

**IDENTIFIKASI MARKA RGA (RESISTANCE GENE ANALOG) UNTUK SIFAT KETAHANAN
BUSUK PANGKAL BATANG PADA PLASMA NUTFAH LADA (*Piper nigrum*)
*Identification of RGA Marker for Foot Rot Disease Resistance Character on
Black Pepper Germplasm***

Sri Koerniati dan Dwinita W Utami

Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian
Jalan Tentara pelajar 3A, Bogor 16111
srikoerniati@gmail.com

(diterima 25 Oktober 2013, direvisi 13 Desember 2013, disetujui 21 Desember 2013)

ABSTRAK

Metoda seleksi bahan tanaman lada (*Piper nigrum*) tahan penyakit busuk pangkal batang (BPB) secara cepat sangat diperlukan oleh pemulia tanaman lada. Motif *Nucleotide Binding Site* (NBS) P-loop, kinase2, GLPL, MDHV, dan *Leucine-rich repeat* (LRR) dari gen ketahanan pada *Arabidopsis* bersifat *conserved* dan telah digunakan untuk mengidentifikasi *Resistance Gene Analog* (RGA) pada spesies lain. Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi marka RGA untuk membedakan tanaman tahan dan tidak tahan terhadap penyakit BPB. Penelitian dilakukan di laboratorium biologi molekuler, BB BIOGEN, Bogor, menggunakan tanaman F₁ dan varietas lada (induk) dan 12 primer RGA yang didisain untuk mengamplifikasi motif NBS dan LRR. Hasil penelitian menunjukkan RGA lada dikelompokkan ke dalam grup Toll/Interleukin-1 Receptor homology (TNL). Diindikasikan sifat tahan terhadap BPB timbul ketika fragmen RGA NBS-MDHV diamplifikasi dengan primer RGA8 atau fragmen LRR yang diamplifikasi dengan primer RGA7 berasal dari kedua tetua, berada pada tanaman F₁. Fenomena ini ditunjukkan oleh F₁ 24-2, F₁ 13-6 dan F₁ N2BK-1. F₁ 24-2, F₁ 13-6 dan tetua betina varietas LDL memiliki dua fragmen LRR, sedangkan tetua jantan *P. hirsutum* memiliki pola fragmen LRR dan NBS-MDHV yang berbeda, baik jumlah dan atau posisinya, dibandingkan dengan tiga tersebut. Fenomena ini lebih jelas pada F₁ N2BK-1 yang memiliki dua fragmen LRR, tebal dan tidak tebal, indikasi berasal dari kedua tetuanya, Natar2 (memiliki dua fragmen LRR yang tebal) dan Besar Kota Bumi (memiliki dua fragmen LRR yang kurang tebal). Primer RGA7 dan RGA8 bisa dijadikan kandidat marka genetik RGA untuk membedakan lada tahan dan tidak tahan terhadap penyakit BPB, dan hasil ini perlu dikonfirmasi pada tanaman F₂.

Kata kunci: *Piper nigrum*, gen ketahanan, busuk pangkal batang, marka molekuler, RGA

ABSTRACT

A quick method for selecting of black pepper (Piper nigrum) plant material resistant to foot-rot disease is extremely needed for breeder. Fragments of resistant genes in Arabidopsis thaliana were conserved motif for both structural and its amino acid sequence {Nucleotide Binding Site (NBS) P-loop, kinase2, GLPL and MDHV, and Leucine-rich repeat (LRR)}, so those have been used to identify Resistance Gene Analog (RGA) on other plant species. The research objective was identifying RGA marker to distinguish resistant and susceptible black pepper to the Foot-rot disease. The research was carried out in the molecular biology laboratory, BB-BIOGEN, Bogor, using F₁ and mother plants, and 12 pair of RGA primers that was designed to amplify NBS and LRR motifs. Results indicated that RGA of black pepper is grouped into a Toll/Interleukin-1 Receptor homology (TNL) and a resistant trait to the foot-rot appeared when both RGA fragments of the NBS MDHV amplified by RGA8 and the LRR amplified by RGA7 primers from both parents, were existed in one plant, F₁. This phenomenon was shown by F₁ 24-2, 13-6 and N2BK-1 plants. F₁ 24-2, F₁ 13-6 and the female parent, Lampung Daun Lebar had two LRR fragments, while the male parent (Piper hirsutum) had a different LRR pattern. Moreover, P. hirsutum had one MDHV fragment which was different in position from those three. This phenomenon was clearer indicated by F₁ N2BK-1 which had two fragments of LRR, thick and thin one. Each of fragments are presumably from each of parents; Natar-2 (has two thick LRR fragments) and Besar Kota Bumi (has two thin LRR fragments). The RGA7 and RGA8 may be chosen as candidates of RGA genetic markers to distinguish resistant and susceptible black pepper to Foot-rot disease and this need to be confirmed on F₂ plant population.

