

KARAKTERISTIK GENETIK *Kappaphycus alvarezii* SEHAT DAN TERINFEKSI PENYAKIT *ICE-ICE* DENGAN METODE *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)

Emma Suryati^{*)}, Lida Puspaningtyas^{**)}, Utut Widyastuti^{**, ***}) dan Suharsono^{**, ***})

^{*)} Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau
Jl. Makmur Dg. Sitakka No. 129, Maros 90512, Sulawesi Selatan
E-mail: litkanta@indosat.net.id

^{**)} Departemen Biologi, Institut Pertanian Bogor
Jl. Agatis, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680

^{***}) Pusat Penelitian Sumberdaya Hayati & Bioteknologi
Jl. Kamper, Kampus IPB, Darmaga, Bogor 16680

(Naskah diterima: 12 November 2012; Disetujui publikasi: 25 Maret 2013)

ABSTRAK

Infeksi penyakit *ice-ice* pada *Kappaphycus alvarezii* seringkali menyebabkan penurunan produksi yang sangat signifikan. *K. alvarezii* merupakan alga merah penghasil karaginan yang memiliki nilai ekonomi tinggi dan banyak dimanfaatkan dalam berbagai industri, seperti farmasi, makanan, *stabilizer*, dan kosmetik. Perbaikan genetik sangat diperlukan untuk meningkatkan produksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik kemiripan genetik *K. alvarezii* sehat dan terinfeksi penyakit dari Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau (BPPBAP), Maros dengan metode *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Pada penelitian ini juga dianalisis *K. alvarezii* asal Bone (BNE), Gorontalo (GRL), Tambalang (TMB), dan Kendari (KND) sebagai kontrol rumput laut sehat. Metode AFLP menggunakan enzim restriksi PstI dan MseI, preamplifikasi dan amplifikasi selektif diawali dengan isolasi DNA, uji genimoc DNA, restriksi dan ligasi. Hasil yang diperoleh menunjukkan penggunaan marker AFLP dengan primer *forward* P11 dan primer *reverse* M48, M49 dan M50 terhadap *K. alvarezii* yang berasal dari Takalar (TKL), dan Mataram (MTR), tanpa infeksi (sehat) dan terinfeksi penyakit Takalar *ice* (TKL+), Mataram *ice* (MTR+), serta *K. alvarezii* kontrol (BNE), (GRL), (TMB), dan (KND) menghasilkan 519 fragmen dalam 122 lokus dengan ukuran 50 - ~370 pb. Kemiripan genetik *K. alvarezii* yang terinfeksi penyakit *ice-ice* lebih rendah jika dibandingkan dengan yang sehat. Kemiripan genetik *K. alvarezii* dari Takalar sehat (TKL) dan terinfeksi *ice-ice* (TKL+) adalah 0,8176 dan MTR-MTR+ adalah 0,8033.

KATA KUNCI: identifikasi fragmen, *Kappaphycus alvarezii*, penyakit *ice-ice*, AFLP

ABSTRACT: *Genetic characteristics Kappaphycus alvarezii healthy and infected disease ice-ice by Amplified Fragment Length Polymorphism Methods (AFLP). By: Emma Suryati, Lida Puspaningtyas, Utut Widyastuti, and Suharsono*

Ice-ice infection in Kappaphycus alvarezii often lead to a very significant reduction in production. K. alvarezii a carrageenan-producing red algae that have high economic value and widely used in various industries, such as pharmaceutical, food, stabilizer, and cosmetics. Genetic improvement is needed to increase production.

This study aimed to investigate the characteristics of genetic similarity *K. alvarezii* healthy and infected with diseases from the Institute for Research and Development of Brackish water Aquaculture (BPPBAP) Maros with Amplified Fragment Length Polymorphism method (AFLP). In this study also analyzed *K. alvarezii* from Bone (BNE), Gorontalo (GRL), Tambalang (TMB), and Kendari (KND) as seaweed healthy controls. AFLP method using restriction enzymes *Pst*I and *Mse*I, pre-amplification and selective amplification of DNA starting with isolation, genimoc test DNA, restriction digestion and ligation. The results obtained demonstrate the use of AFLP markers with the forward primer P11 and reverse primer M48, M49 and M50 to *K. alvarezii* from Takalar (TKL), and Mataram (MTR), without infection (healthy) and infected with Takalar ice (TKL+), Mataram ice (MTR+) and *K. alvarezii* control (BNE), (GRL), (TMB), and (KND) produced 519 fragments in the 122 loci with a 50 - ~370 pb. Genetic similarity infected *K. alvarezii* ice-ice diseases is lower when compared to the healthy. Takalar *K. alvarezii* genetic similarity of sound (TKL) and ice-ice infected (TKL+) is 0.8176 and the (MTR)-(MTR+) is 0.8033.

