putih keabuabuan (Kulrestha, Mathur dan Neegrad, 1976 cit Hidayat 2010).

Gejala serangan jamur patogen penyebab penyakit antraknosa ini biasanya dapat terlihat pada saat tanaman sudah dewasa sampai pasca panen. Gejala awal yang dapat dikenali dari serangan penyakit ini adalah bercak yang agak mengkilap, sedikit berair. Lama-kelamaan busuk tersebut akan melebar membentuk lingkaran konsentris. Dalam waktu yang tidak lama maka buah akan berubah menjadi coklat kehitaman dan membusuk. Sedangkan pada tanaman yang masih muda keberadaan jamur patogen ini belum terlihat (Hidayat, 2010).

Kedua jenis jamur ini memiliki gejala yang berbeda pada inang yang diserangnya. Suhardi (1989) menyatakan bahwa jamur *C. gloeosporioides* penyebab antraknosa pada cabai dapat menyebabkan antraknosa pada pepaya sedangkan jamur penyebab antraknosa dari pepaya dapat menginfeksi cabai, mangga, pisang dan ubi kayu. Spesies *C. capsici* menginfeksi buah pada semua stadium, gejala baru dapat dilihat apabila buah sudah masak penuh sedangkan *C. gloeosporioides* gejala akan terlihat dengan cepat pada buah muda walaupun juga menyerang buah cabai pada stadium umur yang sudah lanjut.

Gejala serangan *Colletotrichum capsici* pada buah cabai ditandai dengan adanya bercak coklat kehitaman, lalu meluas menjadi busuk lunak. Pada bagian tengah bercak terdapat kumpulan titik – titik hitam yang terdiri dari *aservuli* dan *konidia*. Serangan berat dapat menyebabkan seluruh buah mengering dan mengerut, buah yang seharusnya berwarna merah berubah menjadi seperti jerami (Semangun, 1989).

Serangan *Colletotrichum gloeosporioides* pada buah terjadi pada fase buah masih hijau dengan gejala *die back* (Suhardi, 1989). Pada awalnya buah yang masih hijau maupun yang sudah matang terdapat bintik – bintik kecil berwarna kehitaman dan berlekuk. Tepi bintik berwarna kuning, membesar dan memanjang, pada bagian tengahnya semakin gelap dan dalam cuaca lembab jamur ini membentuk *aservuli* dalam lingkaran yang konsentris dengan masa spora berwarna merah jambu (Semangun, 1989).

Taksonomi kedua spesies *Colletotrichum* tersebut dapat dikelompokkan sebagai berikut :

Colletotrichum gloeosporioides

Kingdom	: Fungi
Divisio	: Thallophyta
Phylum	: Ascomycota
Klas	: Sordariomycetes
Ordo	: Incertae sedis
Famili	: Glomerellaceae
Genus	: <i>Colletotrichum</i>
Spesies	: <i>C. gloeosporioides</i>
Nama Lain	: <i>Glomerella cingulata</i> (Stoneman), <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Gloeosporium olivarum</i>
Keterangan	: <i>Glomerella cingulata</i> adalah spesies jamur memiliki sistem reproduksi secara seksual (<i>teleomorph</i>) sedangkan dengan tingkat aseksual (<i>anamorph</i>) disebut <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Anonim, 2010).

Sedangkan untuk *Colletotrichum capsici* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Fungi
Divisio	: Thallophyta
Phylum	: Ascomycota
Klas	: Sordariomycetes
Sub klas	: Phyllachorales
Ordo	: Incertae sedis
Famili	: Phyllachoraceae
Genus	: <i>Colletotrichum</i>
Spesies	: <i>C. Capsici</i>
Nama Lain	: <i>Colletotrichum capsici</i> (Syd.), <i>Steirochaete capsici</i> (Syd.), <i>Vermicularia capsici</i> (Syd.) (Anonim, 2010).

2.3. Senyawa Penyusun Dinding Sel Jamur

Senyawa kimia utama sekitar 80-90% yang menyusun dinding sel jamur adalah polisakarida, sedangkan protein dan lemak sekitar 10-20%. Komposisi senyawa kimia dinding sel tidak sama untuk semua jenis jamur. Pada umumnya dinding sel jamur terdiri atas selulosa dan kitin (Darnetty, 2005).

Dinding sel jamur berbeda dengan dinding sel tanaman namun hampir sama dengan dinding sel insekta. Beberapa fungsi dinding sel jamur adalah:

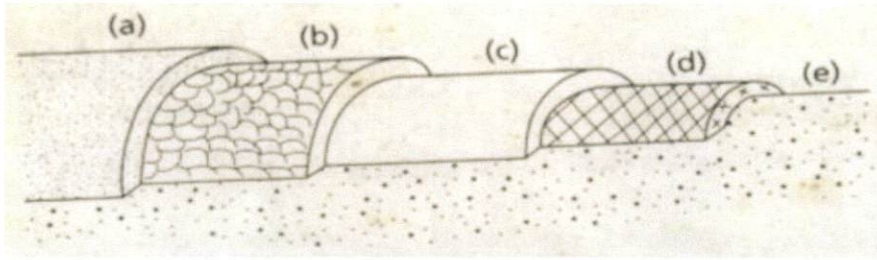
- Memberi bentuk hifa.
- Perlindungan terhadap terjadinya osmotic lysis
- Perlindungan terhadap metabolit (enzim litik) organisme lain dan radiasi UV.
- Merupakan tempat aktivitas sejumlah enzim
- Tempat pengaturan keluar masuknya molekul
- Mempunyai tempat ikat (*binding site*) sejumlah enzim. (Anonim, 2010)

Komposisi dinding sel tersusun atas dua komponen, yaitu:

- Komponen *fibrilar* → kitin, khitosan dan selulosa membentuk struktur mikrofibril.
- Komponen *amorf* (matriks) → R-glukans, S-glukans, mannan, protein (Anonim, 2010).

Taksonomi dan komposisi dinding sel jamur berdasarkan kelasnya, yaitu :

- ✓ *Oomycetes* pada umumnya dinding sel mengandung selulosa, glukana.
- ✓ *Chytridiomycetes* pada umumnya dinding sel mengandung kitin, glukana.
- ✓ *Zygomycetes* pada umumnya dinding sel mengandung khitosan, kitin.
- ✓ *Ascomycetes & deuteromycetes* pada umumnya dinding sel mengandung kitin, glukana.
- ✓ *Yeast ascomycetes* pada umumnya dinding sel mengandung mannan, glukana.
- ✓ *Yeast basidiomycetes* pada umumnya dinding sel mengandung mannan, kitin. (Anonim, 2010)



Gambar 1. Diagram arsitektur dinding sel pada bagian hifa dewasa dari *Neurospora crassa* (ascomycota).

(a) lapisan paling luar → β -glukan amorf/selulosa (b) jala-jala glikoprotein (c) lapisan protein (d) mikrofibril kitin yang dilapisi protein (e) plasmalemma (Anonim, 2010).

Selulosa, Kitin dan Modifikasinya

Selulosa adalah senyawa polisakarida struktural yang paling banyak terdapat di alam, seperti serabut, liat, tidak larut dalam air. Senyawa tersebut merupakan homopolisakarida linear tidak bercabang, terdiri dari 10.000 atau lebih unit D-glukosa yang dihubungkan oleh ikatan 1→4 glikosida yang berada dalam konfigurasi β atau dituliskan, ikatan $\beta(1\rightarrow4)$ (Lehninger, 1997).

Senyawa kitin adalah polimer linier dari N-asetil-D-glukosamin yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik $\beta(1\rightarrow4)$, senyawa polimer kedua terbesar di alam setelah selulosa merupakan komponen utama penyusun kulit anthropoda seperti udang, kepiting dan juga sebagai komponen dinding sel jamur, kapang dan bakteri (Suryanto, 2005). Kerangka kitin pada kulit hewan dan dinding sel jamur diliputi dan diperkeras oleh kalsium karbonat (Lehninger, 1997). Kadar kitin pada dinding sel fungi berkisar 22-44% (Patil *et al*, 1999 *cit* Suryanto, 2005).

Kitin mempunyai sifat-sifat yang unik seperti stabil di dalam larutan alkali yang pekat pada temperatur tinggi, dapat diproduksi kembali secara biologi di dalam, tidak beracun, dapat diproses menjadi tepung, serat, film serta mudah mengalami degradasi secara biologi atau dipengaruhi oleh faktor suhu dan waktu (Muzarelli, 1984).

Sifat utama kitin sangat sulit larut dalam air dan beberapa pelarut organik. Rendahnya reaktivitas kimia dan sangat hidrofobik, menyebabkan dinding sel organisme yang mengandung kitin sangat kuat melindungi isi di dalam sel. Kitin dapat larut dalam *N,N*-dimetilasetamida (DMAc) yang mengandung *lithium khlorida*. Reaksi pada kondisi heterogen menimbulkan beberapa permasalahan

termasuk tingkat reaksi yang rendah, kesulitan dalam *substitusi regioselektif*, ketidakseragaman struktur produk dan degradasi parsial disebabkan kondisi reaksi yang kuat (Yurnaliza, 2002).

Kebanyakan polisakarida yang terdapat di alam bersifat netral dan asam seperti selulosa, dekstran, peptin, asam alginat, agar, agarose dan carragenan sedangkan kitin dan kitosan adalah contoh polisakarida yang bersifat basa. Kitosan merupakan modifikasi dari kitin ter-*deasetilasi*, tidak larut dalam air tapi larut dalam pelarut asam dengan pH di bawah 6,0 membentuk larutan yang kental. Pelarut yang umum digunakan untuk melarutkan kitosan adalah asam asetat 1%, dengan pH sekitar 4,0 (Suryanto, 2005).