Key words: *Piper nigrum*, resistance gene, foot rot, molecular marker, RGA

PENDAHULUAN

Tanaman lada (*Piper nigrum* L.) merupakan komoditi rempah penting bagi Indonesia, karena merupakan komoditas ekspor andalan yang dapat menghasilkan devisa yang cukup besar. Di Indonesia tanaman lada sebagian besar diusahakan oleh petani dalam bentuk perkebunan rakyat yang menyerap banyak tenaga kerja. Luas areal perkebunan lada di Indonesia pada tahun 2009 mencapai 185,941 ha dengan produksi nasional sebesar 82.834 t yang diantaranya dihasilkan dari Sumatera dan Kalimantan dengan volume sebesar 50,642 t dan nilai export mencapai 140.313 US\$ (Bayu Nugroho, 2009). Indonesia berkontribusi sekitar 17% dari pasar lada dunia pada tahun 2010, kedua setelah Vietnam. Daya saing lada Indonesia di pasar International dapat ditingkatkan, salah satunya melalui peningkatan produktivitas (Razan, 2013). Salah satu penyebab penurunan produktivitas lada adalah serangan penyakit pada tanaman lada, seperti; busuk pangkal batang (BPB), hama penggerek batang (*Lophobaris piperis*) dan belum tersedianya varietas lada tahan terhadap hama dan penyakit tersebut.

Penyakit BPB yang disebabkan oleh jamur *Phytophthora capsici* menjadi kendala utama budidaya tanaman lada di Indonesia dan juga di negara-negara Asia Selatan dan Brazil. Kerusakan yang disebabkan oleh BPB dapat menurunkan produktivitas per satuan luas sebesar 15-25%, yang setara dengan 25 milyar rupiah per tahun (Balittro, 1997). Serangan penyakit tersebut juga dapat menyebabkan kematian tanaman. Sampai saat ini belum ada teknologi pengendalian yang efektif, efisien dan ramah lingkungan. Fungisida masih menjadi satu-satunya cara untuk mengendalikan penyakit utama lada, selain cukup mahal, juga tidak mampu menuntaskan masalah tersebut, bahkan akibat terhadap pencemaran lingkungan dan kesehatan manusia, serta menimbulkan strain patogen yang tahan.

Upaya untuk mengatasi masalah penyakit *P. capsici* pada tanaman lada adalah dengan menggunakan varietas tahan. Varietas lada yang tahan dapat diperoleh dengan cara persilangan antar lada budidaya dan persilangan antar spesies lada tahan terhadap penyakit. Sumber genetik untuk ketahanan terhadap penyakit BPB diantara adalah varietas Belantung, Bangka, Natar-I, dan Merapin (Manohara dan Sato, 1992), sedangkan pada taxa lainnya, *Piper colibrinum* (Anandaraj, 2000).

Hasil persilangan antar lada budidaya dan dengan kerabat liar menunjukkan adanya variasi pada tanaman hibrida F₁ untuk tingkat ketahanan terhadap penyakit BPB (Wahyuno *et al.*, 2009). Namun karakteristik variasi virulensi *P. capsici* lada yang luas, menyebabkan seleksi untuk mendapatkan aksesori lada yang tahan akan memerlukan waktu yang lama (Wahyuno *et al.*, 2010a).

Metode seleksi secara konvensional untuk menentukan tanaman lada yang tahan terhadap BPB memerlukan waktu lama. Upaya untuk mendapatkan metoda seleksi secara cepat, berdasar pada genotipe dan tidak dipengaruhi oleh lingkungan (dominan), sangat diperlukan. Pengembangan *Marker Assisted Selection* (MAS) yang berbasis pada metoda PCR, seperti halnya RAPD telah dilakukan pada banyak tanaman. Upaya untuk menganalisa kandidat gen berdasarkan sekuen protein yang *conserved*, merupakan pendekatan baru untuk menganalisa adanya gen ketahanan dan perlu mulai dikembangkan pada tanaman lada.