KEYWORDS: *genetic similarity, Kappaphycus alvarezii, ice-ice disease, AFLP*

PENDAHULUAN

Kappaphycus alvarezii merupakan alga merah penghasil karaginan yang memiliki nilai ekonomi tinggi. Penggunaannya sebagai bahan dasar untuk industri makanan seperti agar-agar, *ice cream*, *stabilizer*, bahan kosmetik, dan farmasi (Guerrero, 2001). Namun demikian alga merah *K. alvarezii* tersebut mudah terserang penyakit, salah satunya adalah penyakit *ice-ice*. Penyakit ini menyerang alga saat mengalami cekaman lingkungan, seperti perubahan suhu yang drastis, salinitas rendah, dan intensitas cahaya (Largo *et al.*, 1999). Infeksi *ice-ice* ditandai oleh warna batang (thalli) alga yang memutih atau memudar, berlendir dan diselimuti oleh kotoran seperti tepung putih, kulit luar atau epidermis terkelupas sehingga terlihat jaringan dalam/medulla thalli (Yulianto, 2001). Dilaporkan bahwa *Vibrio* sp. adalah bakteri yang memiliki aktivitas patogen sehingga menyebabkan bagian permukaan dari cabang *Kappaphycus/Eucheuma* memutih dan mengeras seperti es (Largo *et al.*, 1995).

Eucheuma denticulatum juga dapat terserang penyakit *ice-ice*. Namun, menurut Tisera & Naguit (2009), *K. alvarezii* dan *E. denticulatum* memiliki tingkat perbedaan resistensi terhadap penyakit *ice-ice* berdasarkan waktu atau bulan terinfeksi dan lokasi. *E. denticulatum* lebih resisten dan tidak mudah terinfeksi *ice-ice*. Sementara pada *K. alvarezii* belum dilaporkan keberadaan gen yang resisten terhadap penyakit tersebut. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian awal untuk melihat perbedaan karakter genetik algae terhadap ketahanan *ice-ice* pada *Kappaphycus*.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) merupakan jenis penanda yang didasarkan pada amplifikasi selektif potongan DNA hasil restriksi genom total dengan enzim restriksi endonuklease. Prinsip utama AFLP terdiri dari empat langkah, yaitu: preparasi DNA cetakan, restriksi dan ligasi, pre-amplifikasi dan amplifikasi selektif. Visualisasi fragmen dilakukan dengan gel poliakrilamid. Polimorfisme yang terdeteksi berupa ada atau tidak ada pita yang dimiliki oleh masing-masing individu, sehingga AFLP termasuk ke dalam marka dominan (Mueller & Wolfenberger, 1999).

Teknik AFLP memiliki beberapa keunggulan dibanding penanda DNA lainnya. Keunggulan teknik AFLP antara lain: (1) tidak memerlukan informasi sekuen dari genom dan perangkat (*kit*) oligonukleotida yang sama ketika dilakukan analisis dan dapat diaplikasikan pada semua organisme termasuk rumput laut; (2) hasil amplifikasinya bersifat stabil, tingkat pengulangan, dan variabilitasnya sangat tinggi; (3) sangat efisien dalam pemetaan lokus karena dapat meliputi beberapa lokus dalam satu kali amplifikasi; (4) dapat digunakan untuk menganalisis sidik jari semua DNA dengan mengabaikan kompleksitas dan asal-usulnya; (5) serta dapat bertindak sebagai jembatan informasi antara peta genetik dan peta fisik pada kromosom (Vos *et al.*, 1995). Namun, teknik AFLP memerlukan biaya tinggi dan interpretasi hasil sering kali relatif kompleks dan rumit.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik alga *K. alvarezii* yang terinfeksi penyakit *ice-ice* dibandingkan dengan yang tidak terinfeksi dari koleksi BPPBAP Maros

dengan menggunakan metode *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP). Sehingga hasil yang diperoleh dapat digunakan untuk mendapatkan kandidat gen resisten terhadap *ice-ice* yang selanjutnya dapat digunakan untuk menanggulangi penyakit tersebut.

BAHAN DAN METODE

Persiapan Sampel

Rumput laut yang diuji adalah *K. alvarezii* sehat dan yang terinfeksi penyakit *ice-ice* masing-masing berasal dari Takalar (TKL) dan (TKL+), Mataram (MTR) dan (MTR+). Dalam analisis ini disertakan dari jenis *K. alvarezii* sehat berasal dari Gorontalo (GRL), Tambalang (TMB), Mataram (MTR), Kendari (KND), dan Bone (BNE) sebagai kontrol.

