PENGUNAAN FTA CARD DALAM PERSIAPAN ANALISIS DNA UNTUK IDENTIFIKASI PENYAKIT TANAMAN SECARA MOLEKULER

The Use of FTA Card on DNA Sample Preparation for Molecular of Plant Disease Identification

Purnamila Sulistyawati dan Anto Rimbawanto

Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan

ABSTRACT

*Accurate and quick identification of pathogen is key to control the spread of plant diseases. Morphological identification is often ineffective because it requires fruit body which often are not presence, rely on characters which may be highly variable within and among species and can be slow and time consuming. Molecular identification of plant disease can overcome most of the shortcomings of morphological identification. Application of FTA Card for sample collection is crucial for the success of molecular identification of pathogen. The study present an earlier results on the suitability of FTA Card to collect sample in situ. The study was done on 4 different samples namely pure culture of *Fusarium sp.*, infected leaf, soil and seeds which assumed to have mycelium. The results indicate that FTA Card is effective as a collecting media of pathogen for most samples, particularly for mycelium culture. Further experiments are still required to ensure the suitability of the card for leaf, seeds and soil samples.*

Key Words : DNA sample, FTA card, molecular identification

ABSTRAK

Identifikasi dan deteksi organisme penyebab penyakit tanaman secara cepat dan akurat adalah salah satu bagian penting dari pengendalian penyakit secara efektif. Dibandingkan dengan teknik identifikasi morfologi, teknik molekuler mempunyai kelebihan antara lain: tidak memerlukan badan buah; dapat mengidentifikasi jamur dari kayu busuk dan dapat digunakan untuk mencari hubungan antara micelium jamur dari kultur murni atau jaringan tanaman dengan jenis jamur yang telah diidentifikasi secara morfologi. Penggunaan kartu FTA merupakan bagian penting dari aplikasi molekuler untuk identifikasi penyakit. Penelitian ini menampilkan hasil awal mengenai pengujian kesesuaian kartu FTA sebagai media untuk mendapatkan sampel DNA dari 4 macam sampel, yaitu kultur murni *Fusarium sp.*, daun yang terserang penyakit, tanah dan biji yang diduga mengandung micelium jamur. Hasilnya menunjukkan bahwa kartu FTA dapat mengikat DNA dari keempat sampel tersebut. Penelitian lebih lanjut masih diperlukan untuk mendapatkan hasil yang maksimal.

Kata Kunci : Identifikasi molekuler, kartu FTA, sampel DNA

I. PENDAHULUAN

Penyakit tanaman dapat mengakibatkan kerugian yang besar yang mengancam kelangsungan hutan tanaman dan industri kehutanannya, sekaligus juga berpengaruh secara tidak langsung terhadap ekonomi masyarakat sekitarnya. Beberapa penyakit tanaman dapat menyebar secara cepat dan tidak hanya menyerang pada satu spesies tertentu. Contohnya penyakit busuk akar (*root rot*) yang disebabkan oleh jamur *Ganoderma*. Penyakit ini mengakibatkan banyak tanaman mati dan ditemukan di hutan tanaman *Acacia mangium* di Malaysia, Philipina, India dan Indonesia (Old *et.al*, 2000). Penyakit ini dapat menyebar dengan cepat dan tidak hanya ditemukan pada tanaman *A. mangium* tetapi juga pada spesies lain seperti *Eucalyptus pellita* dan kelapa sawit.

Identifikasi dan deteksi organisme penyebab penyakit tanaman secara cepat dan akurat adalah salah satu bagian penting dari pengendalian penyakit secara efektif. Deteksi patogen dan identifikasinya juga berperan penting pada pencegahan penyebaran penyakit dan penerapan kebijakan karantina tanaman. Pengelolaan penyakit secara efektif dapat memberikan kontribusi positif pada penerapan karantina penyakit tanaman dan aplikasi biosekuriti di Indonesia. Khusus untuk sektor kehutan, biosekuriti yang dimaksud adalah tindakan preventif terhadap resiko dan efek yang ditimbulkan dari suatu penyakit yang berasal dari tanaman eksotik yang menyerang tanaman indigenous, serta deteksi penyakit tanaman dan cara penanggulangannya.

Untuk dapat mengidentifikasi penyakit secara cepat dan akurat digunakan teknik molekuler. Dibandingkan dengan teknik identifikasi morfologi, teknik molekuler mempunyai kelebihan antara lain: 1). tidak memerlukan badan buah; 2). dapat mengidentifikasi jamur dari kayu busuk; dan 3). dapat digunakan untuk mencari hubungan antara micelium jamur dari kultur murni atau jaringan tanaman dengan jenis jamur yang telah diidentifikasi secara morfologi.