Banyak gen tahan (gen *R*) penyakit telah diklon dan dikarakterisasi dari berbagai tanaman. Berdasarkan struktur molekuler, gen *R* dikontrol oleh kode protein yang bersifat *conserve* (baik untuk struktur maupun sekuen asam aminonya) menyerupai reseptor sitoplasmik (*cytoplasmic receptor-like protein*) yang memiliki ciri adanya N-terminal Nucleotide Binding Site (NBS) dengan domain Toll/interleukin 1-reseptor (TNL) atau Coiled-coil (CNL), dan memiliki bagian *Leucine-rich*

repeat (LRR) (Hammond-Kosack dan Jones, 1997, Vossen *et al.*, 2013). Selain itu telah diketahui ada delapan motif dari *Nucleotide Binding Site* (NBS) yaitu P-loop, kinase2, GLPL, RNBS-A, RNBS-B, RNBS-C, RNBS-D dan MDHV (Pan *et al.*, 2000). Dengan memanfaatkan metoda *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan dengan primer degenerate untuk motif NBS, bagian dari *Resistance gene Analogs* (RGA) antara tanaman yang satu dengan tanaman lainnya dapat dibedakan (Gerard *et al.*, 2004; Vossen *et al.*, 2013). Primer *degenerate* (campuran oligonukleotid) yang digunakan pada reaksi PCR dapat mengamplifikasi gene spesifik. Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa lokasi beberapa RGA yang telah diidentifikasi pada tanaman padi, kedelai, *Arabidopsis*, barley, gandum, jagung, kentang dan kacang buncis (*Phaseolus vulgaris*) ternyata berada pada daerah lokus yang berkaitan (QTL) dengan sifat tahan terhadap virus, bakteri, jamur dan nematoda (Mutlu *et al.*, 2006).

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan fragmen-fragmen RGA yang polimorfik pada beberapa tanaman F₁ dan tanaman tetuanya. Diharapkan fragmen RGA yang polimorfik dapat dijadikan kandidat marka genetik RGA pembeda antara lada tahan dan lada tidak tahan *P. capsici*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian dilakukan di laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Bogor, tahun 2005. Bahan yang dipergunakan pada penelitian ini yaitu 15 nomor lada F₁ hasil silangan dan 13 lada tetua-tetuanya, diperoleh dari kebun koleksi Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor (Tabel 1).

Taman sampel masing-masing lima setek per nomor F₁, tetua dan kultivar lada tidak tahan (kontrol negatif), disiapkan di rumah kaca.

Tabel 1. Daftar tanaman F₁ hasil silangan lada dan tetuanya.

Table 1. List of F₁ resulted from black pepper crosses and their parents.

| Kode persilangan | No. tetua betina x no. tetua jantan |
|-------------------------|--|
| 59-2 | 22. Paninyur x 20 Petaling |
| 13-6 | 19. Lampung Daun Lebar x 27. <i>Piper hirsutum</i> |
| 20-4 | 19. Lampung Daun Lebar x 26. Kuching |
| 27-1 | 26. Kuching x 23. Bulok Belantung |
| 35-36 | 19. Lampung Daun Lebar x 18. Natar 1 |
| N2BK-1 | 21. Natar 2 x 24. Besar Kota Bumi |
| 44-9 | 17. Lampung Daun K ecil x 16. Petaling 2 |
| 4-5 | 21. Natar 2 x 19. Lampung Daun Lebar |
| 4-5-5 | 21. Natar 2 x 19. Lampung Daun Lebar |
| 22-1-1 | 19. Lampung Daun Lebar x 18. Lampung Daun K ecil |
| 24-2 | 19. Lampung Daun Lebar x 27. <i>Piper hirsutum</i> |
| 36-31 | 19. Lampung Daun Lebar x 21. Natar 2 |
| 37-16 | 19. Lampung Daun Lebar x 16. Petaling 1 |
| 63-5 | 25. Mer apin x 20. Petaling 2 |
| 6-2 | 21. Natar 2 x 23. Bulok Belantung |
| <i>Piper colibrinum</i> | |

Disain primer *degenerate oligonucleotide*

Primer degenerate oligonucleotide untuk mengamplifikasi RGA pada tanaman lada telah didisain berdasar pada motif yang bersifat conserved dari NBS yakni pada bagian P-loop (phosphate binding domain), kinase2, MDHV dan LRR motif dari tanaman *Arabidopsis thaliana*. Sebanyak dua belas pasang primer RGA telah didisain untuk penelitian ini (Tabel 2).

Isolasi DNA dan penetapan konsentrasinya

Isolasi DNA menggunakan 0,5 g daun segar dari 15 nomor F₁ hasil silangan lada dan 13 tanaman tetua-tetuanya, termasuk tanaman lada yang peka (kontrol negatif) terhadap BPB dilakukan berdasar metoda CTAB (Delaporta *et al.*, 1983). Polyvinyl polypirrolidone (PVP) ditambah-

Tabel 2. Daftar Primer *degenerate oligonucleotide* yang didisain berdasar motif conserved NBS pada *Arabidopsis thaliana*.