2.4. Bahan Genetik

DNA sebagai materi genetik berfungsi sebagai pembawa sifat pada suatu individu. DNA biasanya dalam bentuk helix ganda berbentuk polimer yang mengkode barisan residu asam amino dalam protein menggunakan kode genetik. Struktur dasar kimia DNA disusun oleh tiga senyawa utama yaitu senyawa gula yang mengandung lima buah unsur karbon membentuk struktur dioksiribosa, senyawa fosfat (PO_4^-) dan empat macam basa organik yang dapat digolongkan ke dalam dua macam yaitu *purin* dan *pirimidin* yang dihubungkan oleh ikatan hidrogen satu dengan lainnya. Senyawa purin terdiri *Adenin* (A), *Guanin* (G), *Sitosin* (C), *Timin* (T). Dalam struktur DNA, A selalu berikatan dengan T yang dihubungkan oleh dua ikatan hidrogen, sedangkan C selalu berikatan dengan G yang dihubungkan oleh tiga buah ikatan hidrogen. Berdasarkan struktur kimia ini, maka DNA yang lebih banyak mengandung senyawa G dan C akan lebih banyak membutuhkan energi untuk memisahkan formasi pita gandanya dibandingkan dengan A dan T (Jamsari, 2007).

2.5. Identifikasi Dengan Metode PCR

Dikembangkannya teknologi PCR (*Polymerase Chain Reaction*) oleh Karry Mullis (1983) *cit* Jamsari (2008) yang mampu menggandakan satu molekul DNA menjadi milyaran kali lipat dari jumlah molekul semula secara *in vitro*,

memberikan peluang untuk pengembangan suatu system diagnosis yang sensitif dan akurat.

PCR merupakan suatu reaksi *in vitro* untuk menggandakan jumlah molekul DNA pada target tertentu dengan cara mensintesis molekul DNA yang berkomplemen dengan molekul DNA tersebut dengan bantuan enzim dan oligonukleotida sebagai *primer* dalam suatu *thermocycler*. Enzim yang digunakan sebagai pencetak rangkaian molekul DNA baru dikenal sebagai enzim *polymerase*. Untuk dapat mencetak rangkaian tersebut dalam teknik PCR, diperlukan juga dNTPs yang mencakup dATP (nukleotida berbasis *Adenine*), dCTP (nukleotida berbasis *Cytosine*), dGTP (nukleotida berbasis *Guanine*) dan dTTP (nukleotida berbasis *Thymine*) (Muladno, 2002).

Prinsip identifikasi dengan menggunakan metode PCR adalah menggabungkan kemampuan *hibridisasi* yang dalam hal ini antara primer spesifik dengan sisi ikatan (*binding site*) yang terdapat pada DNA baru dengan bantuan enzim DNA *polymerase*. Meskipun hibridisasi hanya melibatkan 15-35 nukleotid yang berasal dari primer (oligonukleotid) namun spesifitas metode ini cukup dapat dipercaya, oleh karena kebanyakan sistem ini menggunakan sepasang primer yang didesain untuk memiliki tingkat spesifitas dengan menset parameter – parameter kondisi PCR tertentu yang dibutuhkan selama reaksi PCR (Jamsari, 2004).

Penggunaan metode PCR ini memiliki beberapa keunggulan dibandingkan dengan metode hibridisasi. Salah satu keunggulannya adalah tidak perlu menggunakan bahan radioaktif dalam proses hibridisasi. Namun, pendeteksian dengan metode PCR membutuhkan ketersediaan DNA murni yang mutlak harus disediakan dan waktu yang dibutuhkan dalam penggunaan metode PCR hanya satu hari (Jamsari, 2007).

2.6. Primer

Berdasarkan pasangan primer yang digunakan dalam teknik PCR, maka ada dua macam teknik PCR, yaitu (i) metode yang menggunakan sepasang primer, yaitu primer yang ditempatkan di awal dan di akhir unit transkripsi dimana primer tersebut sangat spesifik urutannya untuk menyambungkan dirinya dengan segmen DNA; dan (ii) metode yang menggunakan primer tunggal, yaitu primer yang

ditempatkan di awal unit transkripsi atau di akhir unit transkripsi. Metode PCR dengan primer tunggal, meliputi : AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* dan DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) maupun Amplifikasi dari DNA/VNTRs dan Retroposon. Persamaan dari ketiga teknik ini adalah adanya urutan acak dari primer, baik yang bekerja ke arah kanan maupun ke arah kiri dari sejumlah lokus. Perbedaan dari ketiga teknik tersebut terdapat pada panjang-pendeknya primer, dimana untuk AP-PCR sekitar 20 basa nukleotida, RAPD sekitar 10 basa nukleotida dan DAF sekitar 6-8 nukleotida. Dilaporkan bahwa hasil visualisasi dari AP-PCR dan RAPD relatif sama, sehingga orang lebih menyukai RAPD karena dengan ukuran primer yang lebih sedikit (~10 basa nukleotida) memberikan hasil yang tidak berbeda dengan AP-PCR yang memiliki ukuran primer lebih besar (~20 basa nukleotida). Sedangkan metode PCR dengan menggunakan sepasang primer, meliputi : STSs (*Sequence-Tagged Sites*) dan (SCARs) *Sequence Characterized Amplified Regions*, DALP (*Direct Amplification of Length Polymorphism*), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), IFLP (*Intron Fragment Length Polymorphism*), ESTs (*Expressed Sequence Tags*), RAMP (*Random Amplified Microsatellite Polymorphism*), REMAP (*Retroposon-Microsatellite Amplified Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) dan modifikasinya dan SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*) (Purwanta, 2010).

Primer yang berada sebelum daerah target disebut sebagai primer *forward* (F) dan yang berada setelah daerah target disebut primer *reverse* (R) (Muladno, 2002). Menurut Jamsari (2007), sebuah primer yang ideal adalah primer yang memiliki kriteria sebagai berikut :

- Memiliki panjang sekitar 15-35 nukleotid.
- Memiliki titik didih yang relatif tinggi.
- Sekuens primer hanya hadir satu kali pada templet DNA.
- Tidak berkomplementer dengan primer pasangannya
- Tidak membentuk struktur sekunder dengan primer pasangannya.
- Memiliki proporsi GC dan AT yang seimbang.
- Primer pasangannya memiliki titik didih yang relatif sama.

Pada suhu berkisar antara 50°C sampai dengan 60°C , primer *forward* yang runutan nukleotidanya berkomplemen dengan salah satu untai tunggal akan menempel pada posisi komplemennya, demikian juga primer *reverse*-nya akan menempel pada untai tunggal lainnya (Muladno, 2002). Primer yang berikatan dengan sisi ikat DNA template yang mengalami pemisahan untai tunggal dengan suatu proses disebut *annealing* (Jamsari, 2007). Setelah kedua primer tersebut menempel pada posisinya masing – masing, enzim polymerase mulai mensintesis molekul DNA baru yang dimulai dari ujung 3'-nya masing – masing primer. Sintesa molekul DNA baru ini terjadi pada suhu 72°C . Proses ini disebut sebagai *ekstensi*.



III. BAHAN DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan selama dua bulan mulai dari bulan Juli 2010 sampai dengan bulan Agustus 2010. Kegiatan penelitian dilaksanakan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian, Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang (Jadwal lengkap kegiatan penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1).

3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, isolat murni jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici* yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang dan isolat jamur hasil biakan dengan metode *Moist Chamber*, larutan 1 N HCl, larutan NaOH 60%, larutan asam asetat 1%, larutan Penisilin 0,5%, enzim *selulase* dan enzim *kitinase* diperoleh dari ekstraksi langsung dari bakteri *selulolitik* dan bakteri *khitinolitik*, isolat bakteri merupakan koleksi Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Universitas Andalas Padang, styrene-divinylbenzene resin mengandung kelompok asam iminodiasetat (Chelex 100), *Bromophenol Blue* (BPB) 1X, larutan *buffer Tris-Base Asam Borat EDTA* (TBE) 0,5X, larutan *Tris-EDTA* (TE) 1X, ethanol 70%, aquadest steril, RTG PCR Bead/Go Taq Green, ddH₂O *pro* PCR steril, Primer Cg1A1-FR (Cg1A1-F 5' TTACTGGAAGGTAACGCCGAG 3' dan Cg1A1-R 5' AGAAGGATGAGGCTGGCTGG 3'), Primer Cc7BP1-FR (Cc7BP1-F 5' ATGGTCAAGTTCTCGCGATAGC 3' dan Cc7BP1-R 5' GATGCCACGATCTCGCATCG 3'), Lambda DNA 50 ng/μL, 1 kb Ladder (1μg/μL), *agarose* dan Ethidium Bromide.

Alat yang digunakan adalah autoklaf, mesin PCR (Biometra-Jerman), perangkat gel elektroforesis, *microtitter plate*, mesin *microsentrifus*, *waterbath*, *microwave*, lemari asam, batang pengaduk, *beaker glass*, *erlenmeyer*, gelas ukur, *hot plate magnetic stirrer*, *tissue*, kertas label, kertas saring, tusuk gigi steril, pipet

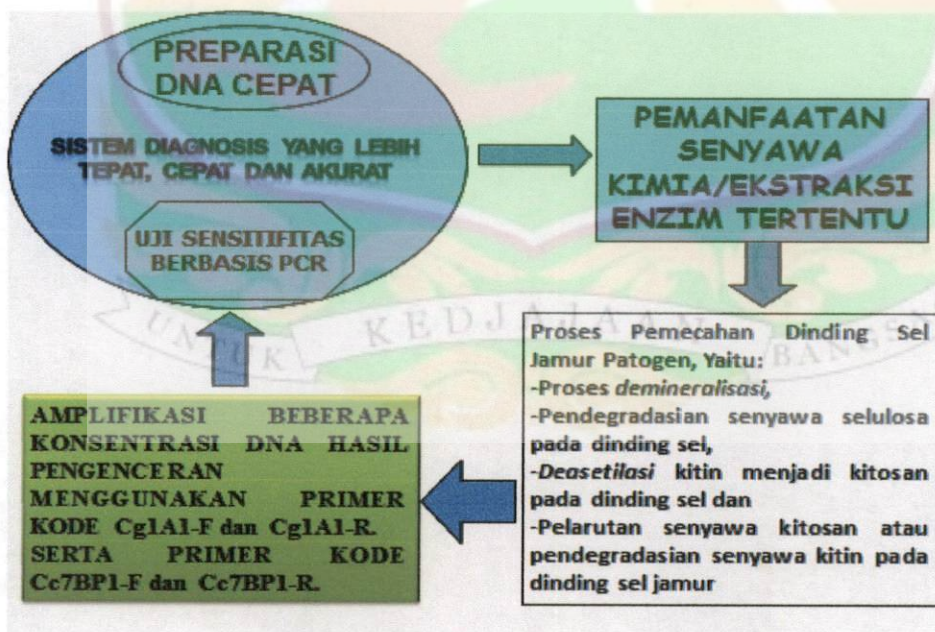
mikro, spatel, timbangan digital, tabung eppendorf 1,5 mL, pinset, gunting, petridish plastik steril, gunting, pisau *cutter*, objek *glass*, *cover glass*, mikroskop, botol semprot, aluminium foil, Botol 1 L, *microwave*, lemari pendingin dan perangkat *gel* dokumentasi sistem.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah metode deskriptif dan eksperimen. Metode deskriptif dilakukan pada saat mengidentifikasi jamur *Colletotrichum* sp. dengan mengamati karakteristik fragmen hasil proses amplifikasi menggunakan primer spesifik. Sedangkan metode eksperimen dilakukan pada saat preparasi DNA *Colletotrichum* sp dengan memanfaatkan senyawa kimia untuk memecah dinding sel jamur dan menguji sensitifitas diagnosis *Colletotrichum* sp. berbasis PCR dengan berbagai konsentrasi DNA yang digunakan.

