

## Variasi Genetik Berdasarkan Penanda Molekular *Random Amplified Polymorphic DNA* Pada Jamur Shiitake (*Lentinula edodes*)

Genetic Variation Based on Random Amplified Polymorphic DNA Molecular Markers on Shiitake Mushrooms (*Lentinula edodes*)

Nuraeni Ekowati<sup>1\*</sup>, Rina Sri Kasiamdari<sup>2</sup>, Nursamsi Pusposendjojo<sup>3</sup>, dan C.J. Soegihardjo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Biologi Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto

<sup>2</sup>Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>3</sup>Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>4</sup>Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

E-mail: Nuraeniekowati@yahoo.com \*Penulis untuk korespondensi

### Abstract

This study was aimed to determine the genetic variation among *Lentinula edodes* from Malang, Cianjur, Lembang, and Yogyakarta, and to find selected primer for the molecular identification of *L. edodes*. The research was conducted at the Genetics Laboratory, Faculty of Biology, Gadjah Mada University, Yogyakarta. The research consisted of DNA extraction from four isolates of *L. edodes* and one outgroup (*Pleurotus ostreatus*) mycelia, amplification of DNA with RAPD-PCR technique using eight primers (OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPA9 and OPA10). The amplification products were separated by electrophoresis agarose gels and visualized by UV illumination. Data of DNA band were analyzed by NTSYSpc21 software to determine the degree of similarity, genetic distance and construct a dendrogram based on a UPGMA method. The results showed that all primers used could amplify DNA of samples and one of them (OPA4) did not demonstrate the existence of polymorphisms in the four isolates. The size of amplified DNA fragments ranged from 129–1774 bp. This study concluded that there was genetic variation among isolates of *L. edodes* from Malang, Cianjur, Lembang and Yogyakarta with the genetic distance from 78–86%. The highest polymorphism (83.33%) was obtained by using OPA2 primer.

Key words: *Lentinula edodes*, primers, polymorphism, genetic variation, RAPD

### Abstrak

Penelitian ini bertujuan mengetahui variasi genetik jamur *Lentinula edodes* asal Malang, Cianjur, Lembang, dan Yogyakarta serta mendapatkan primer terseleksi untuk identifikasi *L. edodes* secara molekular. Penelitian dilakukan di Laboratorium Genetika, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Tahapan penelitian terdiri atas ekstraksi DNA dari miselium empat isolat *L. edodes* dan satu sampel outgroup (*Pleurotus ostreatus*), amplifikasi DNA dengan teknik PCR-RAPD menggunakan delapan jenis primer (OPA 1, OPA 2, OPA 3, OPA 4, OPA 7, OPA 8, OPA 9 dan OPA 10), elektroforesis menggunakan gel agarosa dan pengamatan pita DNA dengan UV transluminator. Data pita DNA dianalisis dengan software NTSYSpc21 untuk menentukan tingkat similaritas, jarak genetik dan untuk mengkonstruksi dendrogram berdasarkan metode UPGMA. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semua primer yang digunakan dapat mengamplifikasi DNA sampel dan satu diantaranya (OPA 4) tidak dapat menunjukkan adanya polimorfisme pada keempat isolat. Ukuran fragmen DNA teramplifikasi berkisar antara 129–1774 bp. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa antara isolat *L. edodes* asal Malang, Cianjur, Lembang dan Yogyakarta terdapat variasi genetik dengan jarak genetik antara 78–86%. Polimorfisme tertinggi (83,33%) diperoleh menggunakan primer OPA 2.

Kata kunci: *Lentinula edodes*, primer, polimorfisme, variasi genetik, RAPD

Diterima: 18 Februari 2011, disetujui: 25 Mei 2011

## Pendahuluan

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler atau jamur shiitake merupakan salah satu komoditas jamur pangan dan jamur obat (*edible and medicinal mushroom*) yang sudah banyak dikembangkan di negara-negara maju dan merupakan jamur pangan terpenting kedua di dunia. Jamur ini termasuk dalam suku Tricholomataceae, filum Basidiomycota. Sejumlah penelitian menyatakan bahwa jamur shiitake kaya akan kandungan mineral, vitamin, asam amino esensial, dan lentinan (senyawa bioaktif) yang berpotensi untuk antitumor, antivirus serta dapat meningkatkan sistem kekebalan tubuh (Stamets, 2000; Smith *et al.*, 2002; Wasser dan Weis, 2003; Reguła dan Siwulski, 2007).

Di Indonesia, pengembangan shiitake masih terbatas di beberapa daerah saja karena suhu optimal untuk pembentukan tubuh buah spesifik berkisar antara 15–25°C. Budidaya jamur ini dapat dijumpai di Sukabumi, Cipanas, Cianjur, Bogor dan Lembang (Jawa Barat), di Kaliurang (Yogyakarta), di Brebes (Jawa Tengah) dan di Malang (Jawa Timur). Selama ini, di Indonesia belum pernah dilakukan penelitian menggunakan penanda molekular untuk identifikasi intrajenis *L. edodes* (Berk.) Pegler yang sudah dibudidayakan di Jawa (Aryantha, 2005).