Table 2. List of *Degenerate oligonucleotide primers* designed based upon NBS motif conserved of *Arabidopsis thaliana*.

| No. | Marka | Motif NBS-LRR | Sub grup | | Sekuen primer |
|-----|-------|----------------------|----------|---|--------------------------------|
| 1 | RGA1 | P-loop MHDV | CNL | F | 5' GGTACCCACCCATAGATGCCATAG 3' |
| | | | | R | 5' CTCGGTACCGCAATCTGG 3' |
| 2 | RGA2 | P-loop MHDV | TNL | F | 5' GGTACCCATCCGTAGACC 3' |
| | | | | R | 5' CTGGTACCGTGATCGAG 3' |
| 3 | RGA3 | P-loop Kinase2 | TNL | F | 5' GGTACCCATCCGTAGACC 3' |
| | | | | R | 5' CTGGTACCCTGCTGCAACTG 3' |
| 4 | RGA4 | Kinase2 Kinase2 | TNL | F | 5' GGCTCGGTACCAACTTCTCTG 3' |
| | | | | R | 5' CTGGTACCCTGCTGCAACTG 3' |
| 5 | RGA5 | Kinase2 MHDV | TNL | F | 5' GGCTCGGTACCAACTTCTCTG 3' |
| | | | | R | 5' CTGGTACCGTGATCGAG 3' |
| 6 | RGA6 | MHDV LRR 4 | TNL | F | 5' CCCTCGGTACCTACGTTTTG 3' |
| | | | | R | 5' GCTTGGTACCGGGACACGA 3' |
| 7 | RGA7 | LRR1/1 LRR 4 | TNL | F | 5' GGCTCGGTACCTACCTGAAC 3' |
| | | | | R | 5' GCTTGGTACCGGGACACGA 3' |
| 8 | RGA8 | MHDV MHDV | TNL | F | 5' CCCTCGGTACCTACGTTTTG 3' |
| | | | | R | 5' CTGGTACCGTGATCGAG 3' |
| 9 | RGA9 | P-loop P-loop R/1 | TNL | F | 5' GGTACCCATCCGTAGACC 3' |
| | | | | R | 5' GGCTGGTACCTTCTTGC GC 3' |
| 10 | RGA10 | P-loop P-loop R/2 | TNL | F | 5' GGTACCCATCCGTAGACC 3' |
| | | | | R | 5' GCTGGTACCTTCTTGC GC 3' |
| 11 | RGA11 | LRR1/2 LRR 4 | TNL | F | 5' GGCTCGGTACCTACCTGCTG 3' |
| | | | | R | 5' GCTTGGTACCGGGACACGA 3' |
| 12 | RGA12 | P-loop LRR4 | TNL | F | 5' GGTACCCATCCGTAGACC 3' |
| | | | | R | 5' GCTTGGTACCGGGACACGA 3' |

Keterangan/Note:

F : *forward* R : *reverse* CNL : Coil-coiled Receptor homology-NBS-LRR.
TNL : Toll/Interleukin-1 Receptor homology-NBS_LRR.

kan untuk mengatasi metabolit sekunder dari tanaman lada yang sangat tinggi.

PCR dan visualisasi hasil PCR

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) dilakukan menggunakan template DNA dengan konsentrasi 10 ng μL^{-1} , dengan beberapa kombinasi primer *degenerate oligonucleotide*. PCR dilakukan dalam volume reaksi 25 μl mengandung 10 ng DNA genom lada, 0,2 mM dNTPs, 0,4 pmol tiap primer, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl dan 1 U (unit) Taq polymerase. Program PCR yang digunakan adalah denaturasi awal 96°C, dua menit, denaturasi 94°C, satu menit, penempelan (*annealing*) 55-45°C, satu menit, pemanjangan (*extention*) 72°C, dua menit, kembali ke siklus dua (34X), serta pemanjangan akhir 72°C, 10 menit. Hasil PCR dicek (10 μl) dengan cara

dielektroforesis pada gel agarose 1,5%. Setelah diketahui bahwa reaksi PCR berhasil, maka hasil reaksi PCR dielektroforesis dengan gel poliakrilamid (*polyacrylamide gel eletrophoresis, PAGE*) 4%. Untuk menetapkan ukuran fragmen yang diamplifikasi, digunakan satu kb ladder marka. Fragmen DNA hasil PCR pada gel agarose dideteksi dengan Ethidium Bromide dan divisualisasi dengan Chemidoc dan software Quantitative, sedangkan pada PAGE dengan silver dan visualisasinya dengan light box. Apabila pola fragmen DNA (RGA) yang dihasilkan yang oleh tanaman-tanaman F1 diuji, berbeda-beda, berarti primer RGA tersebut bersifat polimorfik dan dapat digunakan untuk membedakan tanaman yang bersifat tahan dan tidak tahan terhadap penyakit BPB.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi DNA

DNA tanaman lada yang berkualitas baik yang bisa dipergunakan untuk kegiatan PCR agak sulit diperoleh, karena kadar metabolit sekunder yang terdapat pada daun lada yang tinggi. Setelah dilakukan beberapa perlakuan, metabolit sekunder pada tanaman lada bisa dihilangkan dengan pemberian polyvinyl pirolidone (PVP) sebanyak lima persen ke dalam larutan ekstraksi DNA. Selain itu upaya menghilangkan protein (termasuk piperin) terlarut dapat dihilangkan dengan cara pemberian campuran chloroform dan isoamyl alkohol sebanyak dua kali. DNA hasil isolasi dengan pendekatan ini berkualitas baik (Gambar 1) dan bisa digunakan sebagai template untuk PCR.