3.4. Prosedur Kerja

Secara lengkap alur kegiatan kerja dalam penelitian ini dapat di lihat pada gambar berikut ini :



Gambar 2. Alur kegiatan kerja penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat gelas dicuci bersih dan dikeringkan, dibungkus dengan kertas perkamen, kertas saring dibungkus dengan plastik, pipet mikro diletakkan di dalam wadahnya ditutup rapat, tusuk gigi dimasukkan dalam *beaker glass* dan ditutup rapat, tabung eppendorf dimasukkan ke dalam *beaker glass* ditutup dengan aluminium foil, pinset dibungkus dengan aluminium foil, aquadest dimasukkan ke dalam botol 1 L. Semua alat dan bahan ini disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 15 psi dipertahankan selama 15 menit.

3.4.2. Pembiakan Jamur

Pembiakan jamur menggunakan metode *Moist Chamber* dari tanaman yang terserang jamur penyebab penyakit antraknosa.

Kulit buah dan benih cabe yang berjamur di bilas dengan air yang mengalir, selanjutnya di rendam dalam ethanol 70% selama 30 detik, kemudian di cuci dengan aquadest steril. Kertas saring dibasahkan dengan aquadest steril dan dimasukkan ke dalam petridish plastik. Potong bagian yang terserang jamur penyebab antraknosa dengan ukuran 1 cm² sebanyak 5 potong dan masukkan ke dalam petridish plastik yang telah berisi kertas saring yang telah dilembabkan. Inkubasi selama 2 hari pada temperatur kamar. Selanjutnya diidentifikasi penampakan morfologi jamur tersebut (Trisno dan Habazar, 2009).

3.4.3. Ekstraksi Enzim *Sellulase* dan *Kitinase* dari Bakteri

Ekstraksi enzim *sellulase* dengan cara mensentrifugasi kultur cair bakteri *sellulolitik* pada media CMC (*Carboxyl Metyl Cellulose*) cair dan ekstraksi enzim *kitinase* dengan cara mensentrifugasi kultur cair bakteri *khitinolitik* pada media kitin cair dengan kecepatan 6000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya supernatan tersebut dimasukkan ke tabung lainnya dan diberikan larutan ammonium sulfat dengan konsentrasi 80% b/v di inkubasi selama 15 menit pada suhu kamar dan disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4 °C, kemudian *pellet* yang dihasilkan diresuspensikan dengan 1 mL larutan Tris-HCl 10 mM pH 8.

3.4.4. Uji Preparasi DNA

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan protokol Promega USA (lihat lampiran 3) yang dimodifikasi dengan membagi tahapan preparasi DNA dalam tiga proses, yaitu : 1) demineralisasi, 2) pendegradasian senyawa selulosa pada dinding sel jamur dan 3) deasetilasi senyawa kitin pada dinding sel jamur. Material yang diisolasi adalah kulit buah dan benih cabai yang terserang jamur patogen penyebab antraknosa yang dibiakkan dengan metode *Moist Chamber* diatas, serta misellium jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici* koleksi isolat murni Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang (Kode Isolat UBC CG dan UBC CC). Perlakuan yang diberikan untuk uji preparasi DNA, yaitu:

- a. Penggunaan enzim *sellulase* yang dihasilkan dari ekstraksi bakteri *sellulolitik* untuk proses pendegradasian senyawa selulosa yang terkandung pada dinding sel jamur dan enzim *kitinase* yang dihasilkan dari ekstraksi bakteri *khitinolitik* untuk proses pendegradasian senyawa kitin yang terkandung pada dinding sel jamur sehingga memudahkan proses isolasi DNA.
- b. Penggunaan senyawa kimia dalam proses demineralisasi menggunakan larutan asam klorida untuk melepaskan ikatan logam yang mengikat kuat dinding sel jamur dengan larutan HCl, proses pendegradasian senyawa selulosa yang terkandung pada dinding sel jamur dengan menggunakan larutan senyawa antibiotik, proses deasetilasi kitin menjadi kitosan menggunakan larutan natrium hidroksida dan pelarutan kitosan menggunakan larutan asam asetat sehingga memudahkan proses isolasi DNA.

Misellium jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici* masing-masing dimasukkan kedalam tabung eppendorf 1,5 mL. Proses demineralisasi, dilakukan dengan penambahan 150 μ L larutan HCl 1 N, di vorteks selama 1 menit, larutan dibuang dan dibilas dengan aquadest steril. Untuk proses pendegradasian senyawa selulosa pada dinding sel jamur digunakan larutan enzim

sellulase sebanyak 500 μL yang diekstrak dari bakteri *sellulolitik* atau menggunakan larutan senyawa antibiotik spektrum luas penicillin dengan konsentrasi 0,5% sebanyak 500 μL , divorteks selama 2 menit untuk menghancurkan selulosa, larutan dibuang dan dibilas dengan aquadest steril.

Proses deasetilasi kitin dapat menggunakan enzim *kitinase* sebanyak 500 μL yang di ekstraksi dari bakteri *khitinolitik* atau menggunakan senyawa kimia untuk pendeasetilasian senyawa kitin menjadi kitosan pada dinding sel jamur. Sebanyak 150 μL larutan NaOH 60%, dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 2 mL, divorteks 10 detik untuk pencampuran, lalu dipanaskan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15 menit. Larutan dibuang dan bilas dengan aquadest steril. Untuk proses pelarutan senyawa kitosan tersebut diberikan 1 mL larutan asam asetat 1%, divorteks selama 5 menit. Maka, dengan pelarutan senyawa kitosan tersebut diharapkan isi sel jamur dan DNA akan keluar dalam bentuk endapan *pellet*. Potongan kulit buah atau benih atau sisa misellium dibuang dari larutan dengan menggunakan tusuk gigi steril, selanjutnya larutan di sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.

Selanjutnya diberikan 250 μL larutan Chelex 100 untuk mengikat DNA yang terdapat pada pellet, dengan menginkubasi pada suhu 100°C selama 10 menit lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 menit, diambil *supernatant*, maka diperoleh DNA masing-masing jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici*.

Visualisasi hasil isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan teknik elektroforesis. Lambda DNA 50 ng/ μL digunakan sebagai acuan untuk menentukan kuantitas DNA hasil isolasi yang di *loading* pada tepi sumur *gel* sebelah kiri. Sebelum elektroforesis, hal pertama yang harus dilakukan adalah membentuk *cocktail* sampel yang terdiri dari 7 μL TE, 2 μL DNA, 1 μL Bromophenol Blue dengan menggunakan *microtitter plate* sebagai tempat untuk membuat *cocktail*. Elektroforesis dilakukan dengan menggunakan tegangan 100 Volt selama 60 menit dengan konsentrasi *gel agarose* 1%. Pewarnaan DNA dilakukan dengan menambahkan Ethidium Bromide setelah *gel* dipanaskan dengan *microwave*.

3.4.5. Amplifikasi DNA Dalam Menguji Sensitifitas Diagnosis *Colletotrichum* sp dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1- FR dan Kode Cc7BP1-FR

Diketahuinya konsentrasi DNA hasil isolasi di atas maka, untuk analisis selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 3 kali untuk setiap konsentrasinya dengan menggunakan pelarut DNA *Tris*-EDTA (TE) 1X dengan konsentrasi akhir masing-masing DNA sebagai berikut:

- a. 10 ng / μ L,
- b. 1 ng / μ L,
- c. 100 pg/ μ L,
- d. 10 pg/ μ L,
- e. 1 pg/ μ L,
- f. 100 fg/ μ L,
- g. 10 fg/ μ L,
- h. 1 fg/ μ L.

Total larutan DNA yang akan diamplifikasi sebanyak 25 μ L, dengan komposisi *Go Taq Green* sebanyak 12,5 μ L, DNA-*template* (beberapa konsentrasi) sebanyak 3 μ L, primer *forward* dan *reverse* (konsentrasi: 10 pikomol/ μ L) sebanyak 3 μ L, dd-H₂O *pro* PCR sebanyak 6,5 μ L.

Reaksi amplifikasi dilaksanakan dengan menggunakan mesin PCR (Biometra-Jerman). Kondisi PCR yang digunakan diatur sedemikian rupa dengan siklus reaksi utama yang terdiri dari denaturasi, annealing dan ekstensi.

