

KARAKTER MORFOLOGI DAN MOLEKULER ISOLAT *Phytophthora palmivora* ASAL KELAPA DAN KAKAO

HIASINTA FJ MOTULO¹, MEITY S-SINAGA², ALEX HARTANA³
GEDE SUASTIKA², HAJRIAL ASWIDINNOOR²

¹⁾ Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain, Mapanget, PO Box 1004 Manado 95001
²⁾ Departemen Proteksi Tanaman, Departemen Budidaya, Faperta Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga Bogor
³⁾ Departemen Biologi, FMIPA Institut Pertanian Bogor, Kampus Darmaga Bogor

ABSTRAK

Phytophthora palmivora merupakan patogen penyebab penyakit gugur buah pada tanaman kelapa dan busuk buah pada tanaman kakao. Penelitian ini bertujuan untuk membedakan isolat *P. palmivora* asal kelapa dan asal kakao berdasarkan karakter morfologi dan molekuler. Pengambilan sampel penyakit gugur buah kelapa dan busuk buah kakao dilakukan di Kabupaten Banyuwangi dan Jember, Jawa Timur, Kabupaten Minahasa dan Bolaang Mongondow, Sulawesi Utara, dan Kabupaten Gorontalo, Gorontalo. Analisis morfologi, ekstraksi DNA dan amplifikasi DNA dengan PCR dilakukan di Laboratorium Mikologi dan Laboratorium Virologi, Departemen Proteksi Tanaman, Faperta IPB. Analisis peruntutan DNA dilakukan di Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik dan Laboratorium Bioteknologi, LIPI Serpong. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2005 sampai Februari 2007. Berdasarkan karakter morfologi seperti diameter koloni, panjang dan lebar sporangium, tipe koloni, bentuk sporangium, perbandingan panjang dan lebar sporangium serta runutan DNA ruas ITS menunjukkan bahwa kedua puluh-dua koleksi isolat yang menunjukkan gejala penyakit gugur buah kelapa dan busuk buah kakao adalah *P. palmivora*. Isolat *P. palmivora* asal kelapa berbeda dengan isolat *P. palmivora* asal kakao berdasarkan diameter koloni, panjang dan lebar sporangium serta runutan DNA ruas ITS. Dua puluh-dua isolat *P. palmivora* asal kelapa dan asal kakao mempunyai sporangium yang mudah lepas dari sporangiospora (caducous), pedikel yang pendek dan papila serta bervariasi dalam bentuk dan ukuran sporangium. Bentuk sporangium terdiri dari 4 tipe yaitu ovoid, limoniform, obturbinate, dan obpyriform. Ukuran sporangium berkisar antara 40 – 62 µm panjang dan 28 – 43 µm lebar. Isolat *P. palmivora* memiliki tipe koloni *rosaceous*, *stelate* dan *cottony*. Rata-rata diameter koloni isolat asal kelapa 54,8 cm lebih tinggi dari isolat asal kakao 43,4 cm. Hasil peruntutan DNA hasil PCR menunjukkan adanya keragaman genetik antar isolat asal kelapa dan kakao di Indonesia. Isolat asal kakao berbeda dengan isolat asal kelapa berdasarkan peruntutan DNA ruas ITS. Isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao dari Indonesia tidak berada dalam satu kelompok dengan isolat yang berasal dari Thailand, Taiwan, Korea, Puerto Rico, Ghana, dan Cameron.