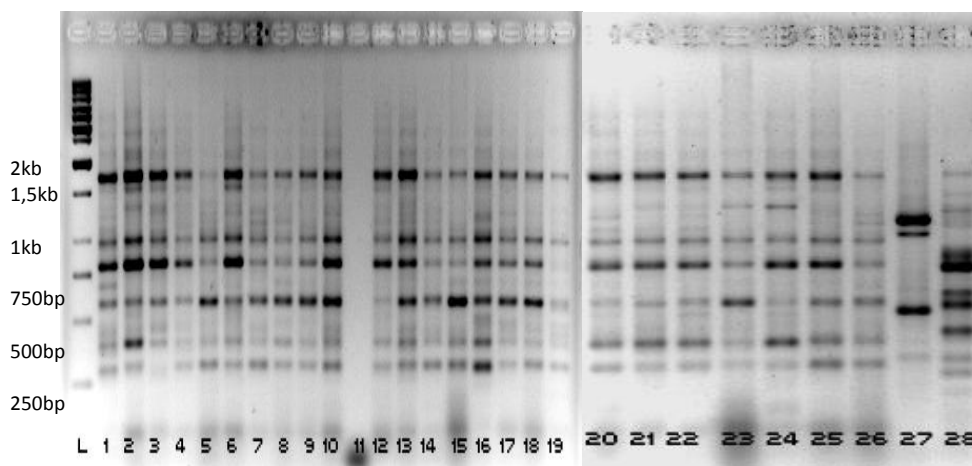
PCR analisis

Hasil PCR dengan menggunakan primer RGA2, mengamplifikasi fragmen RGA bagian NBS P-loop hingga NBS MDHV menghasilkan fragmen yang bersifat monomorfik, sehingga tidak bisa menunjukkan adanya perbedaan (Gambar 1).

Analisa pola pita RGA.

Analisa hasil reaksi PCR pertama dengan menggunakan dua pasang primer RGA yang didisain untuk mengamplifikasi bagian P-loop MDHV CNL dan MDHV TNL, menunjukkan bahwa fragmen RGA pada tanaman lada diduga tergolong pada grup Toll/Interleukin-1 Receptor homology (TNL). Hal ini ditunjukkan dari hasil PCR dengan primer RGA1 (P-loop-MDHV, CNL) dan RGA2 (P-loop-MDHV, TNL). PCR dengan menggunakan primer RGA1 tidak menghasilkan amplifikasi yang baik, dibandingkan dengan PCR menggunakan primer RGA2 (Gambar 1). Tujuh kelas RGA yang diidentifikasi pada lini-lini gandum *Lophopyrum elongatum* seluruhnya dikelompokkan kedalam gen R grup Toll-interleukin receptor (Chen et al., 2010).

Selanjutnya, identifikasi sifat tahan pada tanaman lada terhadap penyakit BPB dilakukan menggunakan primer RGA yang didisain. Hasilnya sifat tahan diduga timbul ketika fragmen RGA dari kedua tetua berada pada tanaman yang sama, yaitu tanaman F₁ hasil silangan. Hal ini ditunjukkan dari hasil PCR menggunakan primer



Gambar 1. Fragmen RGA tanaman lada yang diamplifikasi dengan primer RGA2.

L: ladder 1 kb (Fermentas), ukuran 2, 1,5, 1kb, 750 dan 500 bp; 1-15: tanaman F₁; 16-26: tanaman tetua (varietas atau kultivar lada); 27 dan 28: spesies kerabat lada

Figure 1. RGA fragments of black pepper amplified by RGA2 primers.