Uji sensitifitas diagnosis *Colletotrichum gloeosporioides* menggunakan primer spesifik kode Cg1A1-FR serta digunakan program CG SPEC1 (Hidayat, 2010) dengan kondisi PCR sebagai berikut:

Denaturasi awal	: 95 °C selama 5 menit	
Denaturasi	: 94 °C selama 1 menit	} 30 siklus
Annealing	: 57 °C selama 1 menit	
Ekstensi	: 72 °C selama 1 menit	
Final ekstensi	: 72 °C selama 5 menit	
Pause	: 4 °C	∞

Untuk uji sensitifitas diagnosis *Colletotrichum capsici* dengan primer spesifik kode Cc7BP1-FR digunakan program CC SPEC1 (Hidayat, 2010) dengan kondisi PCR sebagai berikut:

Denaturasi awal	: 94 °C selama 3 menit	
Denaturasi	: 94 °C selama 1 menit	} 30 siklus
Annealing	: 62 °C selama 1 menit	
Ekstensi	: 72 °C selama 1 menit	
Final ekstensi	: 72 °C selama 5 menit	
Pause	: 4 °C ∞	

Hasil amplifikasi diamati menggunakan gel electrophoresis dengan konsentrasi 3%, menggunakan tegangan listrik 100 volt selama 30-45 menit. Proses amplifikasi dikatakan berhasil apabila dalam satu slot blok gel terlihat satu pita DNA atau satu fragmen yang ukurannya jelas, mudah diskoring kemudian ukuran panjang produk hasil amplifikasi dapat dibandingkan dengan marker (1 kb ladder).

Penentuan tingkat sensitifitas primer dalam mendeteksi keberadaan jamur patogen penyebab penyakit antraknosa berdasarkan jumlah berbagai konsentrasi larutan DNA dilihat dari produk amplifikasi yang dihasilkan dan ukuran produk amplifikasi sesuai dengan kriteria masing-masing primer. Untuk primer Cg1A1 panjang produk hasil amplifikasi adalah 394 bp sedangkan untuk primer Cc7BP1 panjang produk hasil amplifikasi adalah 312 bp.

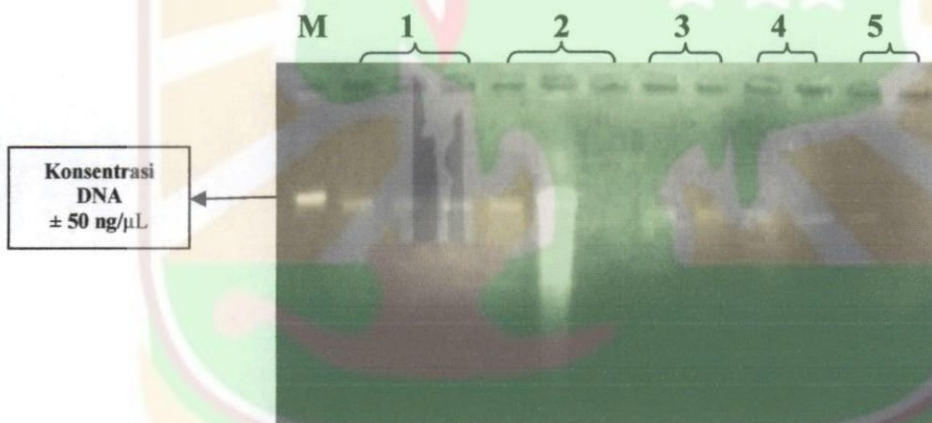
3.5. Analisis Data

Analisis data pada uji preparasi DNA dilakukan dengan menghitung rata-rata keberhasilan metode preparasi yang digunakan serta melihat jumlah konsentrasi DNA yang diperoleh. Untuk uji sensitifitas dilakukan dengan melihat keberhasilan produk amplifikasi yang sesuai dengan ukuran yang diharapkan dari tiap pengenceran berbagai konsentrasi DNA tersebut.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Preparasi DNA

Material yang digunakan dalam percobaan berbagai metode isolasi DNA adalah kulit buah dan benih cabai yang terserang jamur patogen penyebab antraknosa. Material tersebut dibiakkan dengan metode *Moist Chamber*, serta misellium jamur *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici* dan koleksi isolat murni Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Visualisasi elektroforesis hasil percobaan preparasi DNA menunjukkan bahwa DNA yang diisolasi memiliki konsentrasi dan kualitas yang bervariasi (Gambar 3).



Gambar 3. Visualisasi hasil elektroforesis isolasi DNA genom jamur *Colletotrichum* sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat.

M = Lambda DNA 50 ng/ μ L (marker) sebanyak 1 μ L, 1 = Kg (Isolasi DNA dari hifa isolat *C. gloeosporioides* dengan menggunakan *protocol kit* PROMEGA USA), 2 = Kc (Isolasi DNA dari hifa isolat *C. capsici* dengan menggunakan *protocol kit* PROMEGA USA), 3 = Eb (Isolasi DNA dari benih yang terserang antraknosa dengan menggunakan enzim kasar *selulase* dan *kitinase*), 4 = Rg (Isolasi DNA dari hifa isolat *C. gloeosporioides* dengan menggunakan larutan senyawa kimia HCl, antibiotik penicillin dan NaOH), 5 = Rc (Isolasi DNA dari hifa isolat *C. capsici* dengan menggunakan larutan senyawa kimia HCl, antibiotik penicillin dan NaOH).

Gambar 3 tersebut menunjukkan terdapatnya perbedaan konsentrasi DNA hasil isolasi dengan menggunakan berbagai macam senyawa kimia HCl, antibiotik penicillin dan NaOH antara isolasi DNA *Colletotrichum gloeosporioides* dengan isolasi DNA *Colletotrichum capsici*. Hal tersebut dapat terjadi karena adanya perbedaan komposisi maupun jumlah senyawa kimia penyusun dinding sel kedua jamur tersebut.

Gambar 3 tersebut juga dapat diduga masih kurang efektifnya konsentrasi larutan senyawa kimia yang digunakan sebagai perlakuan untuk menghancurkan dinding sel jamur *Colletotrichum capsici* dalam mengisolasi DNA jamur tersebut, dimana dalam penelitian ini konsentrasi larutan senyawa kimia yang digunakan adalah 150 μ L larutan HCl 1 N (dalam proses demineralisasi), 500 μ L larutan antibiotik penicillin 0,5 % (dalam proses degradasi selulosa) dan 150 μ L larutan NaOH 60 % (dalam proses deasetilasi kitin).

Senyawa kimia utama yang menyusun dinding sel jamur adalah polisakarida sekitar 80-90%, sedangkan protein dan lemak sekitar 10-20%. Komposisi senyawa kimia dinding sel tidak sama untuk semua jenis jamur. Pada umumnya dinding sel jamur terdiri atas selulosa dan kitin (Darnetty, 2005).

Hasil isolasi DNA yang berasal dari material hifa jamur tersebut menunjukkan konsentrasi dan kualitas DNA yang bervariasi dengan membandingkan intensitas hasil isolasi DNA dengan intensitas lambda DNA 50 ng/ μ L maka diperoleh konsentrasi yang bervariasi dari tiap perlakuan (Tabel 1).

Variasi konsentrasi hasil isolasi DNA yang diperoleh juga banyak dipengaruhi oleh teknik ekstraksi yang digunakan, pengalaman dan tingkat keterampilan dalam menangani proses ekstraksi tersebut (Pabendon, 2004).

Waktu yang dibutuhkan dalam preparasi DNA dengan menggunakan protokol kit PROMEGA sekitar 2 jam 50 menit dan 15 menit untuk proses elektroforesis, namun dalam pelaksanaannya membutuhkan biaya yang mahal dengan harga sekitar 3 juta rupiah. Sedangkan penggunaan metode enzimatik sangat mudah dan hanya membutuhkan waktu sekitar 30 menit ditambah 15 menit untuk elektroforesis. Namun dalam proses mengekstraksi enzim yang berasal dari bakteri membutuhkan waktu yang lama sekitar 7 hari.

Tabel 1. Konsentrasi yang diperoleh dari hasil isolasi DNA genom jamur *Colletotrichum* sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat dengan menggunakan marker lambda DNA 50 ng/ μ L.

No.	Sampel	Konsentrasi (ng/ μ L)
1.	Kg1	25
2.	Kg2	6,25
3.	Kg3	12,5
	Rata-rata	14,583
4.	Kc1	25
5.	Kc2	150
6.	Kc3	-
	Rata-rata	58,333
7.	Eb1	6,25
8.	Eb2	6,25
	Rata-rata	6,25
9.	Rg1	6,25
10.	Rg2	6,25
	Rata-rata	6,25
11.	Rc1	3,125
12.	Rc2	-
	Rata-rata	1,563

Ekstraksi enzim *sellulase* dilakukan dengan cara mensentrifugasi kultur cair bakteri *sellulolitik* pada media CMC (*Carboxyl Metyl Cellulose*) cair (dibiakkan selama 2 hari, antara lain 1 hari kultur *starter* dan 1 hari kultur produksi enzim oleh bakteri *sellulolitik*) dan ekstraksi enzim *kitinase* dengan cara mensentrifugasi kultur cair bakteri *khitinolitik* pada media kitin cair (dibiakkan selama 5 hari, antara lain 1 hari kultur *starter* dan 4 hari kultur produksi enzim oleh bakteri *khitinolitik*). Untuk metode preparasi DNA yang menggunakan senyawa kimia 150 μ L larutan HCl 1 N (dalam proses demineralisasi), 500 μ L larutan antibiotik penicillin 0,5 % (dalam proses degradasi selulosa) dan 150 μ L larutan NaOH 60 % (dalam proses deasetilasi kitin), membutuhkan waktu sekitar 45 menit ditambah 15 menit untuk elektroforesis dan biayanya murah daripada kedua metode di atas. Isolasi menggunakan protokol kit PROMEGA lebih baik namun penggunaannya lebih mahal maka dapat digunakan alternatif lainnya dalam preparasi DNA dengan menggunakan enzim kasar *sellulase* dan *kitinase*

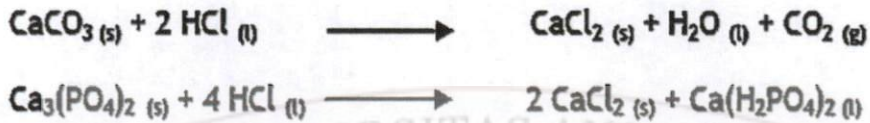
dalam mengisolasi DNA jamur *Colletotrichum* sp, sedangkan penggunaan senyawa kimia tertentu kurang efektif dalam preparasi DNA walaupun dalam aplikasinya biaya yang dibutuhkan murah, hal ini dapat di lihat dari kuantitas DNA yang dihasilkan serta produk PCR yang dihasilkan.