Sebagai bagian dari manajemen penyakit tanaman, metode ekstraksi DNA untuk pendeteksian penyakit merupakan bagian yang penting. Metode ekstraksi dan penyimpanan DNA secara konvensional seperti yang dilakukan sekarang tidak efektif untuk diterapkan pada penelitian secara *in situ*. Metode konvensional ini termasuk menggerus sampel menggunakan mortar dan pestle, menghancurkan dinding sel tanaman menggunakan nitrogen cair, dan juga penggunaan berbagai bahan kimia yang tidak memungkinkan dibawa ke lapangan. Metode konvensional juga membutuhkan jaringan tanaman yang masih segar dalam jumlah yang relatif besar.

Untuk mengatasi hal tersebut, diperlukan suatu metode ekstraksi DNA yang lebih efektif dan efisien dan juga selaras dengan penerapan biosekuriti khususnya pada penyakit tanaman kehutan. Satu metode yang saat ini tengah banyak diteliti penggunaannya adalah dengan teknologi *FTA Card* (Kartu FTA). Kartu FTA ini dapat digunakan untuk menyimpan DNA dari organisme penyebab penyakit tanaman secara *in situ* tanpa membutuhkan banyak peralatan ekstraksi. Kartu FTA menjadi salah satu

alternatif untuk memperoleh dan menyimpan sampel DNA melebihi metode konvensional dikarenakan kartu FTA dirancang secara lebih simpel dan dapat digunakan untuk menyimpan DNA dalam suhu ruangan (Crabbe, 2003). Di samping itu, kartu FTA dilengkapi dengan bahan-bahan seperti chelators, denaturants and free radical traps, yang dapat menghambat enzim, mikroba dan kimia yang dapat mendegradasi DNA atau RNA dari suatu sampel jamur (Rogers & Burgoyne, 1997).

Kartu FTA digunakan untuk mendapatkan DNA langsung dari sampel secara *in situ*. Teknik ini telah dipergunakan secara luas dan terbukti efektif di bidang forensik (Tack *et al*, 2007; Prieto *et al*, 2006; Borsting and Morling, 2006; Fujita dan Kubo, 2006). Teknik ini juga dikembangkan untuk penelitian bioteknologi manusia dalam hal pendeteksian dan identifikasi penyakit (Milne *et al*, 2006; Beck *et al*, 2001; Guio *et al*, 2006; Dobbs *et al*, 2002; Dictor *et al*, 2007). Selain itu kartu FTA juga dapat digunakan untuk sampling DNA pada hewan seperti ikan dan serangga (Livia *et al*, 2006; Harvey, 2005), dan deteksi protozoa serta bakteri (Orlandi dan Lampel, 2000; Hide *et al*, 2003; Chu *et al*, 2004; Rajendram *et al*, 2006).

Pengembangan ilmu bioteknologi tanaman juga telah menggunakan metode kartu FTA sebagai salah satu cara alternatif untuk mendapatkan DNA dari tanaman secara lebih cepat dan simpel. Koleksi DNA tanaman skala besar secara *in situ* telah dilakukan oleh Tsukaya *et al* (2005) dan Mbogori *et al* (2006). Selain itu penggunaan kartu FTA untuk deteksi patogen juga telah dilakukan oleh Ndunguru *et al* (2005), Borman *et al* (2006) dan Suzuki *et al* (2006).

Meskipun demikian, penelitian penggunaan kartu FTA untuk deteksi jamur penyebab penyakit tanaman belum banyak dilakukan. Oleh sebab itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kesesuaian kartu FTA sebagai media untuk mendapatkan DNA dari jamur penyebab penyakit pada tanaman sebagai bagian dari deteksi dan identifikasi penyakit tanaman secara molekuler.

II. BAHAN DAN METODE

A. Bahan

Penelitian ini menggunakan sampel dari kultur murni *Fusarium sp.*, daun yang terserang penyakit, tanah dan biji yang diduga mengandung miselium jamur (lihat tabel 1.), dan FTA Card DNA Kit (Whatman Inc.)

B. Metode

Jamur

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengusapkan miselium dari jamur ke kartu FTA hingga terjadi perubahan warna pada bagian yang ditemplei miselium sebagai tanda bahwa kartu FTA tersebut telah mengikat DNA dari patogen tersebut.

Daun

Dipilih daun yang terserang penyakit dengan asumsi bahwa penyakit tersebut berasal dari serangan jamur. Daun digerus lebih dahulu sebelum dicampur dengan larutan ekstraksi. Kemudian larutan yang telah tercampur dengan bubuk daun tersebut ditetaskan pada kartu FTA.