Isolasi DNA

Sampel *K. alvarezii* sehat dan terinfeksi yang telah diidentifikasi karakteristiknya kemudian dilakukan ekstraksi DNA. DNA genom diisolasi dengan mengikuti metode Doyle & Doyle (1987) yang dimodifikasi dengan langkah sebagai berikut: 0,5 gram sampel digerus dengan menambah nitrogen cair, kemudian sampel halus dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 700 µL larutan penyangga [CTAB 2% (b/v), 75 mM Tris HCL, 15 mM EDTA, 0,5 M NaCl pH 8.0]. Suspensi diinkubasi di penangas air dengan *shaker* pada kecepatan 120 getaran/menit pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit, supernatan dicampur dengan 20 µL RNase (10 mg/mL) lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit. Supernatan didiamkan dalam es selama 30 menit dan disentrifugasi kembali pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan ditambahkan 700 µL isopropanol kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 30 menit. Pelet yang diperoleh dibersihkan dengan cara menambahkan 500 µL etanol 70% (v/v) dan disentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 10 menit. Proses pembersihan ini dilakukan sebanyak tiga kali, dan pelet dikeringkan menggunakan vakum selama kurang lebih satu jam. Pelet kering yang merupakan genom DNA ditambahkan 20 µL dan disimpan pada suhu 4°C untuk analisa lebih lanjut.

Uji Kualitas dan Kuantitas DNA

Uji genomic DNA yang meliputi kualitas dan kuantitas DNA dilakukan dengan elektroforesis untuk melihat kemurnian DNA hasil isolasi tanpa degradasi dan kontaminasi DNA dan selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm.

Analisis AFLP

Analisis AFLP menggunakan metode Vos *et al.* (1995) yang dimodifikasi pada pelabelan primer.

Restriksi dan Ligasi. Persiapan DNA *template* dimulai dengan memilih DNA *template* yang digunakan untuk restriksi. Enzim yang digunakan adalah enzim *Pst*I dan *Mse*I AFLP adapter. DNA dicampur dengan 5 U *Pst*I dan 5 U enzim restriksi *Mse*I. Ligasi dilakukan dengan menambahkan 3 U/µL T4 DNA ligase, kemudian didilusi menggunakan TE buffer (pH 8.0) dan disimpan pada suhu -20°C.

Pre-amplifikasi. Pre-amplifikasi dilakukan melalui program PCR sebanyak 24 siklus. Produk dari pre-amplifikasi didilusi dan diambil 5 µL sebagai DNA *template* untuk selanjutnya dilakukan amplifikasi selektif. Primer AFLP yang digunakan pada tahap pre-amplifikasi adalah *Pst*I (5'-GACTGCGTACATGCAG3') dan *Mse*I (5'-GATGAGTCCTGAGTAAC3').

Amplifikasi Selektif. Amplifikasi selektif menggunakan empat kombinasi primer, yaitu primer *Pst*I (P11) dengan sekuen 5'-GACTGC GTACATGCAGAA3' dan *Mse*I dengan sekuen M48 5'-GATGGAGTCCTGAGTAACAC 3', M49 5'-GATGGAGTCCTGAGTAACAG 3', M50 5'-GATGA GTCCTGAGTAACAT 3'.

Visualisasi Fragmen. Elektroforesis hasil amplifikasi selektif menggunakan gel poliakrilamid 6% dengan peralatan *LI-COR DNA Analyzer*. Gel yang digunakan untuk elektroforesis dibuat dengan mencampur polyacrilamid 20 mL KB plus 6,5%; 15 µL *Tetramethylethylenediamine* (TEMED) dan 150 µL *Amonium persulfat* (APS) 10% (b/v). Campuran tersebut dimasukkan pada plat kaca dan didiamkan selama satu jam hingga membeku. Plat kaca yang berisi poliakrilamid gel kemudian dipasang pada peralatan elektroforesis kemudian ditambahkan buffer TBE 1x. Produk amplifikasi selektif sebanyak 10 µL, ditambah dengan 10 µL *loading buffer* formamid 2x formamid 98% b/v, EDTA 10 mM, bromofenol

biru 0,025% (b/v). Campuran tersebut didenaturasi pada suhu 90°C selama tiga menit dan segera diinkubasi ke dalam es selama 60 menit. Permukaan plat kaca dibersihkan dan dipasang pada sequenser *LI-COR DNA Analyzer*, kemudian sisir dipasang pada gel. Sebanyak 1 µL sampel dimasukkan kedalam sela-sela sisir, dielektroforesis selama 180 menit dengan daya 12 watt, 1.500 volt sehingga pita dapat terseparasi dan dideteksi melalui komputerisasi.

Analisis Data

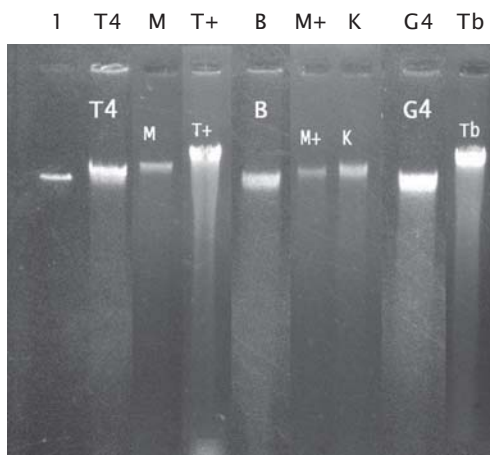
Analisis similaritas. Hasil pengamatan morfologi diskoring dan diubah ke dalam data biner. Satu sifat diasumsikan dikendalikan oleh satu lokus. Data pita hasil amplifikasi DNA dengan metode AFLP diterjemahkan kedalam data biner dengan ketentuan nilai 0 jika tidak ada pita dan nilai 1 jika ada pita. Pita-pita yang terbentuk dari hasil amplifikasi dianggap sebagai satu karakter. Semua pita DNA dengan laju migrasi yang sama diasumsikan sebagai lokus yang homolog. Data AFLP dengan menggunakan tiga primer selektif, M-AC, M-AG, dan M-AT diolah dengan NTSYSpc versi 2.02i dengan proses *Similarity for Qualitative Data (SIMQUAL)* dan dihitung berdasarkan metode *Simple Matching Coefficient (SM)* (Rohlf, 1998).