Selama ini pendekatan molekuler untuk mendeteksi jamur patogen penyebab antraknosa pada tanaman cabai yakni *Colletotrichum* sp dengan PCR di Indonesia masih menggunakan teknik yang bersifat konvensional. Membutuhkan waktu yang relatif lama dan biaya yang mahal karena bertumpu pada protokol ekstraksi DNA yang bersifat universal maupun fasilitas *kit* yang beredar di pasaran. Demikian, apabila diterapkan untuk mendeteksi langsung benih atau bibit yang digunakan oleh petani dengan teknik molekuler biasa akan lambat mendeteksi potensi serangan penyakit serta membutuhkan biaya yang relatif mahal. Prinsip utama yang harus dipenuhi adalah kemampuan untuk mengidentifikasi kehadiran molekul-molekul DNA jamur patogen penyebab penyakit antraknosa pada tahap sedini mungkin meskipun populasi patogen di dalam salah satu bagian tanaman masih dalam jumlah yang sangat sedikit (Jamsari, 2008). Oleh karena itu dalam penelitian ini telah dicoba preparasi DNA yang cepat, murah dan menguji tingkat sensitifitas diagnosis *Colletotrichum* sp berbasis PCR.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan protokol Promega USA (Lampiran 3) yang dimodifikasi dengan membagi tahapan preparasi DNA dalam tiga proses, yaitu : 1) demineralisasi, 2) pendegradasian senyawa selulosa pada dinding sel jamur dan 3) deasetilasi senyawa kitin pada dinding sel jamur.

Proses demineralisasi adalah proses pembebasan senyawa anorganik/mineral yang mengikat kuat dinding sel jamur sehingga dapat menghambat pelepasan material genetik yang terkandung dalam sel jamur tersebut. Oleh karena itu, diperlukan senyawa kimia HCl 1 N sebanyak 150 μ L yang dapat melarutkan senyawa CaCO_3 maupun $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang terdapat pada dinding sel jamur sekaligus membantu proses deasetilasi kitin pada jamur sehingga dinding sel jamur tersebut dapat rusak serta dengan mudah mengisolasi material genetik jamur tersebut. Menurut Knorr (1984) *cit* Hendri (2008) mineral CaCO_3 dan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ lebih mudah dipisahkan dibandingkan protein karena

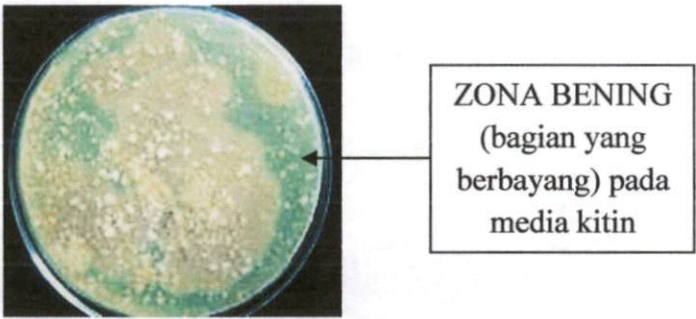
garam anorganik ini dapat dihilangkan dari senyawa kitin dengan menggunakan HCl. Asam klorida efektif untuk melarutkan kalsium menjadi kalsium klorida, namun asam klorida juga dapat menyebabkan kitin mengalami depolimerisasi (Austin, 1981 dan Shimara, 1988 *cit* Hendri, 2008).



Gambar 4. Reaksi demineralisasi pada dinding sel jamur (Hendri, 2008).

Pendegradasian senyawa selulosa dinding sel jamur dapat menggunakan senyawa antibiotik spektrum luas penicillin dengan konsentrasi 0,5% sebanyak 500 μL . Mekanisme kerja antibiotik penicillin dapat merusak dinding sel organisme yang mengandung selulosa sehingga dinding sel tidak lagi permeable dan terbentuk pori-pori yang besar pada dinding sel tersebut (Lehninger, 1997). Namun, alternatif lain dapat menggunakan enzim kasar *selulase* sebanyak 500 μL , enzim tersebut telah di ekstrak dari bakteri termofilik sehingga dalam pengaplikasiannya dibutuhkan suhu yang sesuai agar enzim tersebut dapat bekerja dengan optimal, dalam hal ini suhu yang dipakai adalah suhu 65°C . Mekanisme kerja enzim dapat menghidrolisis atau memotong ikatan kimia yang lemah maupun yang kuat, mempercepat dan memperlambat reaksi, disebut juga katalisator sedangkan enzim yang berasal dari organisme disebut biokatalisator (Lehninger, 1997).

Proses deasetilasi senyawa kitin pada dinding sel jamur adalah merubah bentuk kitin yang sifatnya sangat sukar larut dalam pelarut air, asam maupun basa menjadi kitosan yang dapat larut dalam larutan asam asetat pH 4,0, sehingga mempermudah proses isolasi DNA. Untuk pendeasetilasian kitin menggunakan perpaduan reaksi kimia dan reaksi fisika seperti senyawa NaOH 60% dan proses pemanasan dengan suhu dan tekanan tinggi (*autoclave*). Namun, dapat juga menggunakan enzim kasar *kitinase* yang akan menghasilkan zona bening pada media kitin padat, dimana zona bening tersebut adalah aktifitas dari enzim dalam melarutkan kitin (Gambar 5).



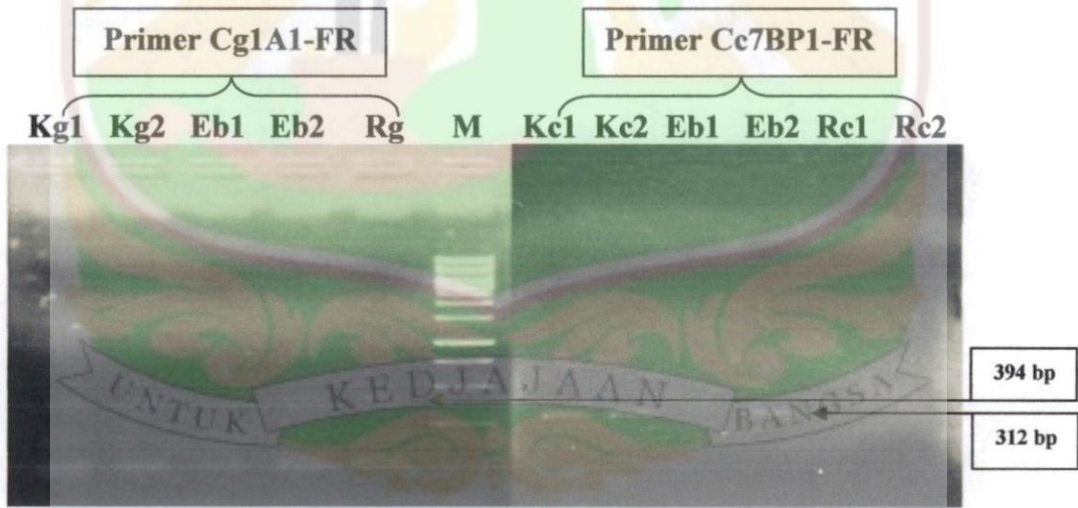
Gambar 5. Uji aktifitas enzim kitinase pada media padat



Gambar 6. Reaksi deasetilasi kitin menjadi kitosan (Kaban, 2007)

4.2. Studi Keberhasilan Teknik PCR Terhadap Hasil Preparasi DNA

Colletotrichum sp



Gambar 7. Visualisasi produk PCR hasil preparasi DNA *Colletotrichum* sp berbagai perlakuan dengan tujuan preparasi DNA cepat.
M. 1 Kb Ladder dari Fermentas sebanyak 7 μ L (marker), **Kg1.** Terdapat produk, **Kg2.** Terdapat produk, **Kc1.** Terdapat produk, **Kc2.** Terdapat produk, **Eb.** Pada amplifikasi dengan kode primer Cg1A1-FR terdapat produk pada Eb1 maupun Eb2, selanjutnya amplifikasi dengan kode primer Cc7BP1-FR pada Eb1 tidak terdapat produk namun pada Eb2 terdapat produk, **Rg.** Terdapat produk, **Rc.** Tidak terdapat produk baik pada Rc1 maupun Rc2.

DNA hasil preparasi secara cepat dari percobaan sebelumnya diuji dengan menggunakan teknik PCR. PCR dilakukan menggunakan *Go Taq Green* 12,5 μL , volume DNA *template* masing-masingnya 3 μL (konsentrasi 5ng/ μL), volume primer spesifik (konsentrasi 10 pmol/ μL) sebanyak 3 μL , volume ddH₂O 6,5 μL sehingga total volume masing-masing tabung sebanyak 25 μL .

Hasil isolasi yang tidak menunjukkan adanya fragmen DNA, telah dicoba untuk diamplifikasi dengan mesin PCR seperti kode perlakuan Kc3 dan Rc2 namun memang tidak terdapat fragmen hasil amplifikasi (Gambar 7). Namun dapat juga dipengaruhi oleh beberapa molekul DNA hasil isolasi yang berkonsentrasi kecil sehingga hasil amplifikasi tidak terdeteksi karena hilangnya molekul DNA hasil isolasi yang berkonsentrasi kecil saat dielektroforesis dapat disebabkan tidak terdapatnya binding site antara primer spesifik dengan DNA target dan juga di duga karena penggunaan konsentrasi gel agarose yang belum tepat.