Dalam pembudidayaan *L. edodes* pemilihan isolat yang tepat merupakan faktor yang sangat penting. Data variasi genetik merupakan landasan dasar dan utama apabila akan mengembangkan potensinya sebagai jamur pangan maupun obat (Tanaka *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007). Uji variasi isolat *L. edodes* dengan karakteristik pertumbuhan miselium dan waktu perkecambahan spora pada beberapa medium tidak dapat memberikan perbedaan yang bermakna (Kalmis dan Kalyoncu, 2006).

Pengembangan teknik molekular menggunakan DNA, digunakan untuk membedakan secara genetis individu maupun populasi jamur. Untuk identifikasi strain menggunakan metode molekular dengan berbagai cara di antaranya desain molekular marker, *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) dan *Random Amplified*

*Polymorphic DNA* (RAPD) (Kasiamdari *et al.*, 2002). Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR)-RAPD telah berhasil digunakan untuk membedakan distribusi genomik antar isolat dalam satu jenis yang ditunjukkan oleh profil spesifik jenis (Pereira *et al.*, 2008). Metode ini merupakan metode yang efisien untuk identifikasi penanda molekular, pembuatan peta genetik, hubungan filogenetik, dan deteksi gen spesifik antar individu maupun dalam populasi (Bridge *et al.*, 1998; Bardakci, 2001; Kaewchai *et al.*, 2009).

Dengan teknik RAPD akan diperoleh pola pita DNA yang khas untuk masing-masing isolat sehingga akan tersedia marker genetik isolat *L. edodes* (Bardakci, 2001; Sobal *et al.*, 2007). Melalui pengujian ini diperoleh informasi adanya variasi genetik antar isolat *L. edodes* yang berasal dari Malang, Cianjur, Lembang, dan Yogyakarta, serta dapat ditentukan primer terseleksi yang digunakan untuk identifikasi secara cepat isolat *L. edodes* dari wilayah lainnya. Selain itu melalui pembuatan dendrogram dapat diketahui jarak genetik antar isolat yang digunakan.

## Metode Penelitian

### Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Genetika Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, mulai bulan Juni 2009 sampai Maret 2010.

### Bahan Penelitian

*Lentinula edodes* yang digunakan dalam penelitian ini terdiri atas empat isolat, yaitu isolat 1 asal Malang, isolat 2 asal Cianjur, isolat 3 asal Lembang dan isolat 4 asal Yogyakarta (isolat jamur diperoleh dalam bentuk miselium).

Masing-masing isolat jamur dikultur pada medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) volume 50 ml, diinkubasi pada *rotary shaker*, pada suhu 28°C selama 15 hari dengan kecepatan pengocokan 100 rpm. Pemanenan miselium dilakukan dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring Whatman no. 41, menggunakan corong dan labu Buchner dengan

pompa vakum. Miselium yang diperoleh digunakan untuk isolasi DNA.

### Isolasi DNA

Isolasi DNA dilakukan menggunakan *Nucleon Phytopure plant and fungal DNA extraction kits RPN-8511/GE (Healthcare, U.K)*. Miselium segar sebanyak 0,1–0,3 g digerus di dalam nitrogen cair, dimasukkan ke dalam tabung volume 1,5 ml, ditambahkan Reagen *Phytopure I* sebanyak 500 µl, dihomogenkan dan selanjutnya ditambahkan Reagen *Phytopure II* 200 µl. Sampel diinkubasikan pada suhu 65°C selama 10 menit di dalam *waterbath*, kemudian pada suhu 4°C selama 20 menit. Ke dalam sampel dimasukkan 400 µl kloroform dingin yang sebelumnya sudah disimpan pada suhu 4°C, kemudian ditambahkan 20 µl Reagen *Phytopure III* (resin), dilakukan sentrifugasi menggunakan *mikrosentrifuge* dengan kecepatan 1.300 x g selama 15 menit pada suhu kamar sampai fase atasnya kelihatan jernih. Bagian supernatan dipindahkan dengan hati-hati sebanyak 200 sampai 250 µl ke dalam tabung yang baru, kemudian ditambahkan isopropanol dingin. Tabung dibalikkan untuk mencampurkan supernatan dan isopropanol, kemudian dilakukan sentrifugasi berkecepatan 4.000 x g selama 5 menit. Supernatan dituang dan endapan (pellet) dicuci menggunakan 100 µl etanol 70% dan dipusingkan lagi pada kecepatan 4.000 x g selama 5 menit (diulang 3 kali). Sisa etanol dibuang dengan cara membuka dan membalikkan tabung di atas kertas tissue sampai endapan kering. Endapan kering disuspensikan ke dalam 100 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM ethylenediamine tetraacetic). Hasil ekstraksi DNA disimpan pada suhu -20°C sampai digunakan (Maki *et al.*, 2001; Yuwono, 2006).