Analisis Cluster. Data AFLP dari rumput laut dengan menggunakan tiga primer selektif selanjutnya dianalisis dengan menggunakan *Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested (SAHN) Unweighted Pair Group Method Arithmetic (UPGMA)* pada program NTSYSpc versi 2.02i. Hasil analisis disajikan dalam bentuk dendrogram.

HASIL DAN BAHASAN

Isolasi DNA dan Uji Genomic (Kualitas dan Kuantitas) DNA

DNA genom rumput laut yang diisolasi menggunakan metode Doyle-Doyle (1987) menghasilkan kualitas DNA yang baik. Hal ini ditandai dengan DNA genom berukuran besar dan terdapat di bagian atas gel dan menunjukkan berat molekul yang besar, sehingga menandakan DNA genom yang diisolasi relatif utuh serta memiliki kualitas yang baik (Gambar 1). Hasil pengujian kuantitas dengan menggunakan spektrofotometer UV menunjukkan bahwa DNA genom memiliki kuantitas DNA genom rata-rata sebesar 100 ng/µL (Tabel 1). Kualitas DNA yang baik juga ditandai dengan



Gambar 1. DNA genom dari *K. alvarezii* yang diseparasi dengan gel agarosa 1%. M = marker DNA genom lamda 50 ng/µL, T4 = Takalar (TKL), M = Mataram (MTR), T+ = Takalar *ice-ice* (TKL+), B = Bone (BNE), M+ = Mataram *ice-ice* (MTR+), K = Kendari (KND), G4 = Gorontalo (GRL), Tb = Tambalang (TMB)

Figure 1. DNA genome of *K. alvarezii* separated by 1% agarose gel. M = marker DNA genomic lamda 50 ng/µL, T4 = Takalar (TKL), M = Mataram (MTR), T+ = Takalar *ice-ice* (TKL+), B = Bone (BNE), M+ = Mataram *ice-ice* (MTR+), K = Kendari (KND), G4 = Gorontalo (GRL), Tb = Tambalang (TMB)

perbandingan nilai absorbansi pada panjang gelombang 260/280 nm lebih besar 1.8.

Amplifikasi DNA dengan AFLP

K. alvarezii yang digunakan untuk analisis karakteristik genetik berasal dari BPPBAP (Balai Penelitian dan Pengembangan Budidaya Air Payau) Maros terdiri atas *K. alvarezii* sehat dan yang terinfeksi penyakit *ice-ice*, masing-masing berasal dari Takalar (TKL dan TKL+) dan Mataram (MTR dan MTR+). Dalam analisis ini juga disertakan *K. alvarezii* yang berasal dari Gorontalo (GRL), Tambalang (TMB), Kendari (KND), dan Bone (BNE) sebagai kontrol.

Total fragmen yang teramplifikasi dari analisis AFLP dengan semua kombinasi primer yang dibatasi pada ukuran 50 - ~370 pb disajikan pada Tabel 1, meskipun fragmen DNA

Tabel 1. Konsentrasi DNA genom dari *K. alvarezii* yang diukur pada panjang gelombang 260 nm

Table 1. Concentrations of genomic DNA from *K. alvarezii* measured with the length wave of 260 nm

Asal rumput laut Seaweed origin	Kode Code	Konsentrasi Concentration (ng/μL)
Gorontalo	GRL	227.5
Takalar	TKL	192.5
Takalar+ice	TKL+	122.5
Mataram	MTR	280
Mataram+ice	MTR+	105
Kendari	KND	192.5
Bone	BNE	192.5
Tambalang	TMB	122.5

dari *K. alvarezii* yang positif terinfeksi nampak pada ukuran lebih kecil dari 50 pb dan lebih besar dari 370 pb. Fragmen DNA di bawah 50 pb terlihat sangat rapat dan fragmen di atas 370 pb sangat jarang (Gambar 2). Jumlah total fragmen DNA dari delapan sampel dengan tiga kombinasi primer adalah sebanyak 519 fragmen yang berukuran 50 - ~370 pb. Fragmen-fragmen tersebut terdapat di dalam 122 lokus.

Jumlah fragmen DNA yang teramplifikasi antara *K. alvarezii* yang terinfeksi *ice-ice* dan yang sehat dari dua daerah berbeda menunjukkan bahwa *K. alvarezii* yang berasal dari Takalar dan Mataram dan terinfeksi *ice-ice* memiliki jumlah fragmen yang lebih sedikit daripada yang tidak terinfeksi (sehat).