Tanah

Tanah ditimbang sebanyak 0,25 gr, kemudian ditambahkan buffer ekstraksi

Tabel 1. Daftar sampel

No.	Kode	Sampel	No.	Kode	Sampel
1	T	Fusarium	17	12/10	Tanah
2	U	Fusarium	18	25/10	Tanah
3	R	Fusarium	19	L7	Daun
5	V	Fusarium	21	L20	Daun
6	2B-4	Fusarium	22	L23	Daun
7	2B-3	Fusarium	23	CM 0774 B	Biji (Buffer)
8	2B-2	Fusarium	24	CM 0773 B	Biji (Buffer)
9	P	Fusarium	25	CM 0580 B	Biji (Buffer)
10	S	Fusarium	26	GP SPA 270 B	Biji (Buffer)
11	2A-1	Fusarium	27	CM 0774 SW	Biji (Air steril)
12	2A-2	Fusarium	28	CM 0773 SW	Biji (Air steril)
13	2A-3	Fusarium	29	CM 0580 SW	Biji (Air steril)
14	2B-1	Fusarium	30	GP SPA 270 SW	Biji (Air steril)
15	12/9	Tanah	31	Positif kontrol	
16	29/2	Tanah	32	Negatif kontrol	

sebanyak 250 µl, dicampur sampai benar-benar merata. Selanjutnya larutan ekstraksi yang telah tercampur ditetaskan pada kartu FTA.

Biji

Untuk sampel biji, terdapat dua perlakuan. Pertama, biji digerus dan dicampur dengan larutan ekstraksi kemudian ditetaskan pada kartu FTA. Kedua, dilakukan pencucian biji dengan air steril sebanyak 1 ml selama beberapa menit, kemudian air steril tersebut ditetaskan juga pada kartu FTA.

Larutan ekstraksi terdiri dari 1 M Tris HCl pH 8.5, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 10% SDS dan psd H₂O. Selanjutnya kartu FTA dikeringkan dalam suhu ruangan sampai sampel yang diusapkan atau ditetaskan pada kartu mengering sepenuhnya. Tahapan selanjutnya adalah dilakukan purifikasi DNA sesuai dengan *Sample Purification Protocol*. Setelah proses purifikasi (pencucian DNA) selesai, dilakukan proses PCR-ITS menggunakan primer ITS 4 dan ITS 3 untuk

mendeteksi ada tidaknya DNA yang terikat pada kartu FTA tersebut.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berbagai pengujian yang dilakukan di laboratorium menggunakan beberapa sampel isolat murni jamur dari jenis *Fusarium sp.* membuktikan bahwa kartu FTA dapat mengikat DNA dari patogen tersebut.

Pengujian yang dilakukan pada 14 sampel *Fusarium sp.*; 4 sampel tanah, 4 sampel daun, 8 sampel biji (4 sampel buffer dan 4 sampel air steril) menggunakan primer ITS 4 dan ITS 3 memberikan hasil yang layak untuk ditelaah lebih lanjut.

Dari gambar 1 terlihat bahwa kartu FTA dapat mengikat DNA jamur yang berasal dari miselium jamur patogen *Fusarium sp.* (sampel nomor 1-14) secara akurat. Hal ini terbukti dengan hasil PCR yang dilakukan dimana DNA dapat teramplifikasi dengan jelas. Biakan jamur

Gambar 1. Amplifikasi DNA dari kartu FTA menggunakan primer ITS 4 dan ITS 3.

patogen yang digunakan adalah biakan yang dikulturkan dari badan buah jamur yang diisolasi langsung dari tanaman yang terinfeksi patogen tersebut.

Amplifikasi DNA dari sampel tanah dan biji yang terinfeksi patogen tidak terlihat jelas seperti pada sampel *Fusarium sp.* Meskipun demikian, hasil ini bisa menjadi bukti bahwa kartu FTA mampu mengikat DNA jamur dari sampel tanah dan biji meski dalam jumlah yang sedikit. Sedikitnya kuantitas DNA yang terikat ini masih perlu diteliti lebih lanjut apakah DNA yang terikat pada matrik kartu FTA telah tercuci dan larut pada saat proses purifikasi, atau memang konsentrasi DNA jamur patogen yang terkandung pada sampel tanah dan biji tersebut sedikit sehingga jumlah DNA jamur yang terikat juga sedikit.