### Pengujian Kualitas dan Kuantitas DNA

Kualitas DNA diuji menggunakan dielektroforesis pada gel agarosa terhadap DNA genom, sebelum dilakukan PCR. Kuantitas DNA diuji dengan mengukur konsentrasi DNA menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm. Tingkat kemurnian DNA diketahui dengan menghitung rasio *Optical density* (OD) pada

panjang gelombang 260 nm dan 280 nm dalam satuan µg/ml (Yuwono, 2006).

### Amplifikasi DNA dengan Teknik PCR-RAPD

Amplifikasi DNA menggunakan delapan jenis 'arbitrary primer' berukuran 10 nukleotida (OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPA9, OPA10) dengan teknik PCR-RAPD. Sekuens oligonukleotida untuk masing-masing primer adalah sebagai berikut OPA1 (5-CAGGCCCTTC-3), OPA2 (5-TGCCGAGCTG-3), OPA3 (5-AGTCAGCCAC-3), OPA4 (5-ATCGGGCTG-3), OPA7 (5-GAAACGGGTG-3), OPA8 (5-GTGACGTAGG-3), OPA9 (5-GGGTAACGCC-3), OPA10 (5-TGATCGCAG-3). Setiap sampel dibuat campuran reaksi PCR dengan komponen reaksi sebagai berikut, PCR kit (*Fast Start PCR Master mix*: DNTP, *Taq*-DNA polimerase, MgCl<sub>2</sub>, buffer) 13,0 µl (I X), Primer 2,5 µl (30,0 pmol), DNA sampel 3,0 µl (50,0 ng/µl), *nuclease free water* ditambahkan sampai 25 µl (Sunagawa *et al.*, 1995 dan Maki *et al.*, 2001).

Campuran (DNA, *Fast Start PCR Master mix*, primer dan *nuclease free water*) dimasukkan dalam pendaur panas (*thermo cycler*) yang telah diprogram sebagai berikut, yaitu pertama dilakukan denaturasi awal pada suhu 92°C selama tiga menit. Selanjutnya dilakukan 45 siklus pengaturan suhu dengan satu siklus terdiri atas 92°C selama satu menit untuk denaturasi DNA, 37°C selama 1 menit untuk penempelan primer (*annealing*) dan 72°C selama 2 menit untuk pemanjangan (*extension*) DNA. Pada tahap terakhir proses pemanjangan pada 72°C dilakukan selama 10 menit dan diakhiri pada suhu 4°C. Sampel dikeluarkan dari *thermo cycler*. Sampel DNA yang sudah diamplifikasi kemudian disimpan pada suhu -20°C untuk kemudian dianalisis menggunakan elektroforesis.

### Elektroforesis Gel Agarosa

Agarosa konsentrasi 2% dalam Tris-Borat-EDTA 1X (TBE), yang direndam dalam *running buffer* TBE 1X. Agarosa dilarutkan dengan *microwave*, kemudian didinginkan sampai suhu ± 50°C, dimasukkan ke dalam cetakan gel dengan sisir elektroforesis sudah terpasang. Setelah padat, sisir elektroforesis

dilepaskan dan gel direndam dengan buffer TBE. Sebanyak 5 µl sampel DNA hasil PCR dicampur dengan 1 µl *loading dye*, kemudian dimasukkan ke dalam sumuran gel dan diberi arus listrik dengan tegangan 100 V selama 30 menit. Dibuat larutan 5 µl *etidium bromide* (EtBr) dalam 100 ml bufer TBE (konsentrasi EtBr 2 µg/ml), kemudian dicampur dengan sempurna. Gel agarosa direndam dalam EtBr, selama 30 menit. Gel divisualisasi menggunakan UV transluminator (Maki *et al.*, 2001; Aryantha *et al.*, 2005).

### Analisis Data

Data pita DNA yang teramplifikasi dihitung ukurannya dan dinilai berdasarkan munculnya pita, apabila ada pita akan dinilai dengan angka 1 dan apabila tidak ada pita akan dinilai dengan angka 0. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan program *Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. (NTSYSpc21)* untuk menentukan tingkat similaritas dan untuk mengkonstruksi dendrogram berdasarkan metode *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average Algorithm* (UPGMA) (Rohlf, 2000).