Pada *K. alvarezii* dari Takalar yang terinfeksi *ice-ice* memiliki total 47 fragmen dengan ukuran antara 50 - ~370 pb, sedangkan *K. alvarezii* sehat juga memiliki total fragmen yang sama (47) tetapi berbeda posisi lokus yang teramplifikasi. Sementara, pada *K. alvarezii* yang berasal dari Mataram dan terinfeksi *ice-ice* memiliki total 84 fragmen, sedangkan *K. alvarezii* yang sehat hanya mempunyai 86 fragmen. Nampak bahwa jumlah fragmen DNA yang ada pada *K. alvarezii* terinfeksi *ice-ice* lebih sedikit daripada yang sehat (Tabel 2).

Pasangan primer P11-M48 menghasilkan lebih banyak fragmen DNA (401 fragmen) dibandingkan pasangan primer yang lainnya yaitu sebanyak 299 fragmen. Hal ini mengindikasikan bahwa pasangan primer ini lebih banyak mengenali nukleotida sehingga DNA

genom yang teramplifikasi lebih banyak. Pasangan primer P11-M49 menghasilkan 141 fragmen dari total 122 lokus dan pasangan P11-M50 menghasilkan 79 fragmen. Pasangan primer P11-M50 menghasilkan fragmen paling sedikit, hal ini diduga karena fragmen DNA yang terdapat pada genom *K. alvarezii* sedikit yang mengandung tambahan AT setelah situs restriksi *MseI* (Gambar 2).

Selanjutnya fragmen yang dihasilkan diubah menjadi data biner, dengan nilai 1 bila terdapat pita dan nilai 0 untuk tidak adanya pita. Keberadaan pita yang terbentuk dianggap merupakan satu lokus. Hasil yang diperoleh dari data biner kemudian digunakan untuk analisis pengelompokan menggunakan NTSYSpc 2.02 untuk menghasilkan dendrogram yang menunjukkan keragaman genetik sampel.

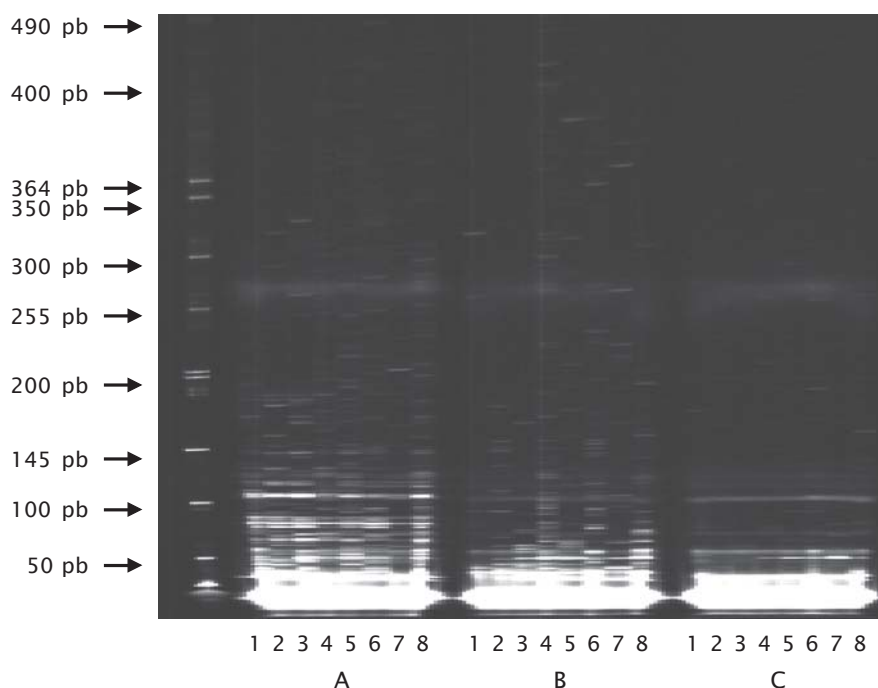
Analisis Kemiripan Genetik *Kappaphycus alvarezii* Normal dan Terinfeksi Penyakit *Ice-ice*

Analisis kemiripan genetik sampel *ice-ice* dibandingkan dengan sampel sehat yang berasal dari daerah yang sama (Takalar dan Mataram) membentuk 3 kelompok pada koefisien 0,84 (Gambar 3). Kelompok pertama tersusun dari TKL dan MTR, kelompok kedua adalah MTR+ dan kelompok ketiga adalah TKL+. Sampel normal berada dalam satu kelompok dan memiliki koefisien kemiripan terbesar yaitu 0,85 (Tabel 3). Dendrogram ini menunjukkan adanya perbedaan variasi genetik yang mengindikasikan adanya perbedaan susunan

Tabel 2. Jumlah dan sebaran fragmen DNA yang teramplifikasi dengan marker AFLP pada *K. alvarezii*