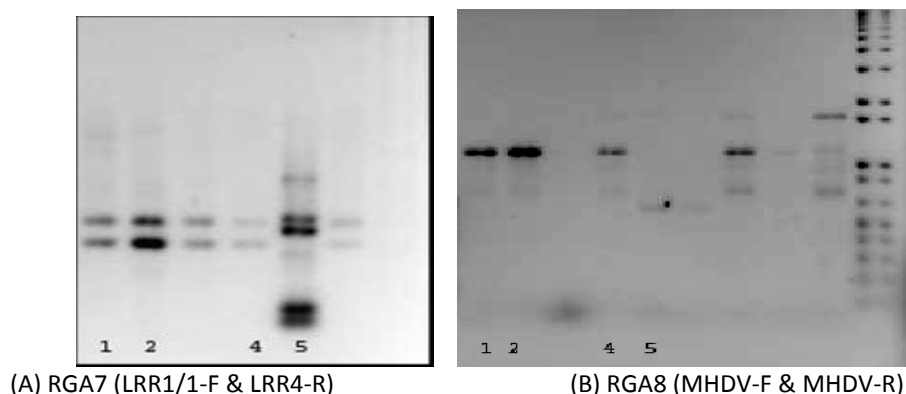
L: 1 kb ladder (fermentas), size of 2, 1,5, 1kb, 750 and 500 bp; 1-15: F₁ plants; 16-26: parental plants (black pepper varieties or cultivars); 27 and 28: black pepper related species.

RGA7 (F 5' GGCTCGGTACCTACCTGAAC 3 dan RGA7 R 5' GCTTGGTACCGGGACACGA 3) yang mengamplifikasi fragmen DNA bagian LRR (Leucine-rich-repeat) (primer Forward: LRR1 1⁻¹ dan reversed: LRR4) dan RGA8 (F 5' CCCTCGGTACCTACGTTTTG 3' dan R 5' CTGGTACCGTGATCGAG 3'), yang mengamplifikasi fragmen DNA bagian NBS (*nucleotide-binding-site*)-MDHV, misal pada tanaman F1 24-2, F1 13-6 dan F1 N2BK1. Panwar *et al.*, 2011, melaporkan tiga dari sembilan marka NBS-LRR menunjukkan polimorfik, membedakan antara tanaman yang tahan dan peka terhadap blast pada finger millet.

Pola pita fragmen RGA (NBS dan LRR) yang dihasilkan, spesifik dan menunjukkan adanya polimorfik (Gambar 2) antara tanaman F1 dan tanaman tetuanya. Pola pita yang dihasilkan pada tanaman F1 24-2 dan F1 13-6, hasil silangan antara lada kultivar Lampung daun lebar (LDL) dengan spesies lada liar, *P. hirsutum*, dengan primer RGA7 mengamplifikasi NBS-LRR menghasilkan dua fragmen yang polanya sama dengan tetua betina, namun lebih tebal (Gambar 3A, line 1, 2 dan 4). Tetua jantan, *P. hirsutum*, memiliki pola fragmen yang berbeda (Gambar 3A,

line 5) dibandingkan dengan pola pita tanaman F1 24-2, F1 13-6 dan tetua betina (Gambar 3A. line 1, 2 dan 4). Demikian pula pola pita tanaman F1 24-2 dan F1 13-6, dan tetua betina dengan primer RGA8, untuk mengamplifikasi fragmen DNA NBS-MDHV menghasilkan satu fragmen yang spesifik (Gambar 3B. line 1, 2 dan 4) dan berbeda dengan pola pita pada tanaman tetua jantan, *P. hirsutum* (Gambar 3B, line 5).

Fenomena yang diduga sama ditunjukkan oleh materi genetik F1 lainnya, yaitu F1 N2BK-1 (hasil silangan antara lada varietas Natar2 dengan kultivar Besar Kota Bumi) dengan menggunakan primer RGA7 dan RGA8. Pola fragmen hasil amplifikasi tanaman F1 NaBK-1 agak berlainan dibandingkan dengan materi genetik F1 24-2 dan F1 13-6. Tanaman tetua betina, Natar2 memiliki dua fragmen spesifik dan tebal (Gambar 3A, line 10), untuk NBS LRR hasil amplifikasi dengan RGA7 (forward: LRR1/1 dan reverse: LRR4), sedangkan tanaman tetua jantannya (Besar Kota Bumi) memiliki dua fragmen yang kurang tebal dibanding dengan fragmen pada Natar-2 (Gambar 3A, line 15). Tanaman F1 N2BK-1 ternyata memiliki dua fragmen spesifik NBS LRR, namun dengan ketebal-