## Hasil dan Pembahasan

Isolasi DNA dari miselium empat isolat *L. edodes* asal Malang, Cianjur, Lembang, dan Yogyakarta serta satu isolat *P. ostreatus* (*outgroup*) memberikan hasil konsentrasi DNA antara 987,30–1397,55 µg/ml. Pengukuran kemurnian DNA diperoleh hasil antara 1,72–1,94. Menurut Yuwono (2006), hasil isolasi DNA dikatakan baik apabila diperoleh rasio antara 1,8–2. Kemurnian DNA sangat penting untuk proses amplifikasi DNA, sehingga teknik isolasi DNA merupakan langkah utama dalam analisis molekular. Menurut Hasan *et al.*, (2009) bahwa isolasi DNA memberikan hasil yang baik apabila menggunakan materi segar dibandingkan dengan materi kering, dan hasil isolasi DNA yang kurang murni dapat menyebabkan kurang berhasilnya proses amplifikasi.

Hasil amplifikasi DNA menggunakan delapan jenis primer yaitu OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPA9 dan

OPA10 menunjukkan jumlah dan ukuran fragmen pita DNA yang berbeda dari setiap primer. Dari delapan jenis primer yang digunakan, semua dapat menempel pada DNA cetakan (sampel) sehingga terjadi amplifikasi DNA. Primer tersebut mempunyai homologi dengan DNA cetakan, karena terbentuknya fragmen pita DNA tergantung pada sekuen primer dan genotip dari DNA cetakan.

Pola pita DNA hasil amplifikasi empat isolat *L. edodes* asal Malang, Cianjur, Lembang, Yogyakarta dan satu isolat *P. ostreatus* (*outgroup*) dengan primer OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPA 9 dan OPA 10 dapat dilihat pada Gambar 1.

Berdasarkan data ukuran pita DNA teramplifikasi (*amplicons*) menggunakan delapan jenis primer diperoleh hasil ukuran pita DNA berkisar antara 129–1774 bp. Data ukuran pita DNA teramplifikasi pada penelitian ini lebih rendah dibandingkan penelitian Gupta *et al.*, (2010) yang mendapatkan ukuran pita DNA teramplifikasi antara 661–2291 bp pada jamur *Colletotrichum gloeosporioides* Penz dengan menggunakan primer OPA1, OPA3 dan OPA18. Penelitian menggunakan teknik RAPD pada tanaman obat (*Phyllanthus* sp.) dengan sembilan primer memberikan hasil ukuran pita DNA antara 300–2500 bp (Manissorn, 2010).

Hasil analisis polimorfisme dari delapan jenis primer yang digunakan menunjukkan tingkat polimorfisme yang berbeda pada setiap primer. Dari delapan jenis primer yang digunakan, tujuh jenis primer (OPA1, OPA2, OPA3, OPA7, OPA8, OPA9 dan OPA10) dapat memperlihatkan adanya polimorfisme antar keempat isolat, sedangkan satu primer (OPA4) tidak memperlihatkan polimorfisme keempat isolat. Dengan demikian ketujuh jenis primer tersebut dapat digunakan untuk membedakan genotip dari keempat isolat *L. edodes*. Primer yang dapat menghasilkan pola polimorfisme paling banyak adalah OPA2 yaitu menghasilkan 12 pita DNA yang teramplifikasi, dan 10 pita diantaranya (83,33%) merupakan pita polimorfik. Berdasarkan hasil gabungan dari delapan jenis primer, diperoleh hasil 63 pita DNA yang teramplifikasi, dan 39 (61,90%) pita DNA merupakan pita polimorfik. Hasil rata-rata produktifitas setiap primer dalam amplifikasi DNA sampel adalah 7,88 pita DNA

per primer. Data ukuran pita DNA amplifikasi untuk masing-masing primer dan persentase polimorfisme dapat dilihat pada Tabel 1.

Penelitian variasi genetik juga telah dilakukan oleh Sunagawa *et al.*, (1995), hasilnya menunjukkan bahwa RAPD dapat digunakan untuk mengidentifikasi 11 isolat *L. edodes* menggunakan primer OPA4, OPA9 dan OPA16. Dikemukakan pula bahwa identifikasi strain menggunakan teknik RAPD memberikan hasil yang lebih akurat dibandingkan dengan analisis isozym dan analisis fenotip. Maki *et al.*, (2001) telah menggunakan 20 jenis primer dari OPA (OPA1 sampai OPA20) untuk mengetahui adanya variasi genetik dari 34 isolat *L. edodes*. Hasil penelitian menggunakan primer dari OPA1-OPA5, OPA7-OPA14, OPA17-OPA20 menunjukkan adanya polimorfisme pada isolat yang digunakan. Sedangkan primer OPA6, OPA15 dan OPA16 tidak dapat mengamplifikasi DNA *L. edodes*.

Data fragmen pita DNA setelah amplifikasi kemudian dianalisis untuk menentukan tingkat similaritas genetik dari empat isolat *L. edodes* dan satu isolat *P. ostreatus*. Hasil matrix similaritas genetik dari kelima isolat yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 2.