Hal yang menarik adalah dari 8 sampel biji yang digunakan hanya 5 sampel yang amplifikasi DNA-nya terlihat meskipun tidak terlalu jelas, yaitu sampel nomor 26-30. Empat sampel diantaranya adalah sampel biji yang dicuci menggunakan air steril. Dari hasil ini besar kemungkinan bahwa terdapat jamur patogen yang terdapat di kulit luar biji, karena dengan metode pencucian menggunakan air sangat tidak mungkin untuk mendapatkan DNA jamur yang ada di dalam biji tersebut kecuali dengan cara menghancurkan bijinya.

Hanya terdapat satu amplifikasi DNA dari sampel biji yang dicampur dengan buffer ekstraksi, yaitu sampel nomor 26. Amplifikasi DNA dari sampel ini juga terlihat pada ekstraksi DNA yang menggunakan metode pencucian dengan air steril. Kemungkinan yang terjadi, sampel biji tersebut (GP SPA 270) memang

terinfeksi jamur patogen secara keseluruhan, baik dari luar ataupun dari dalam biji.

Tidak terdapat amplifikasi DNA dari empat buah sampel daun yang digunakan. Hal ini terjadi kemungkinan dikarenakan sangat sedikitnya DNA yang terikat pada matrik kartu FTA sehingga tidak dapat teramplifikasi dengan baik.

Meskipun tidak terdapat DNA yang teramplifikasi dari sampel daun, bukan berarti bahwa kartu FTA tidak bisa dijadikan alat ekstraksi untuk mendapatkan DNA jamur dari daun. Pembuktian tentang hal ini masih memerlukan uji penelitian lanjutan. Lebih lanjut, diperlukan pengujian dengan primer yang spesifik untuk jenis-jenis jamur tertentu guna menyakinkan bahwa hasil DNA yang diperoleh dengan menggunakan kartu FTA memang merupakan DNA jamur. Tahapan selanjutnya adalah dengan melakukan sekuensing DNA sehingga didapatkan kepastian hasil dan jamur yang belum diketahui jenisnya dapat teridentifikasi secara akurat dan valid.

Perlu dilakukan pengujian penggunaan kartu FTA yang langsung diterapkan pada badan buah berbagai jenis jamur untuk mengetahui tingkat kapabilitasnya. Bila hal ini dapat dilakukan, maka sampling DNA untuk jamur patogen tidak perlu lagi memindahkan badan buah dari lapangan ke laboratorium karena kita dapat melakukan sampling langsung di lapangan. Hal ini juga dapat mengurangi resiko penularan penyakit tanaman akibat dari tersebarnya spora yang berasal dari suatu jenis jamur dari tanaman tertentu ke tanaman yang lain.

IV. KESIMPULAN

Dari hasil yang diperoleh pada penelitian pendahuluan tentang kesesuaian kartu FTA sebagai salah satu alat alternatif untuk mendapatkan DNA dari jamur penyebab penyakit pada tanaman dapat disimpulkan bahwa kartu FTA mampu mengikat DNA dari biakan murni jamur dan tanah dan biji yang mengandung miselium jamur. Meskipun demikian masih diperlukan penelitian-penelitian yang lebih lanjut dan mendalam dengan menggunakan beberapa primer yang lebih spesifik untuk mengidentifikasi jenis jamur tersebut.

V. UCAPAN TERIMA KASIH

Tulisan ini merupakan bagian dari penelitian program S2 yang sedang ditempuh oleh Purnamila Sulistyawati. Ucapan terimakasih disampaikan kepada Dr. Caroline Mohammed dan Dr. Morag Glen sebagai pembimbing penulis dalam penelitian ini, seluruh rekan peneliti dan teknisi di kantor CSIRO Forestry di Hobart Tasmania Australia, Agricultural Science University of Tasmania dan Balai Besar Penelitian Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman Hutan Jogjakarta yang telah memberikan fasilitas dan membantu dalam pelaksanaan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

Beck, I. A., Drennan, K. D., Melvin, A. J., Mohan, K. M., Herz, A. M., Alarcon, J., Piscoya, J., Velazquez, C. & Frenkel, L. M., 2001. Simple, Sensitive and Specific Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B DNA in Dried Blood