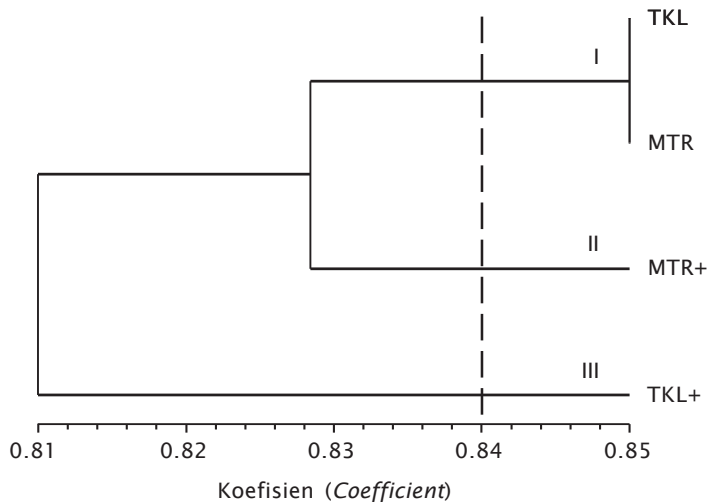
Table 2. Number and distribution of DNA fragments amplified by AFLP marker on *K. alvarezii*

Sampel Sample	50-145 pb			145-300 pb			300-370 pb		
	P11-M48	P11-M49	P11-M50	P11-M48	P11-M49	P11-M50	P11-M48	P11-M49	P11-M50
TKL	32	5	5	2	1	1	0	1	0
GRL	32	14	5	2	0	0	1	0	0
TKL+	31	8	3	4	0	0	1	0	0
MTR	27	26	7	9	13	1	2	1	0
MTR+	37	15	10	13	4	1	2	1	1
TMB	27	18	14	10	4	3	1	3	2
KND	12	6	12	5	3	1	1	1	0
BNE	31	13	11	14	2	1	3	1	1
Total	401			94			24		



Gambar 2. Profil fragmen AFLP hasil amplifikasi DNA *K. alvarezii* menggunakan 3 kombinasi primer. (A) P11-M48, (B) P11-M49, dan (C) P11-M50, dengan menggunakan penanda ukuran standar 50-700 pb. Label sampel adalah (1) TKL, (2) GRL, (3) TMB, (4) TKL+, (5) MTR, (6) MTR+, (7) KND, (8) BNE

Figure 2. Profile of AFLP fragments of DNA amplification results *K. alvarezii* using 3 primer combinations. (A) P11-M48, (B) P11-M49, and (C) P11-M50, using standard size markers of 50-700 bp. Label samples are (1) TKL, (2) GRL, (3) TMB, (4) TKL+, (5) MTR, (6) MTR+, (7) KND, (8) BNE



Gambar 3. Dendrogram kemiripan *K. alvarezii* sehat dan terinfeksi *ice-ice* berasal dari Takalar dan Mataram berdasarkan 122 lokus dengan teknik analisis AFLP (50 - ~ 370 pb)

Figure 3. *K. alvarezii* similarity dendrogram healthy and *ice-ice* infection from Mataram, Takalar, and based on 122 loci with AFLP analysis techniques (50 - ~ 370 pb)

Tabel 3. Matrix kemiripan genetik berdasarkan pola fragmen DNA yang teramplifikasi menggunakan 3 kombinasi primer selektif dari 122 lokus pada *K. alvarezii* sehat dan terinfeksi *ice-ice* dengan teknik AFLP

Table 3. Genetic similarity matrix based on the pattern of DNA fragments were amplified using 3 selective primer combination of 122 loci on *K. alvarezii* healthy and *ice-ice* infected with AFLP technique

	TKL	TKL+	MTR	MTR+
TKL	1.0000			
TKL+	0.8176	1.0000		
MTR	0.8504	0.7951	1.0000	
MTR+	0.8504	0.8074	0.8033	1.0000

genetik pada keadaan sehat dan terinfeksi penyakit. Koefisien kemiripan yang rendah menunjukkan cukup adanya keragaman pada sampel yang terinfeksi penyakit *ice-ice* jika dibandingkan sampel sehat. Keragaman ini dapat terjadi sebagai bagian dari adaptasi sampel terhadap serangan penyakit. Oleh karena itu, akan sangat menarik untuk melihat fragmen pita mana saja yang menyebabkan perubahan pada kedua organisme yang sehat dan yang sakit.

Menurut Tisera & Naguit (2009), *K. alvarezii* dan *E. denticulatum* menunjukkan tingkat resistensi yang berbeda terhadap penyakit *ice-ice* berdasarkan waktu (bulan) terinfeksi. *E. denticulatum* lebih resisten dan tidak mudah terinfeksi. Hal ini terjadi karena *K. alvarezii* mempunyai permukaan thalli yang lebih kasar sehingga memudahkan epifit, parasit, mikroorganisme termasuk bakteri patogen menempel dan akhirnya menyebabkan penyakit *ice-ice*. Oleh karena itu, akan sangat menarik

untuk melihat fragmen DNA yang dihasilkan dari AFLP pada *E. denticulatum* untuk kemudian dibandingkan dengan *K. alvarezii*.