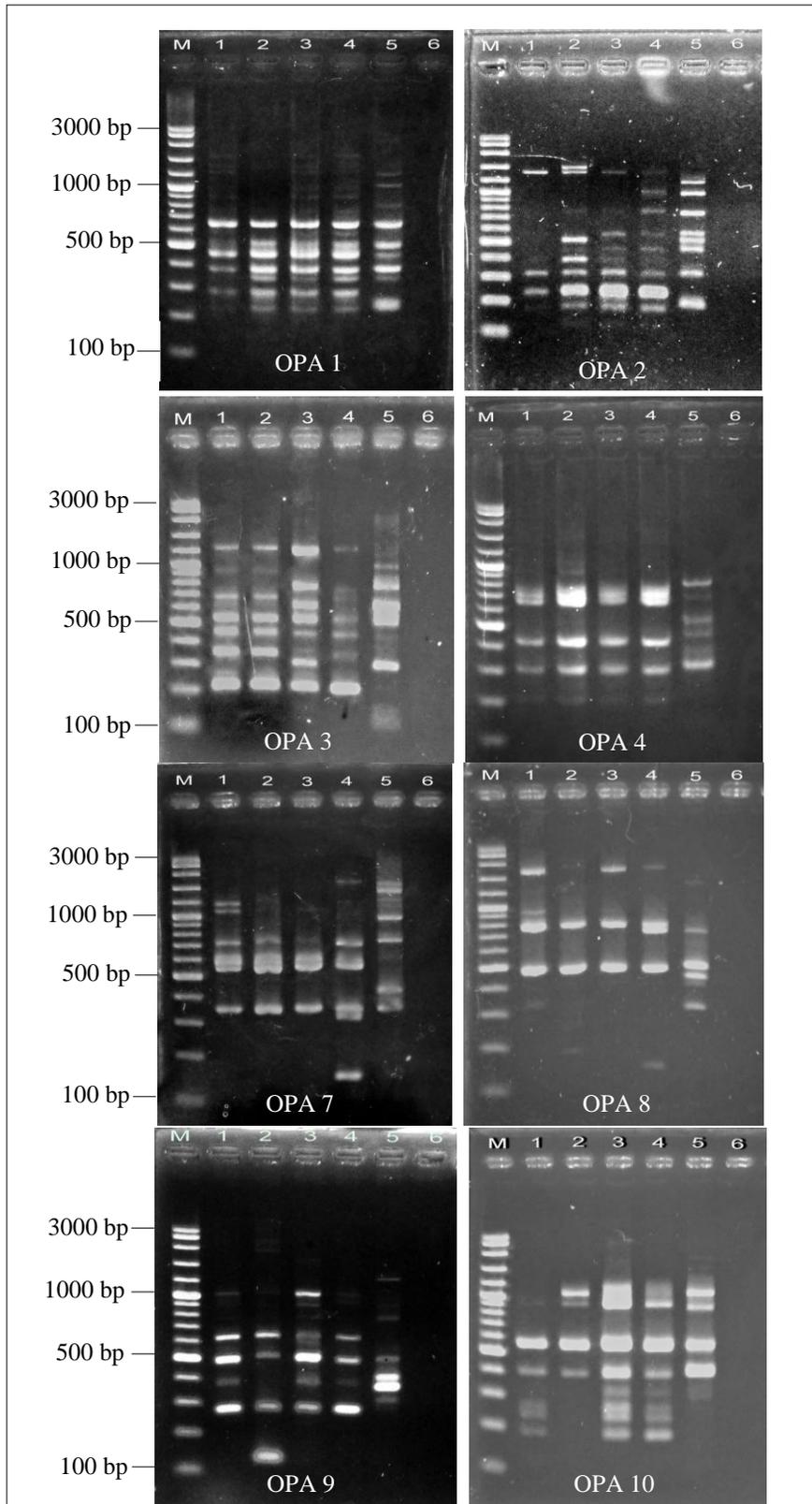
Hasil analisis index similaritas genetik antara keempat isolat *L. edodes* berdasarkan delapan jenis primer adalah antara 0,78–0,86. Hal ini menunjukkan bahwa antara keempat isolat tersebut terdapat variasi genetik, namun demikian antar isolat memiliki tingkat kesamaan yang tinggi karena keempat isolat berada dalam satu jenis. Namun demikian antara empat isolat *L. edodes* dengan *P. ostreatus* (*outgroup*) menunjukkan index similaritas genetik yang rendah yaitu antara 0,18–0,26. Tujuan digunakannya *outgroup* adalah sebagai pembanding hasil indeks similaritas antar satu jenis dan pada jenis yang berbeda. Pada penelitian lain menggunakan teknik RAPD untuk mengetahui variasi genetik antar jenis *Phyllanthus* (intrajenis) diperoleh hasil index similaritas genetik antara 0,12–0,50 (Manissorn, 2010), sedangkan index similaritas pada tingkat cultivar *Camellia* adalah antara 0,57–0,88 (Wang *et al.*, 2010). Penelitian untuk mengetahui variasi genetik pada *L. edodes* juga telah dilakukan oleh Xiao *et al.*, (2010) dengan menggunakan teknik TRAP (*The target region amplification polymorphism*), dan hasilnya menunjukkan terdapat variasi genetik yang besar pada *L. edodes* isolat liar di Cina dengan index similaritas antara 0,50–0,95.