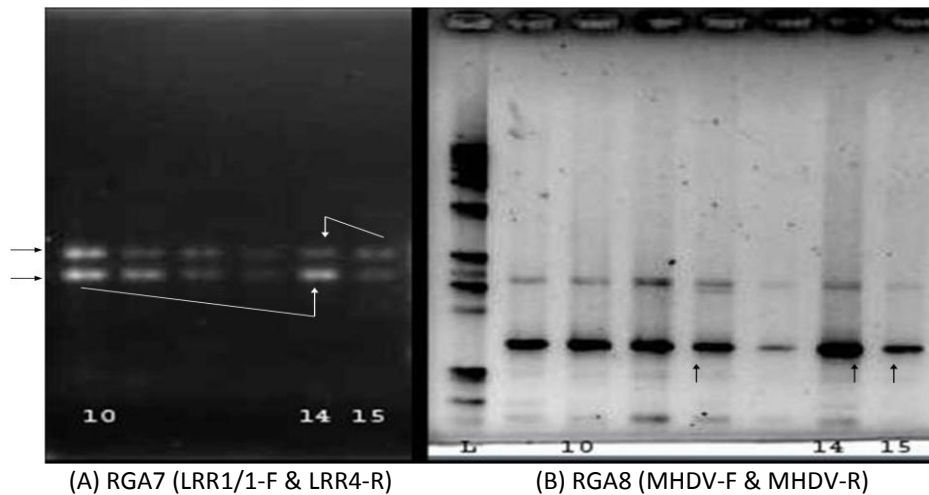
Gambar 2. PCR mengamplifikasi fragmen fragmen LRR (A) dan NBS-MDHV (B) pada tanaman F₁ 24-2 dan F₁ 13-6.
 Figure 2. PCR amplifying LRR (A) NBS MDHV (B) fragments on F₁ 24-2 dan F₁ 13-6 plants.

Keterangan:

1. F1 24-2 (kurang tahan), 2. F1 13-6 (tahan), 4. LDL (tetua betina) (tdk tahan), dan 5. *Piper hirsutum* (tetua jantan) (tahan). Marka : 1kb ladder (bawah ke atas 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000bp dst.)

Note:

1. F1 24-2 (less resistant), 2. F1 13-6 (resistant), 4. LDL (female) (not resistant), and 5. *Piper hirsutum* (male) (resistant). Marka : 1kb ladder (bottom to above 100, 200, 300, 400, 500, 650, 850, 1000bp etc.).



Gambar 3. PCR mengamplifikasi fragmen LRR (A) dan NBS-MDHV (B) dari F₁ N2BK-1.
 Figure 3. PCR amplifying LRR (A) and NBS MDHV (B) of F₁ N2BK-1 plant.

Keterangan:

10. Natar-2 (tetua betina)(tdk tahan), 14. F₁ N2BK-1 (tahan) dan 15. Besar Kota (tetua jantan) (tdk tahan). L : 1kb (bawah ke atas 850, 1000, 1650, 2000, 3000bp dst.).

Note:

10. Natar-2 (Female parent)(not resistant), 14. F₁ N2BK-1 (resistant) dan 15. Besar Kota (Male parent).L : 1kb ladder (bottom to above 850, 1000, 1650, 2000, 3000bp etc.).

an yang berbeda, satu tebal, kemungkinan (diduga) berasal dari tetua betina (Natar2), sedangkan satu fragmen lainnya, kurang tebal diduga berasal dari tetua jantan (Besar Kota Bumi) (Gambar 3A, line 14). Fragmen yang dihasilkan dari amplifikasi NBS MDHV dengan primer RGA8 pada tanaman F₁ N2BK-1 dan kedua tetuanya memiliki pola yang sama, yaitu satu fragmen spesifik yang tebal, namun tanaman F₁ memiliki fragmen yang sangat tebal (Gambar 3B, line 14), jika dibandingkan dengan ketebalan fragmen yang dihasilkan oleh ke dua tetuanya (Gambar 3B, line 10 dan 15).

Hasil yang ditunjukkan dari penelitian marka RGA untuk mengidentifikasi adanya fragmen DNA yang berkaitan dengan *resistance gene analog* ini ternyata selaras dengan hasil penelitian tentang ketahanan beberapa tanaman F₁ hasil silangan dengan isolat berasal dari tiga daerah penanaman lada (Bangka, Kalimantan Barat dan Jawa Barat) yang telah dilakukan oleh Wahyuno *et al.* (2009). Wahyuno *et al.* (2009) melaporkan bahwa aksesori N2BK mempunyai luas serangan yang lebih rendah, daripada aksesori

lainnya saat diinokulasi buatan di laboratorium dan rumah kaca.

Hasil analisa pola pita RGA untuk NBS_LRR dan NBS_MHDV mengindikasikan kemungkinan adanya perpindahan sifat ketahanan terhadap penyakit BPB dari spesies lada liar (*P. hirsutum*) ke kultivar lada budidaya (Lampung Daun Lebar) yang ditunjukkan oleh tanaman F₁ 24-2 dan F₁ 13-6. Hasil ini selaras dengan hasil yang dinyatakan oleh Wahyuno *et al.* (2010b) bahwa *P. colubrinum* dan *P. hispidum* (*P. hirsutum*) sebagai sumber gen ketahanan lada terhadap *P. capsici*.