- Samples for Diagnosis in Infants in the Field. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 29-33.
- Borman, A., Linton, C., Miles, S., Campbell, C. & Johnson, E., 2006. Ultra-rapid preparation of total genomic DNA from isolates of yeast and mould using Whatman FTA filter paper technology - a reusable DNA archiving system. *Med Mycol*, 44, 389-398.
- Borsting, C. & Morling, N., 2006. Multiple displacement amplification of blood and saliva samples placed on FTAR cards. *International Congress Series 1288*, 1288, 716-718.
- Chu, D. M. T., B. Sherchand, J., Cross, J. H. & Orlandi, P. A., 2004. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in Animal Fecal Isolates From Nepal Using An FTA Filter-Base Polymerase Chain Reaction Method. *Am.J.Trop.Med.Hyg*, 71, 373-379.
- Crabbe, M. J. C., 2003. A novel method for the transport and analysis of genetic material from polyps and zooxanthellae of scleractinian corals. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 57, 171-176.
- Dictor, M., Skogvall, I., Warenholt, J. & Rambech, E., 2007. Multiplex polymerase chain reaction on FTA cards vs. flow cytometry for B-lymphocyte clonality. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 45, 339-345.
- Dobbs, L. J., Madigan, M. N., Carter, A. B. & Earls, L., 2002. Use of FTA Gene Guard filter paper for the storage and transportation of tumor cells for molecular testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126, 56-63.
- Fujita, Y. & Kubo, S.-I., 2005. Application of FTA^R technology to extraction of sperm DNA from mixed body fluids containing semen. *Legal Medicine* 8, 43-47.
- Guio, H., Okayama, H., Ashino, Y., Saitoh, H., Xiao, P., Miki, M., Yoshihara, N., Nakanowatari, S. & Hattori, T., 2006. Method for efficient storage and transportation of sputum specimens for molecular testing of tuberculosis. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10, 906-910.
- Hide, G., Hughes, J. M. & McNuff, R., 2003. A Rapid and Simple Method of Detection Of *Blepharisma japonicum* Using PCR and Immobilisation on FTA Paper. *BMC Ecology*, 3.
- Harvey, M., 2005. An alternative for the extraction and storage of DNA from insects in forensic entomology. *Journal of Forensic Science* 50.
- Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N. & Panaro, F., 2006. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. *Molecular Ecology Notes*, 6, 257-260.
- Miline, E., Van Bockxmeer, F. M., Robertson, L., Brisbane, J. M., Ashton, L. J., Scott, R. J. & Armstrong, B. K., 2006. Buccal DNA collection: Comparison of buccal swabs with FTA cards. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 15, 816-819.
- Mbogori, M. N., Kimani, M., Kuira, A., Lagat, M. & Danson, J. W., 2006. Optimization of FTA technology for large scale plant DNA isolation for use in marker assisted selection.

- African Journal of Biotechnology*, 5, 693-696.
- Ndunguru, J., Taylor, N. J., Yadav, J., Aly, H., Legg, J. P., Aveling, T., Thompson, G. & Fauquet, C. M., 2005. Application of FTA Technology for Sampling, Recovery and Molecular Characterization of Viral Pathogens and Virus-Derived Transgenes From Plant Tissues. *Virology Journal*, 2.
- Old, K. M., Lee, S.S., Sharma, J.K. & Yuan, Z.Q., 2000. A manual of diseases of tropical Acacias in Australia, South-East Asia and India.
- Orlandi, P. A. & Lampel, K. A., 2000. Extraction-Free, Filter-Based Template Preparation for Rapid and Sensitive PCR Detection of Pathogenic Parasitic Protozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2271-2277.
- Prieto, A., Cifuentes, L. A., R. Alfonso, J. Ortega & Camargo, M., 2006. Isolation of DNA using IsoCode cards. *International Congress Series 1288*, 1288, 713-715.
- Rogers, C. & L. Burgoyne, 1997. Bacterial Typing: Storing and Processing of Stabilized Reference Bacteria for PCR Without Preparing DNA-An Example of An Automated Procedure. *Analytical Biochemistry*, 247.
- Rajendram, D., Ayenza, R., Holder, F. M., Moran, B., Long, T. & Shah, H. N., 2006. Long-term storage and safe retrieval of DNA from microorganisms for molecular analysis using FTA matrix cards. *Journal of Microbiological Methods*, 67, 582-592.
- Tack, L. C., Thomas, M., & Reich, K., 2005. Automated forensic DNA purification optimized for FTA Card punches and Identifiler STR-Based PCR analysis. *JALA*. August. 231-236.
- Tsukaya, H., Ioawa, Y., Kondo, M. & Ohba, H., 2005. Large-scale general collection of wild-plant DNA in Mustang, Nepal. *Journal of Plant Research*, 118, 57-60.
- Suzuki, S., Taketani, H., Kusumoto, K. I. & Kashiwagi, Y., 2006. High-throughput genotyping of filamentous fungus *Aspergillus oryzae* based on colony direct polymerase chain reaction. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 572-574.