**Tabel 1.** Hasil amplifikasi DNA empat isolat *L. edodes* yang menunjukkan pola polimorfisme.

No.	Primer	Ukuran Pita DNA (bp)	Jumlah Fragmen Teramplifikasi	Jumlah Fragmen Polimorfik	Persentase Polimorfik (%)
1	OPA 1	190-667	7	3	42,86
2	OPA 2	166-1661	12	10	83,33
3	OPA 3	193-1334	10	6	60,00
4	OPA 4	263-750	4	0	0
5	OPA 7	136-1741	9	6	66,67
6	OPA 8	134-1774	6	4	66,67
7	OPA 9	129-1121	7	4	57,14
8	OPA 10	159-1009	8	6	75,00
<b>Jumlah</b>			<b>63</b>	<b>39</b>	<b>61,90</b>

**Tabel 2.** Matrix similaritas genetik empat isolat *L. edodes* dan *P. ostreatus* (*outgroup*).

Isolat	No	1	2	3	4	5
Le-Malang	1	1,0000				
Le-Cianjur	2	0,7961	1,0000			
Le-Lembang	3	0,7767	0,8058	1,0000		
Le-Yogyakarta	4	0,7767	0,7669	0,8640	1,0000	
<i>outgroup</i>	5	0,2330	0,2621	0,2621	0,1845	1,0000



**Gambar 1.** Pola pita DNA *L. edodes* yang diamplifikasi menggunakan primer OPA1, OPA2, OPA3, OPA4, OPA7, OPA8, OPA9 dan OPA10.  
Keterangan : (M) Marker DNA 100 bp, (1) *L. edodes* asal Malang, (2) *L. edodes* asal Cianjur, (3) *L. edodes* asal Lembang, (4) *L. edodes* asal Yogyakarta, (5) *P. ostreatus* (outgroup), (6) Kontrol (tanpa DNA).

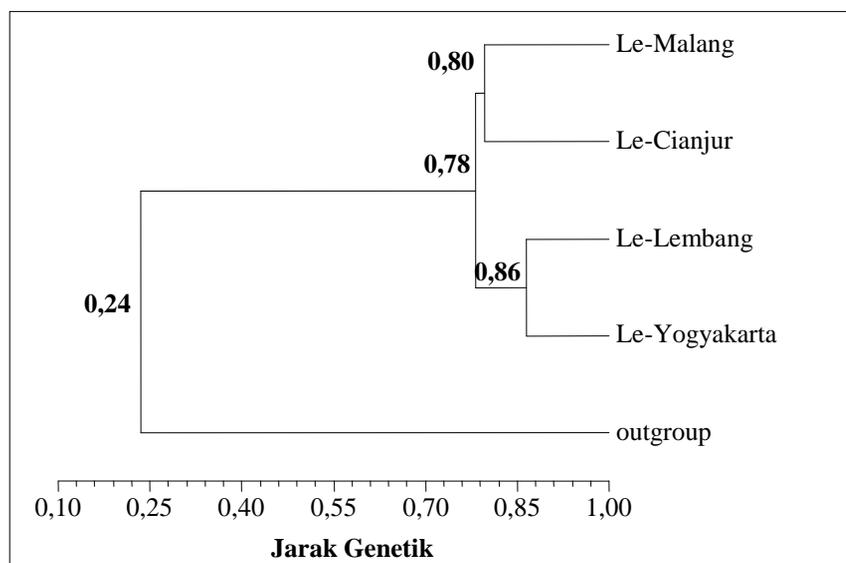
Hubungan kekerabatan dari empat isolat *L. edodes* dan *P. ostreatus* (*outgroup*) diketahui dari data gabungan delapan primer kemudian dianalisis berdasarkan metode klastering UPGMA untuk mengkonstruksi dendrogram. Dendrogram similaritas genetik empat isolat *L. edodes* dan *outgroup* dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil analisis menunjukkan terbentuknya tiga klaster, klaster pertama terdiri atas dua isolat yaitu *L. edodes* asal Malang dan *L. edodes* asal Cianjur dengan tingkat similaritas genetik 80%. Klaster kedua terdiri atas dua isolat yaitu *L. edodes* asal Lembang dan *L. edodes* asal Yogyakarta dengan tingkat similaritas genetik 86%. Klaster ketiga terdiri atas satu isolat yaitu *outgroup* (*P. ostreatus*) dengan tingkat similaritas genetik 24% dan membentuk klaster tersendiri yang terpisah dari keempat isolat. Hal ini karena *L. edodes* dan *outgroup* berbeda marga sehingga menunjukkan tingkat similaritas yang rendah.