KESIMPULAN

1. Fragmen *Resistance gene analog* (RGA) pada tanaman lada diduga tergolong pada grup Toll/Interleukin-1 Receptor homology (TNL).
2. Sifat tahan pada tanaman lada terhadap penyakit busuk pangkal batang diduga timbul ketika fragmen RGA berasal dari kedua tetua berada pada tanaman yang sama, yaitu pada tanaman F₁ hasil silangan. Fenomena tersebut ditunjukkan pada tanaman F₁ 24-2, F₁ 13-6 dan F₁ N2BK-1.

3. Primer RGA7 yang mengamplifikasi fragmen LRR dan primer RGA8 yang mengamplifikasi fragmen NBS_MHDV merupakan primer kandidat untuk membedakan antara yang tanaman lada yang tahan dan tidak tahan terhadap penyakit BPB.
4. Primer RGA7 dan RGA8 akan dipergunakan sebagai primer RGA pada penelitian selanjutnya disamping primer lainnya, untuk membuktikan lebih lanjut fenomena di atas, dengan mengevaluasi tanaman keturunan dari tanaman F₁ N2BK-1 (F₂).
5. Hasil analisa pola pita menunjukkan bahwa N2BK-1 mempunyai pola pita yang mengindikasikan berbeda dengan aksesi lainnya yang diuji.
6. Hasil analisa pola pita RGA ini juga mengindikasikan adanya mekanisme ketahanan yang berbeda terhadap *P. capsici* dari *P. hirsutum* sehingga perlu diteliti lebih lanjut sebagai sumber gen ketahanan lada terhadap *P. capsici*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis ucapkan terima kepada Ir. Rudi T. Setiyono, pemulia tanaman lada di Balitro yang telah menyediakan nomor-nomor lada hasil silangan. Penelitian ini dibiayai oleh dana APBN DIPA Balitro tahun 2005/2006.

DAFTAR PUSTAKA

- Anandaraj M. 2000. Disease of Black pepper. In: Ravindran P.N. (Ed.) Black pepper *Piper nigrum*. Harwood Academic Publishers, The Netherlands. Pp. 239-267.
- Balitro. 1997. Konsep Pengendalian Hama Terpadu Tanaman Lada di Indonesia dan Aplikasinya. (tidak diterbitkan).
- Bayu Aji Nugroho. 2011. Musim hujan datang, Busuk pangkal batang mengancam. <http://www.ditjenbun.deptan.go.id/bbp2tpsur/>.
- Chen GY, YM Wei, YX Liu, L Wei, JR Wang and YL Zheng. 2010. Identification of Resistance gene analogue (RGA) and development of E chromosome-specific RGA markers in wheat *Lophopyrum elongatum* addition lines. *Crop and Pasture Science* 61(11): 929-937.
- Delaporta SL, J Wood and JL Hicks. 1983. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- Gerard C van der Linden, Doret CAE, Wouters VM, Elena ZK, Smulders MJM and B Vosman. 2004. Efficient tragetting of Plant disease resistance locusing NBS profiling. *Theor. Appl. Genet* 109: 384-393.
- Hammond-Kosack KE and JDG Jones, 1997. Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 48: 575-607.
- Manohara D dan N Sato. 1992. Morphological and physiological observation on *Phytophthora* isolates from black pepper. *Industrial Crops res. J.* 4: 14-19.
- Mutlu N, Miklas PN and DP Coyne. 2006. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers co-localize with disease resistance genes and QTL in common bean. *Molecular Breeding* (17): 127-135.
- Pan Q, Wendel J, and Fluhr R. 2000. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologue in dicot and cereal genomes. *J.Mol.Evol.* 50: 203-213.
- Razan S. 2013. Perkembangan Komoditi Ekspor lada dan pengaruhnya pada peningkatan devisa. www.scribd.com/149631517/111108400046.
- Vossen JH, S Dezhsetan, D Esselink, M Arens, MJ Sanz, W Verweij, E Verzaux and CG van der Linden. 2013. Novel application of motif-directed profiling to identify disease resistant genes in plants. *Plant Methods*. 9: 37.
- Wahyuno D, D Manohara dan RT Setiyono. 2009. Ketahanan beberapa lada hasil persilangan terhadap *Phytophthora capsici* asal lada. *J. Littri*. 15: 77-83.
- Wahyuno D, D Manohara dan RT Setiyono. 2010a. Virulensi *Phytophthora capsici* asal lada terhadap *Piper* spp. *Bul. Plasma Nutfah* 16 :140-149.
- Wahyuno D, D Manohara, SD Ningsih dan RT Setijono. 2010b. Pengembangan varietas unggul lada tahan penyakit busuk pangkal batang yang disebabkan oleh *Phytophthora capsici*. *J. Litbang Pertanian*. 29: 86-95.