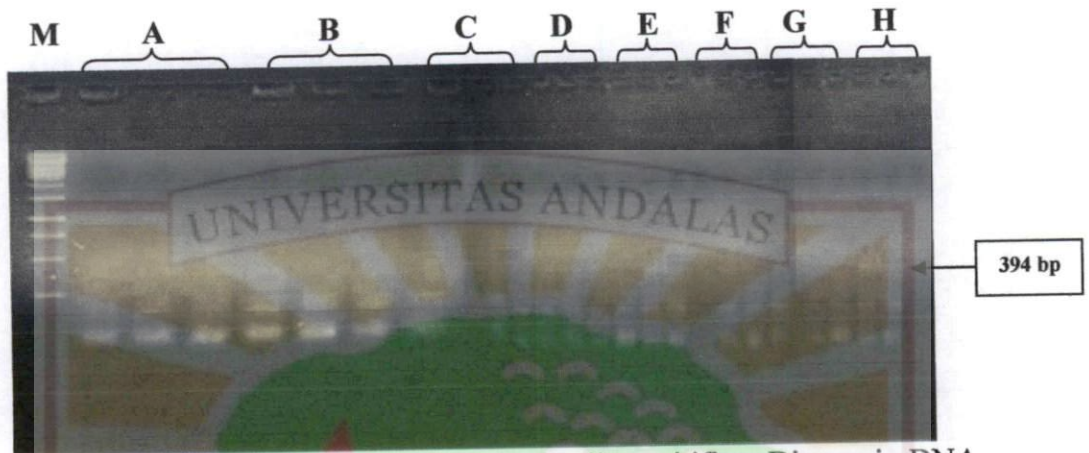
Penggunaan gel agarose dalam mengamplifikasi hasil isolasi DNA dalam penelitian ini hanya sebanyak 1% (b/v). Penggunaan gel agarose yang berkonsentrasi rendah mengakibatkan pori-pori agarose hanya efektif dilewati molekul DNA berukuran besar sehingga migrasi molekul DNA menjadi cepat, namun sebaliknya penggunaan gel agarose yang berkonsentrasi tinggi mengakibatkan pori-pori agarose yang dilewati molekul DNA berukuran kecil dan rapat maka migrasi DNA menjadi lambat (Jamsari, 2008). Oleh karena itu, dalam penelitian ini telah dilakukan kegiatan uji sensitifitas diagnosis *Colletotrichum* sp berbasis PCR.

4.3. Amplifikasi DNA Dalam Menguji Sensitifitas Diagnosis *Colletotrichum* sp Dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR dan Kode Cc7BP1-FR

4.3.1. Uji Sensitifitas Diagnosis *Colletotrichum gloeosporioides* dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR

Uji sensitifitas dengan primer spesifik kode Cg1A1-FR menggunakan program PCR CG SPEC1 (Hidayat, 2010). Uji sensitifitas diagnosis tersebut menggunakan DNA *Colletotrichum gloeosporioides*

hasil pengenceran dari konsentrasi awal 250 ng/ μ L yang berasal dari koleksi isolat Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian dengan kode isolat D1.1 (Illahi, 2010).



Gambar 8. Visualisasi produk PCR hasil uji sensitifitas Diagnosis DNA *Colletotrichum gloeosporioides* dengan Primer Spesifik Kode Cg1A1-FR.

Elektroforesis menggunakan agarose 3% (b/v). M= marker 1 kb leader, A = 10 ng/ μ L, B = 1 ng/ μ L, C = 100 pg/ μ L, D = 10 pg/ μ L, E = 1 pg/ μ L, F = 100 fg/ μ L, G = 10 fg/ μ L dan H = 1 fg/ μ L, pengenceran tersebut diulang tiga kali.

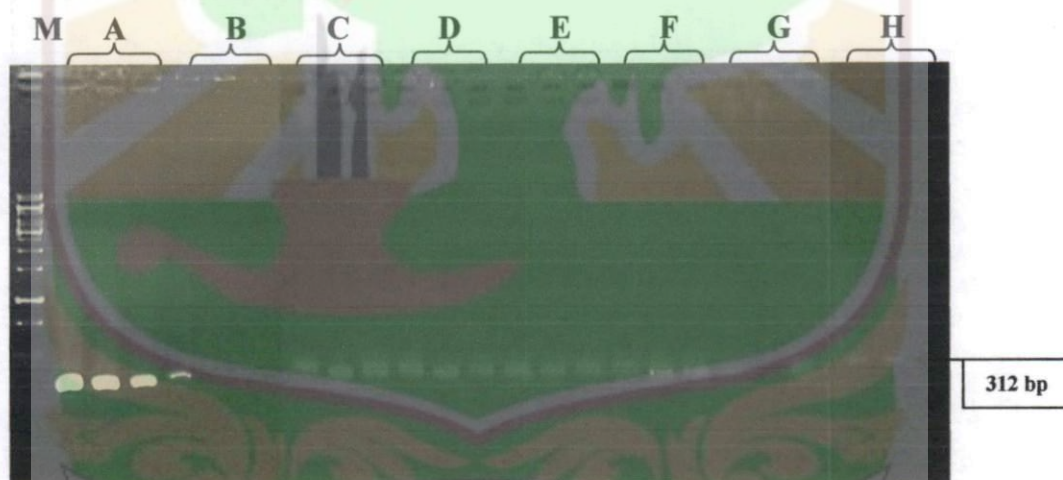
Hasil amplifikasi tersebut dapat diketahui bahwa hampir setiap pengenceran sejumlah konsentrasi DNA dapat dinyatakan terdapat produk yang menunjukkan sensitifitas primer spesifik kode Cg1A1-FR dalam mengamplifikasi DNA *Colletotrichum gloeosporioides* dengan konsentrasi hingga 1 fg/ μ L, kemungkinan primer tersebut juga dapat mengamplifikasi DNA di bawah konsentrasi 1 fg/ μ L. Adapun faktor keberhasilan dipengaruhi juga konsentrasi agarose yang digunakan. Konsentrasi agarose yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3% (b/v) sehingga migrasi molekul DNA saat dielektroforesis dapat berjalan lambat.

Gambar 8, dapat di lihat bahwa hasil amplifikasi DNA jamur *C. gloeosporioides* menggunakan primer kode Cg1A1-FR menghasilkan produk amplifikasi dengan ukuran fragmen utama yakni $\pm$ 394 bp, namun fragmen utama memiliki intensitas yang rendah.

Jumlah fragmen yang dihasilkan tergantung kepada banyaknya situs penempelan primer dengan cetakan DNA yang digunakan. Bervariasinya intensitas fragmen DNA hasil amplifikasi ini disebabkan oleh tingkat kemurnian DNA yang tidak sama, jumlah *copy* gen atau afinitas primer dengan templet yang berbeda-beda (Mollah *et al.*, 2004).

4.3.2. Uji Sensitifitas Diagnosis *Colletotrichum capsici* dengan Primer Spesifik Kode Cc7BP1-FR

Uji sensitifitas dengan primer spesifik kode Cc7BP1-FR menggunakan program CC SPEC1 (Hidayat, 2010). Uji sensitifitas diagnosis tersebut menggunakan DNA *Colletotrichum capsici* yang berasal dari koleksi Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Fakultas Pertanian dengan kode isolat A1.1 (Illahi, 2010) yang memiliki konsentrasi awal 50 ng/ μ L, dilakukan pengenceran sebagaimana diuraikan dalam Bahan dan Metode.



Gambar 9. Visualisasi produk PCR hasil uji sensitifitas Diagnosis DNA *Colletotrichum capsici* dengan Primer Spesifik Kode Cc7BP1-FR.

Elektroforesis menggunakan agarose 3% (b/v). M= marker 1 kb leader, A = 10 ng/ μ L, B = 1 ng/ μ L, C = 100 pg/ μ L, D = 10 pg/ μ L, E = 1 pg/ μ L, F = 100 fg/ μ L, G = 10 fg/ μ L dan H = 1 fg/ μ L, pengenceran tersebut diulang tiga kali.

Hasil visualisasi amplifikasi dari uji sensitifitas DNA *Colletotrichum capsici* tersebut juga diketahui bahwa hampir setiap pengenceran sejumlah konsentrasi DNA dapat dinyatakan terdapat produk

yang menunjukkan sensitifitas primer spesifik kode Cc7BP1-FR dalam mengamplifikasi DNA *Colletotrichum capsici* dengan konsentrasi hingga 1 fg/ μ L dengan ukuran panjang produk 312 bp, kemungkinan besar primer tersebut juga dapat mengamplifikasi DNA di bawah konsentrasi 1 fg/ μ L. Menurut Sudrajat (2000), sensitivitas berbasis PCR dipengaruhi oleh adanya kontaminan dalam proses isolasi DNA sampel dan juga kondisi reaksi PCR seperti banyaknya siklus yang digunakan.

Gambar 9, dapat dilihat bahwa hasil amplifikasi DNA jamur *C. capsici* menggunakan primer kode Cc7BP1-FR menghasilkan produk amplifikasi dengan intensitas fragmen yang bervariasi. Konsentrasi DNA *template* yang rendah diyakini menyebabkan intensitas yang redup sehingga pola pita yang dihasilkan dapat terlihat redup.

Metode deteksi yang cepat, akurat serta memiliki sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi untuk mendeteksi DNA *Colletotrichum* sp, baik yang berasal dari kultur isolat murni maupun potongan jaringan buah dan benih yang terinfeksi antraknosa telah dikembangkan dalam penelitian ini. Produk hasil amplifikasi yang dihasilkan dengan menggunakan primer kode Cg1A1-FR sebesar 394 bp sedangkan primer kode Cc7BP1-FR sebesar 312 bp yang didesain dari gen penciri patogenisitas spesies *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Colletotrichum capsici* (Jamsari, 2009).

Hasil tersebut menunjukkan bahwa penggunaan teknik PCR dengan primer spesifik Cg1A1-FR dan Cc7BP1-FR memiliki spesifisitas yang tinggi bila dibandingkan dengan teknik lainnya seperti *macro array* maupun *micro array system* yang merupakan identifikasi DNA menggunakan probe spesifik dan teknik serologi yang telah dikembangkan sebelumnya. Teknik *macro array* maupun *micro array system* memerlukan biaya yang relatif mahal dan membutuhkan waktu yang lama.

Macro array maupun *micro array system* merupakan sistem yang dapat mengidentifikasi mikroorganisme mulai dari tingkat spesies hingga tingkat subspecies mikroorganisme dengan metode hibridisasi dan

penggunaan bahan radioaktif untuk mendeteksi sinyal keberadaan mikroorganisme tersebut (Zhang, *et al*, 2008).