Isolat asal Lembang dan Yogyakarta menunjukkan hubungan kekerabatan yang paling dekat. Dari hasil analisis dengan metode klastering UPGMA diketahui bahwa jarak genetik tidak dipengaruhi oleh faktor jarak geografis maupun faktor lingkungan, tetapi berdasarkan pada faktor genetik saja. Isolat *L. edodes* yang berasal dari Lembang, secara geografis lebih dekat dengan isolat dari Cianjur bila dibandingkan dengan isolat dari

Yogyakarta. Namun, isolat dari Lembang menunjukkan hubungan kekerabatan genetik yang lebih dekat dengan isolat dari Yogyakarta dibandingkan dengan isolat dari Cianjur.

Penelitian menggunakan isolat *L. edodes* yang berasal dari Jepang, New Zealand dan Papua New Guinea menunjukkan bahwa isolat *L. edodes* tersebut berbeda secara genetik dengan jarak genetik antara isolat dari Jepang dan New Zealand adalah 0,44; Jepang dan Papua New Guinea 0,46. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa antar lokasi yang berbeda terdapat perbedaan genetik yang tinggi, sehingga isolat tersebut dapat digunakan untuk pengembangan *genetic breeding* (Miyazaki dan Neda, 2004). Penelitian menggunakan teknik RAPD juga telah berhasil membedakan *Olea europaea* tipe liar dan yang sudah dibudidayakan, menunjukkan hasil tingkat similaritas genetik antara 75–93%. Isolat tipe liar yang sudah dibudidayakan menunjukkan tingkat similaritas genetik lebih rendah dibandingkan sesama tipe liar (Sesli dan Yegenoglu, 2010). Hasil penelitian menggunakan jamur *Metarhizium anisopliae* dengan teknik RAPD menunjukkan bahwa tingkat similaritas genetik tidak berhubungan dengan asal isolat yang digunakan, dan teknik ini menunjukkan variasi genetik yang tinggi dengan nilai similaritas hanya 41% (Velasquez *et al.*, 2007).



Gambar 2. Dendrogram similaritas genetik empat isolat *L. edodes* dan *outgroup*.

## Simpulan dan Saran

### Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa antara isolat *L. edodes* (Berk.) Pegler asal Malang, Cianjur, Lembang dan Yogyakarta terdapat variasi genetik dengan jarak genetik antara 78–86%. Ukuran fragmen DNA teramplifikasi berkisar antara 129–1774 bp. Primer yang dapat memberikan hasil polimorfisme tertinggi (83,33%) adalah primer OPA 2.

### Saran

Penelitian ini masih perlu dilanjutkan untuk menguji potensi keempat isolat yang digunakan terkait potensinya sebagai jamur pangan dan obat, sehingga dapat ditentukan jenis isolat yang unggul dengan penanda molekular ukuran pita DNA yang spesifik. Jenis primer yang menunjukkan pola polimorfisme tinggi digunakan untuk mengidentifikasi isolat-isolat *L. edodes* (Berk.) Pegler lainnya dari wilayah Indonesia.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Universitas Gadjah Mada Yogyakarta yang memberikan dana penelitian melalui Hibah Penelitian Mahasiswa Program Doktor Tahun 2009.