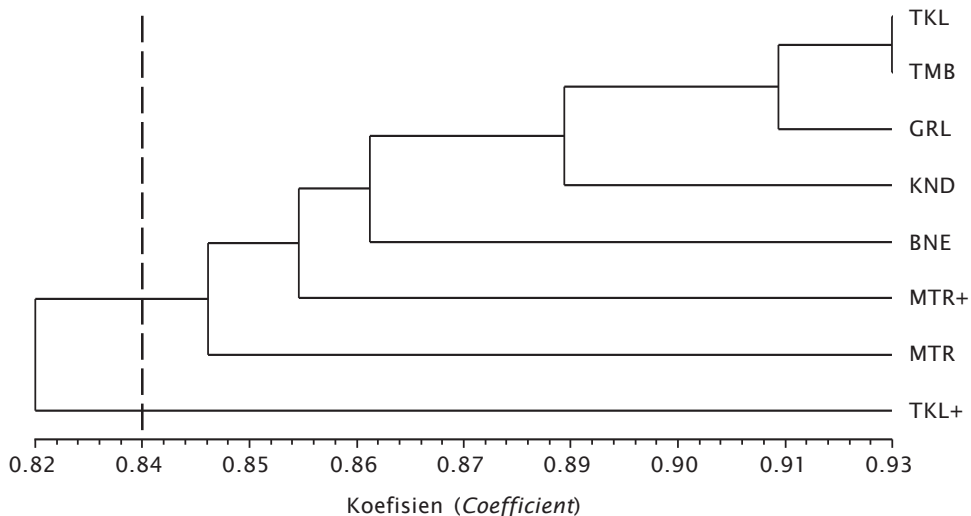
Analisis Kemiripan Genetik *Kappaphycus alvarezii* dari Enam Wilayah

Bila dihubungkan dengan 4 daerah yang lain (Gorontalo, Tambalang, Kendari, dan Bone) maka dendrogram kemiripan *K. alvarezii* yang dianalisis berdasarkan 122 lokus terlihat pada Gambar 4. Adanya persamaan dan perbedaan dalam fragmen DNA dan teramplifikasi dari analisis AFLP menyebabkan keseluruhan *K. alvarezii* yang sehat dan teramplifikasi dari 6 daerah membentuk dua kelompok 1 kelompok dengan 2 sub kelompok dengan koefisien kemiripan 0,84.

Kelompok pertama terdiri atas TKL, TMB, GRL, KND, BNE, dan MTR+. Kelompok kedua dan ketiga masing-masing hanya MTR dan TKL+. Kelompok I terpisah dengan kelompok II sesuai dengan asal wilayah sampel. Kelompok I merupakan sampel asal Sulawesi dan kelompok II dari Nusa Tenggara Barat. Variasi genetik TKL+ di kelompok III memiliki perbedaan dengan sampel lain karena merupakan salah satu sampel yang terinfeksi penyakit *ice-ice*. Total fragmen teramplifikasi yang dimiliki oleh TKL+ ialah 47 fragmen yang diasumsikan menyebabkannya terpisah dari kelompok I dan

II. Beberapa karakter dalam fragmen yang berperan dalam pengelompokan kemungkinan berada di beberapa fragmen yang dimiliki oleh TKL+ sehingga cukup membedakannya dari kelompok lain.

Dendrogram kemiripan delapan sampel menunjukkan TKL dan TMB dengan asal daerah berbeda memiliki koefisien kemiripan paling tinggi yaitu 0,92 sedangkan TKL dan BNE dengan asal daerah sama (Sulawesi Selatan) memiliki koefisien kemiripan yang lebih rendah sebesar 0,86 (Tabel 4). Hal ini disebabkan perbanyakan alga jenis ini lebih umum menggunakan cara vegetatif dengan stek dari thallus yang masih muda. Perbanyakan vegetatif menyebabkan variasi genetik tidak berbeda jauh dengan induknya sehingga jarak genetik akan rendah. Kemiripan genetik yang tinggi akan seiring dengan keragaman genetik yang rendah. Perbanyakan secara vegetatif umumnya sering dilakukan dalam usaha budidaya, hal ini mengakibatkan keragaman genetik individu rendah sehingga peluang untuk menghasilkan kultivar baru hasil persilangan sangat kecil. Reproduksi rumput laut secara generatif terjadi secara alami apabila kondisi lingkungan memenuhi syarat untuk membentuk zigot dari sperma rumput laut jantan dan sel telur rumput laut betina (Parenrengi & Sulaeman, 2007).