Metode identifikasi molekul segmen DNA target yang pertama sekali dikembangkan dan banyak dipergunakan adalah dengan menggunakan probe spesifik (Jamsari, 2007). Probe dalam hal ini adalah segmen sekuens DNA yang telah diketahui identitasnya baik sumber asalnya, panjangnya, maupun fungsi serta karakter-karakter spesifik lainnya. Prinsip penggunaan probe sebagai salah satu metode identifikasi adalah melalui mekanisme hibridisasi asam nukleat. Kemampuan untuk berhibridisasi tidak lain disebabkan oleh adanya homologi pasangan basa antara sekuens DNA yang berasal dari probe dengan sekuens DNA yang akan diidentifikasi yang sifatnya masih anonim. Tingkat homologi antara probe dengan DNA yang akan dianalisis bersifat relatif, dari mulai di atas 60% sampai 100%. Dengan melabel basa-basa nitrogen tertentu pada probe (biasanya T dan C) dengan senyawa radioisotop (^{32}P) ataupun senyawa-senyawa berpendar lainnya pada gugus ikatan pospatnya, maka tingkat homologi antara probe dengan DNA yang dianalisis dapat dideteksi dengan menggunakan intensitas sinyal yang diperlihatkan oleh *autoradiogram* film rontgen maupun plat-plat sensitif terhadap radiasi lainnya (Jamsari, 2007).

Penggunaan metode PCR memang menjanjikan kemudahan dan kenyamanan dibandingkan dengan metode hibridisasi. Suatu keunggulan yang secara nyata dapat dibandingkan adalah tidak perlunya penggunaan bahan radioaktif dalam proses hibridisasi, meskipun deteksi dengan bahan berpendar non radioaktif saat ini sudah tersedia secara komersial, akan tetapi langkah-langkah yang harus ditempuh juga cukup panjang (Jamsari, 2007).

Teknik serologi merupakan teknik penggunaan antibodi poliklonal patogen yang telah diketahui yang akan menunjukkan reaksi silang dengan patogen yang akan diuji, namun kelemahan teknik ini waktu dan biaya yang dibutuhkan sangat tidak efisien (Khaeruni, *et al*, 2007).

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilaksanakan, dapat ditarik kesimpulan bahwa :

1. Preparasi DNA tercepat untuk keperluan diagnosis *Colletotrichum* sp berbasis PCR adalah metode enzimatis yang membutuhkan waktu sekitar 30 menit.
2. Sensitifitas dari primer spesifik kode Cg1A1-FR dan primer spesifik Cc7BP1-FR masing-masingnya adalah 1 fg/ μ L.

5.2. Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka penulis menyarankan :

Dilakukannya penelitian lanjutan mengenai penggunaan beberapa konsentrasi larutan senyawa kimia HCl, antibiotik spektrum luas lainnya dan NaOH untuk preparasi DNA *Colletotrichum capsici* berbasis PCR serta pengujian sensitifitas lanjutan diagnosis *Colletotrichum* sp dengan konsentrasi DNA rendah dari 1 fg/ μ L yang berbasis PCR.

DAFTAR PUSTAKA

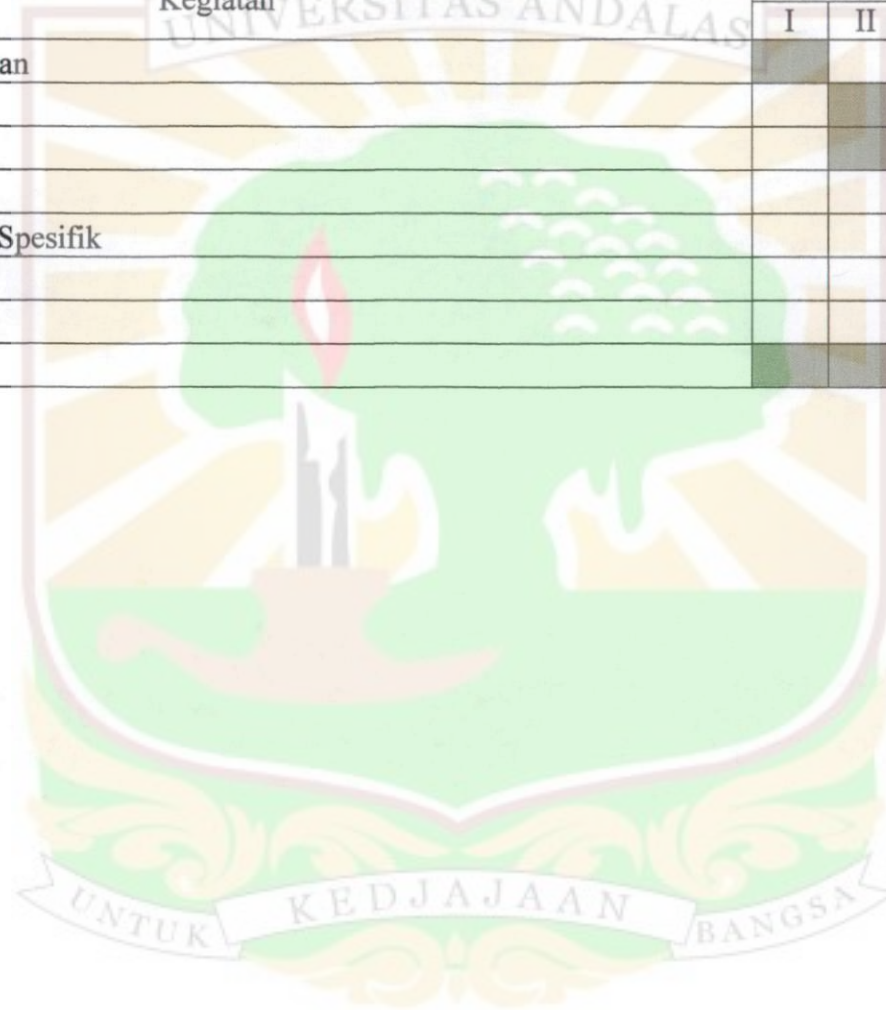
- Agrios, G.N. 1997. *Plant Pathology*. Fourth Edition. Academic Press, San Diego. London.
- Anief, Moh., 1993. *Ilmu Meracik Obat*. UGM Press, Yogyakarta. 230 hal.
- Anonim. 2009. Bahan Ajar Biologi Molekuler "*Replikasi DNA Dan Polymerase Chain Reaction*". www.unsoed.wordpress.com. [13 Januari 2010]
- _____. 2010. Bahan Ajar Mikologi "*Struktur Dan Ultrastruktur*". www.blog.unila.ac.id. [13 Januari 2010]
- _____. 2010. "*Taksonomi Colletotrichum sp.*". www.wikipedia.org. [13 Januari 2010]
- Darnetty. 2005. *Diktat Kuliah Mikologi*. Jurusan HPT Faperta UNAND, Padang. 144 hal.
- Edel, V. 1998. *Polymerase Chain Reaction in Mycology: An Overview*. In Bridge PD et al (editor). *Applications of PCR in mycology*. United Kingdom: CAB International. P. 1-20.
- Halliday, P. 1980. *Fungus Disease of Tropical Crops*. Cambridge, San Fransisco. pp. 607.
- Hendri, J. 2008. *Teknik Deproteinasi Kulit Rajungan (Portunuspelagious) Secara Enzimatis Dengan Menggunakan Bakteri Pseudomonas aeruginosa Untuk Pembuatan Polimer Kitin Dan Deasetilasinya*. [Prosiding Seminar Hasil Penelitian & Pengabdian Kepada Masyarakat]. Jurusan Kimia UNILA Digital Press, Lampung. 13 hal.
- Hidayat, F. 2010. *Pengujian Primer Spesifik Untuk Deteksi Berbasis PCR Spesies Colletotrichum sp., Patogen Penyebab Penyakit Antraknosa Pada Pertanaman Cabai (Capsicum sp.)*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. 41 hal.
- Illahi, Z. 2010. *Uji Akurasi Primer Spesifik Colletotrichum sp. Penyebab Antraknosa pada Tanaman Cabai (Capsicum sp.)*. [Skripsi]. Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. 51 hal.
- Jamsari. 2004. *Diktat Pengantar Bioteknologi Tanaman*. Jurusan BDP Faperta UNAND, Padang.
- _____. 2006. *Penuntun Praktikum Dasar-Dasar Bioteknologi Tanaman*. Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang.

- _____. 2007. *Pengantar Pemuliaan Landasan Genetis, Biologis dan Molekuler*. Universitas Riau Press, Pekanbaru. 193 hal.
- _____. 2008. *Bioteknologi Pemula Prinsip Dasar Dan Aplikasi Analisis Molekuler*. Universitas Riau Press, Pekanbaru. 232 hal.
- _____. 2008. *Preparasi DNA Spesies Colletotrichum sp. dan Spesifitas Sistem Fingerprinting RAPD*. Jurnal Natur Indonesia 11: 31-39.
- _____. 2009. *Kloning Fragmen-Fragmen RAPD Penciri Spesies Colletotrichum sp Untuk Pengembangan Sistem Deteksi Dini Pathogen Penyebab Anthrachsosa Pada Pertanaman Cabai*. Artikel Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Andalas, Padang. 15 hal.
- Kaban, J. 2007. *Modifikasi Kimia dari Kitosan dan Aplikasi Produk yang Dihasilkan*. [Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap Universitas Sumatera Utara]. FMIPA USU Digital Press, Medan. 14 hal.
- Khaeruni, A., A. Suwanto, B. Tjahjono, dan M.S. Sinaga. 2007. *Deteksi Cepat Penyakit Pustul Bakteri pada Kedelai Menggunakan Teknik PCR dengan Primer Spesifik*. HAYATI Journal of Biosciences, vol. 14, No. 2, 76-80 hal.
- Lehninger, A.L. 1997. *Dasar-dasar Biokimia Jilid I*. Alih Bahasa Dr. Ir. Maggy Thenawidjaya. Erlangga, Jakarta.
- Mardinus. 1984. *Jamur dan Penyakit Tanaman*. Proyek Pengembangan Perguruan Tinggi Universitas Andalas, Padang. 120 hal.
- Maryam. 2001. *Uji Kemampuan Trichoderma harzianum Rifai dalam Mengendalikan Penyakit Antraknosa Colletotrichum capsici (Syd) Butter dan Bisby Pada Buah Cabai Lepas Panen*. [Thesis]. Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. 37 hal.
- Mollah, S., A. Jaya, H. Aswidinnoor, dan D. Santoso. 2004. *Deteksi dan Analisis Sekuens Gen Inhibitor Proteinase pada Beberapa Klon Kakao Harapan Tahan Penggerek Buah Kakao dari Sulawesi Selatan*. Menara Perkebunan. 72(1):1-10.
- Muladno. 2002. *Seputar Teknologi Rekayasa Genetika*. Pustaka Wirausaha Muda, Bogor. 122 hal.
- Muzzarelli, R.A.A. 1984. *Chitin*, Dalam G. O. Aspinal (Ed.) *The Polysaccharides*. Vol. 3, pp. 417 – 450. Pergamon Press, Oxford.
- Pabendon, M.B, Murdaningsih, H.K., Baihaki, G. Suryatmana. 2004. *Deteksi Tingkat Heterosigositas dan Variasi Alil 73 Genotip Jagung Melalui Marka SSRs (Simple Sequences Repeats)*. Jurnal Zuriat 15 (1).