## Daftar Pustaka

- Anonim. 2001. *Tinjauan Literatur Jamur, kegunaan dan khasiat*. Pusat Dokumentasi dan Informasi Ilmiah, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Jakarta.
- Aryantha, I.N.P. 2005. Pengembangan produk kesehatan dari shiitake (*Lentinula edodes*). *Makalah Lokakarya Pengembangan Produk dan Industri Jamur Pangan. BPPT, Jakarta*.
- Bardakci, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Turk. J. Biol.*, 25: 185–196.
- Bridge, P.D., Arora, D.K., Reddy, C.A. dan Elander, R.P. 1998. *Applications of PCR in Mycology*. CAB International, New York, USA.
- Gupta, V.K., Pandey, A., Kumar, P., Pandey, B.K., Gaur, R.K., Bajpai, V., Sharma, N. dan Sharma, S. 2010. Genetic characterization of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. By random amplified polymorphic DNA analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (26): 4009–4013.
- Hasan, S.Z., Shafie, M.S. dan Shah, R.M. 2009. Analysis of random amplified polymorphic DNA of *Artemisia capillaries* in east coast of Peninsular Malaysia. *World Applied Sciences J.*, 6 (7): 976–986.
- Kaewchai, S., Wang, H.K., Lin, F.C., Hyde, K.D. dan Soyong, K. 2009. Genetic variation among isolates of *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees in Southern Thailand revealed by ISSR markers and pathogenicity. *Afr. J. Microbiol.*, 3 (10): 641–648.
- Kalmis, E. dan Kalyoncu, F. 2006. Variations in the isolates obtained from basidiospores of commercial mushroom *Lentinula edodes* (shiitake). *Int. J. of Science & Technol.*, 1 (2): 99–103.
- Kasiandari, R.S., Smith, S.E., Scott, E.S. dan Smith, F.A. 2002. Identification of binucleate *Rhizoctonia* as a contaminant in pot cultures of arbuscular mycorrhizal fungi and the development of a PCR-based method of detection. *Mycological Research*, 106 (12): 1417–1426.
- Maki, C.S., Teixeira, F.F., Paiva, E. dan Meirelles, L.D.P. 2001. Analyses of genetic variability in *Lentinula edodes* through mycelia responses to different abiotic conditions and RAPD molecular markers. *Braz. J. Microbiol.*, 32 (3): 1–5.
- Manissorn, J., Ruangrunsi, N., Phadungcharoen, T. dan Sukrong, S. 2010. DNA fingerprinting of selected Thai *Phyllanthus species* by RAPD analysis. *J. Health Res.*, 24 (2): 73–79.
- Miyazaki, K. dan Neda, H. 2004. Evaluation of the use of outbred lines for screening of genetic markers in shiitake (*Lentinula edodes*). *Breeding Science*, 54: 75–78.
- Pereira, F., Carneiro, J. dan Amorim, A. 2008. Identification of species with DNA-base technology: current progress and challenges. *Resent Patents on DNA & Gene Sequences*, 2 (3): 187–200.
- Regula, J. dan Siwulski, M. 2007. Dried shiitake (*Lentinula edodes*) and oyster (*Pleurotus ostreatus*) mushrooms as a good source of nutrient. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 6 (4): 135–142.

Variasi Genetik Berdasarkan Penanda Molekular Random Amplified Polymorphic DNA

- Rohlf, F.J. 2000. *NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1*. Applied Biostatistics, New York.
- Sesli, M. dan Yegenoglu, E.D. 2010. Comparison of Manzanilla and wild type olives by RAPD-PCR analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (7): 986–990.
- Silva, E.S., Cavallazzi, J.R.P., Muller, G. dan Souza, J.V.B. 2007. Biotechnological applications of *Lentinula edodes*. *J. Food Agric. Environ.*, 5 (3&4): 403–407.
- Smith, J.E., Rowan, N.J. dan Sullivan, R. 2002. *Medicinal Mushrooms : Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. Cancer Research UK, University of Strathclyde.
- Sobal, M., Carrera, D.M., Morales, P. dan Roussos, S. 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Mycologia Aplicada International*, 19 (1): 15–23.
- Stamets, P. 2000. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Third Ed., Ten Speed Press, Berkeley, Toronto.
- Sunagawa, M., Neda, H. dan Miyazaki, K. 1995. Identification of *Lentinula edodes* by random amplified polymorphic DNA marker. In: Elliott, T.J. (Eds.) *Mushroom Science XIV: Science and cultivation of edible fungi I*: 141–145.
- Tanaka, A., Miyazaki, K., Murakami, H. dan Shiraishi, S. 2004. Sequence characterized amplified region markers tightly linked to the mating factors of *Lentinula edodes*. *Genome*, 47: 156–162.
- Velasquez, V.B., Carcamo, M.P., Merino, C.R., Iglesias, A.F. dan Duran, J.F. 2007. Intraspecific differentiation of Chilean isolates of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* as revealed by RAPD, SSR and ITS markers. *Genet. Mol. Biol.*, 30 (1): 89–99.
- Wang, X.F., Zheng, W.H., Zheng, H.X., Xie, Q.Q., Zheng, H.Y., Tang, H. dan Tao, Y.L. 2010. Optimization of RAPD-PCR reaction system for genetic relationships analysis of 15 camellia cultivars. *Afr. J. Biotechnol.*, 9 (6): 798–804.
- Wasser, S.P. dan Weis, A.L. 2003. Medicinal Properties of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: Current Perspective (Review). *Int. J. Med. Mushrooms*, 1: 31–33.
- Xiao, Y., Liu, W., Lu, Y.Y., Gong, W.B. dan Bian, Y.B. 2010. Applying target region amplification polymorphism markers for analyzing genetic diversity of *Lentinula edodes* in China. *J. Basic Microb.*, 50 (5): 475–483.
- Yuwono, T. 2006. *Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction, Panduan eksperimen PCR untuk memecahkan masalah biologi terkini*. Penerbit Andi, Yogyakarta.