Gambar 4. Dendrogram kemiripan *K. alvarezii* sehat dan terinfeksi *ice-ice* berdasarkan 122 lokus dengan marker AFLP (50 - ~ 370 pb) dengan asal daerah berbeda

Figure 4. Dendrogram similarity healthy and infected *K.alvarezii ice-ice* based on 122 loci with AFLP markers (50 - ~ 370 pb) with different regions of origin

Tabel 4. Matrix kemiripan genetik *K. alvarezii* berdasarkan pola fragmen DNA menggunakan 3 kombinasi primer selektif dari 122 lokus yang teramplifikasi pada marker AFLP dengan asal daerah berbeda

Table 4. *K. alvarezii* genetic similarity matrix based on the pattern of DNA fragments using selective primer combination 3 of 122 loci were amplified in AFLP marker with different regions of origin

	TKL	GRL	TMB	TKL+	MTR	MTR+	KND	BNE
TKL	1.0000							
GRL	0.9057	1.0000						
TMB	0.9201	0.9037	1.0000					
TKL+	0.8176	0.8258	0.8238	1.0000				
MTR	0.8504	0.8463	0.8607	0.7951	1.0000			
MTR+	0.8504	0.8668	0.8402	0.8074	0.8033	1.0000		
KND	0.8893	0.8730	0.8832	0.8053	0.8258	0.8299	1.0000	
BNE	0.8668	0.8504	0.8607	0.8156	0.8238	0.8361	0.8504	1.0000

KESIMPULAN

- Total fragmen yang teramplifikasi dari tiga kombinasi primer P11 dan M48, M49, M50 adalah 519 fragmen pada ukuran 50 - ~370 pb dengan jumlah sebanyak 122 lokus.
- Pada *K. alvarezii* dari Mataram yang terinfeksi penyakit *ice-ice* (MTR+) menghasilkan jumlah pita yang lebih sedikit bila dibandingkan dengan yang sehat MTR, sementara untuk TKL+ walaupun memiliki jumlah fragmen yang sama dengan yang sehat (TKL) tetapi fragmen yang teramplifikasi berbeda lokusnya.
- Analisis pengelompokan untuk *K. alvarezii* dengan marker AFLP menghasilkan 2 kelompok, kelompok pertama terdiri atas 2 sub kelompok yaitu (TKL, TMB, GRL, KND, BNE, dan MTR+) dan MTR dengan koefisien 0,84; sedangkan kelompok kedua adalah TKL+.
- Kemiripan genetik *K. alvarezii* menunjukkan hasil yang tinggi dengan koefisien kemiripan berkisar antara 0,7951-0,9210. Kemiripan genetik *K. alvarezii* yang terinfeksi penyakit *ice-ice* lebih rendah jika dibandingkan dengan sampel sehat, ditunjukkan dari *K. alvarezii* berasal dari Takalar sehat dan terinfeksi *ice-ice* adalah 0,8176 dan *K. alvarezii* asal Mataram sehat dan terinfeksi *ice-ice* adalah 0,8033.

DAFTAR ACUAN

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

Guerrero Rafael, D. 2001. Farming of Carrageenophytes in the Philippines: A Success Story of Red Seaweeds Cultivation. Bangkok: APAARI Publication.

Largo, D.B., Fukami, K., & Nishijima, T. 1995. Occasional pathogenic bacteria promoting *ice-ice* disease in the carrageenan-producing red algae *Kappaphycus alvarezii* and *Euchema denticulatum* (Solieriaceae, Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 7: 545-554.

Largo, D.B., Fukami, K., & Nishijima, T. 1999. Time-dependent attachment mechanism of bacterial pathogen during *ice-ice* infection in *Kappaphycus alvarezii* (Gigartinales, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 11: 129-136.

Mueller, U.G. & Wolfenberger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. Elsevier Science Ltd. All rights reserved. *Trends in Ecology & Evolution*, Volume 14, Issue, 10: 389-394.

Parenrengi, A. & Sulaeman. 2007. Mengenal rumput laut *Kappaphycus alvarezii*. *Akuatultur*, 2(1): 142-146.

Rohlf, F.J. 1998. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02. Exeter Software, Setauket, New York.

Spooner, J., Van Treuren, R., & De Vicente, M.C. 2005. Molecular marker for genebank management. *IPGRI Tech Bulletin*, 10: 1-14.

Tisera, W.L. & Naguit, M.R.A. 2009. *Ice-ice* disease occurrence in seaweed farms in bais bay, negros oriental and zamboanga del

- norte. *The Threshold*, 4: 1-16.
- Vos, P. *et al.* 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.*, 23: 4,407-4,414.
- Wattier, R.A., Prodohl, P.A., & Maggs, C.A. 2000. DNA Isolation Protocol for Red Seaweed (Rhodophyta). *Plant Molecular Biology Reporter*, 18: 275-281.
- Yulianto, K. 2001. Pengamatan penyakit *ice-ice* dan alga kompetitor; fenomena penyebab kegagalan panen budidaya rumput laut (*Kappaphycus alvarezii*) di Pulau Pari, Kepulauan Seribu. *Prosiding Seminar Riptek Kelautan Nasional*; Jakarta, 2001, hlm. 100-103.