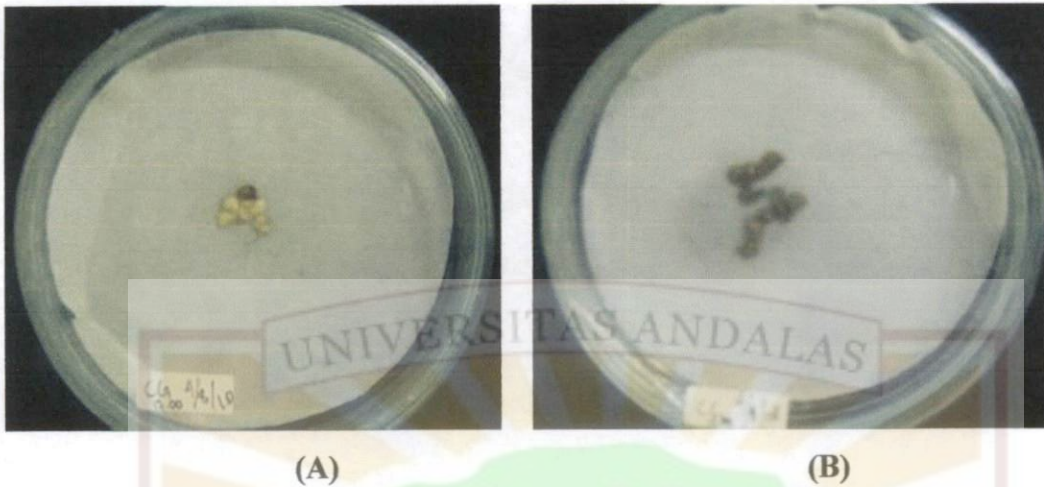
- Purwanta. 2010. *RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)*. www.najwapur@yahoo.com. [13 Januari 2010]
- Semangun, H. 1989. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. UGM, Yogyakarta. 850 hal.
- Sudrajat, D., R.M. Lina dan F. Suhadi. 2000. *Deteksi Cepat Bakteri Escherichia coli Enterohemoragik (EHEK) Dengan Metode PCR (Polymerase Chain Reaction)*. Risalah Pertemuan Ilmiah Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi. BATAN, Jakarta. 6 hal.
- Suhardi. 1989. *Antraknosa Pada Tanaman Cabai (Capsicum annum L) I. Taksiran Kehilangan Hasil*. Prosiding Kongres Nasional X dan Seminar Ilmiah PFI. Denpasar. Hal 285-287.
- Suryaningsih. 1996. *Penyakit Tanaman Cabai Merah dan Pengendaliannya*. P: 65-83. Dalam A.S. Duriat, A.W.W. Hadigunda, T.A. Soetiarso dan L. Prabaningrum (ed.). *Teknologi Produksi dan Pengembangan Hortikultura*. Balai Penelitian dan Pengembangan Pertanian. Lembang, Bandung.
- Suryanto, Dwi. 2005. *Eksplorasi Bakteri Kitinolitik: Keragaman Genetik Gen Penyandi Kitinase Pada Berbagai Jenis Bakteri Dan Pemanfaatannya*. Universitas Sumatera Utara, Medan.
- Tjitrasoma, S. 1967. *Rangkaian Istilah Mikologi*. Fak. Pertanian IPB, Bogor. 64 hal.
- Trisno, J dan T. Habazar. 2009. *Mikrobiologi Umum: Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jurusan HPT FAPERTA UNAND, Padang. 75 hal.
- Wizard® Genomic DNA Purification Kit. 2009. *Protocols for Genomic DNA Isolation : Isolating Genomic DNA From Yeast*. PROMEGA Corp., USA. Ed. Revised 4/05. pp. 20 (pp. 14-15).
- Yurnaliza. 2002. *Senyawa Khitin dan Aktifitas Enzim Mikrobial Pendegradasinya*. Jurusan Biologi FMIPA USU DigitalPress, Medan. 12 hal.
- Zhang, N., M.L. McCarthy, and C.D. Smart. 2008. *A macroarray system for the detection of fungal and oomycete pathogens of solanaceous crops*. J. Plant Disease/June 2008. 92:953-960.

Lampiran 1. Jadwal kegiatan penelitian

NO.	Kegiatan	Juli				Agustus			
		I	II	III	IV	I	II	III	IV
1	Persiapan Alat dan Bahan								
2	Pengambilan Sampel								
3	Pembiakan Jamur								
4	Isolasi DNA								
5	Uji Sensitivitas Primer Spesifik								
6	Pengolahan Data								
7	Penulisan Laporan								
8	Studi Kepustakaan								



Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian



Keterangan:

(A) Foto jaringan benih cabai sehat yang diinokulasi dengan jamur patogen *Colletotrichum gloeosporioides* dan dibiakkan secara *Moist Chamber*. (B) Foto jaringan benih cabai sehat yang diinokulasi jamur patogen *Colletotrichum capsici* dan dibiakkan secara *Moist Chamber*.

Lampiran 3. Komposisi Media CMC Cair dan Media Kitin Cair

a. Setiap 250 mL media CMC (*Carboxyl Metyl Cellulose*) cair, mengandung:

- *Carboxyl Metyl Cellulose* timbang sebanyak 25 g.
- Taburkan dalam *Aquadest* steril hingga volume mencapai 250 mL dan biarkan selama 30 menit lalu diaduk perlahan-lahan hingga larut. Sterilkan dengan *autoclave*.

Sumber : Anief (1993).

b. Setiap 250 mL media koloid kitin cair, mengandung:

- Kitin koloid basah ditimbang sebanyak 15 g.
- *Yeast extract* 0,25 g.
- Pepton 0,25 g.
- KH_2PO_4 0,3 g.
- K_2HPO_4 0,7 g.
- MgSO_4 0,5 g.
- Larutkan dengan *Aquadest* steril hingga volume mencapai 250 mL. Sterilkan dengan *autoclave*.

Keterangan : Kitin Koloid Basah di buat dengan cara melarutkan 10 g serbuk kitin murni dengan 10 mL larutan HCl pekat lalu biarkan bereaksi selama 1 jam sambil diaduk terus menerus selanjutnya larutan tersebut ditambahkan ethanol 70% dapat disimpan pada suhu -20°C sebagai stock, jika diperlukan kitin koloid basah, harus dibilas dengan aquadest atau larutan amonium pospat hingga $\text{pH} \geq 7$

Sumber : Yurnaliza (2002).

Lampiran 4. Protokol Isolasi DNA Genomik Menggunakan Genomic DNA Purification Kit PROMEGA USA

1. Ambil 1 mL kultur cair jamur masukkan ke dalam tabung eppendorf 1,5 mL.
2. Sentrifugasi tabung tersebut pada kecepatan 13.000 – 16.000 xg selama 2 menit sehingga didapatkan pellet sel. Buang supernatant dari pellet tersebut.
3. Resuspensi pellet sel dengan 50 mM larutan EDTA sebanyak 293 μ L.
4. Tambahkan dengan 20 mg/mL enzim lyticase sebanyak 7,5 μ L dan campurkan merata menggunakan pipet mikro sebanyak 4 x pipet.
5. Inkubasi sample pada suhu 37⁰C selama 30-60 menit untuk meluruhkan dinding sel. Dinginkan pada suhu kamar.
6. Sentrifugasi sample pada kecepatan 13.000-16.000 xg selama 2 menit dan buang supernatannya.
7. Tambahkan 300 μ L larutan pelisis nucleus pada pellet sel dan campurkan merata menggunakan pipet mikro beberapa kali.
8. Tambahkan larutan presipitasi protein sebanyak 100 μ L dan vortex dengan kecepatan paling tinggi selama 20 detik.
9. Inkubasi sampel dalam es selama 5 menit.
10. Sentrifugasi sampel pada kecepatan 13.000-16.000 xg selama 3 menit.
11. Transfer supernatant pada tabung 1,5 mL baru yang steril yang telah terdapat di dalamnya isopropanol sebanyak 300 μ L. Campurkan hingga homogen dengan menggoyang-goyangkan tabung dengan ujung jari hingga tampak reaksi presipitasi. Sentrifugasi pada kecepatan 13.000-16.000 selama 2 menit.
12. Buang supernatant dengan sangat hati-hati dan keringkan di atas kertas penyerap. Tambahkan 300 μ L ethanol untuk mencuci DNA, lakukan beberapa kali. Sentrifugasi kembali pada kecepatan 13.000-16.000 selama 2 menit. Buang larutan ethanol dengan sangat hati-hati agar pellet tidak ikut terbang. Keringkan dari ethanol selama 10-15 menit.
13. Tambahkan pellet di dalam tabung dengan larutan DNA Rehydration sebanyak 50 μ L.

14. Kemudian tambahkan 1,5 μL larutan enzim RNase agar DNA menjadi bebas dari kontaminan atau terjaga kemurniaannya. Vortex sampel selama 1 detik. Lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit.
15. Rehidrasi DNA dengan cara di inkubasi pada air dengan suhu 65°C selama 1 jam jika ingin digunakan.
16. DNA dapat disimpan pada suhu 2-8°C.

Sumber : PROMEGA (2009).

Keterangan : jika menggunakan protokol ini dalam mengisolasi DNA akan memakan waktu sekitar 2 jam 50 menit.