Kata kunci : Kelapa, *Cocos nucifera*, kakao, *Theobroma cacao*, penyakit, *P. palmivora*, morfologi, molekuler, keragaman, runutan DNA-ITS, Jawa Timur, Sulawesi Utara, Gorontalo, Jawa Barat

ABSTRACT

Morphology and molecular characteristics of P. palmivora isolates from coconut and cacao

Phytophthora palmivora, is the pathogen of coconut nutfall and cacao black pod diseases. This study was conducted to differentiate the isolates of *P. palmivora* from coconut and those from cacao fruit based on morphology and molecular characteristics. Samples of nutfall of coconut and black pod of cacao were collected from Banyuwangi and Jember Districts, East Java, Minahasa and Bolaang Mongondow Districts, North

Sulawesi, and Gorontalo District, Gorontalo. Morphological analysis, DNA extraction and amplification of PCR-DNA were conducted in Micology Laboratory and Virology Laboratory, Plant Protection Division, Faperta IPB. Sequencing DNA analysis was conducted in Molecular Biology Laboratory, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik and Biotechnology Laboratory LIPI Serpong. This research was conducted from April 2005 to February 2007. Comparative morphological evaluated i.e. diameter of colony, length and width of sporangium, l/w ratio, type of colony and sequence Internal Transcribed Sequence (ITS)-DNA showed that all isolates of *Phytophthora* isolated from coconut and cacao in Indonesia were *Phytophthora palmivora*. Morphology characteristics of pathogen isolates from cacao were smaller and significantly different in length, width, length/width ratio of sporangium and diameter of colony compared to coconut's isolates. Sporangia of 22 isolates were caducous with short pedicel, but were variable in shape and size. The culture produced ovoid, limoniform, obturbinate, and obpyriform sporangia, average 40-62 µm in length and 28-43 µm in width. The colony types were stelate, cottony and rosaceous with average diameter of coconut isolates 54.8 cm and cacao isolates 43.4 cm. Specific fragment of 900 bp was successfully amplified from coconut and cacao infected by *P. palmivora*. The DNA sequence analysis of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region showed that the coconut isolates were not in the same cluster with the cacao isolates. Based on sequence analysis, the *P. palmivora* isolates from Indonesia showed different cluster from those of Taiwan, Ghana, Puerto Rico and Costa Rica isolates.

Key words : Coconut, *Cocos nucifera*, cacao, *Theobroma cacao*, diseases, *P. palmivora*, diversity, morphology, molecular, sequencing ITS-DNA, East Java, North Sulawesi, Gorontalo, West Java

PENDAHULUAN

Phytophthora palmivora merupakan patogen yang menyebabkan penyakit gugur buah dan busuk pucuk pada tanaman kelapa dan penyakit busuk buah dan kanker batang pada tanaman kakao. Kehilangan hasil pada tanaman kelapa akibat penyakit gugur buah dapat mencapai 30-40% (FRANQUEVIELLE dan KOUASSI, 1992), pada populasi kelapa Genjah Kuning Nias (GKN) di kebun koleksi Mapanget Sulawesi Utara kehilangan hasil dapat mencapai 23,6 - 25% (MANGINDAAN *et al.*, 1992). Pada tanaman kakao, kehilangan produksi 10 - 90% (OPEKE dan GORENZ, 1974). VAN DER VOSSEN (1997) mengatakan bahwa secara umum kehilangan hasil akibat *P. palmivora* pada tanaman kakao mencapai 40%.

Upaya meningkatkan pendapatan petani ataupun meningkatkan produktivitas lahan sudah banyak dilakukan,

antara lain usaha pertanian yang mendukung pemanfaatan lahan yang seoptimal mungkin dengan melakukan sistem penanaman tumpangsari. Salah satu tanaman tumpang sari yang dilakukan di bawah kelapa yaitu dengan penanaman tanaman kakao. Tanaman kakao dipilih karena biji kakao merupakan salah satu komoditas ekspor yang memiliki nilai ekonomi yang tinggi. Dengan tumpang sari kelapa dan kakao berarti dapat memanfaatkan lahan dengan keuntungan ekonomi yang lebih besar dibandingkan dengan hasil tanaman monokultur kelapa atau monokultur kakao saja. Namun dilain pihak, tumpangsari kakao di bawah tanaman kelapa mungkin akan terhambat oleh adanya masalah penyakit-penyakit gugur buah kelapa dan penyakit busuk buah kakao disebabkan oleh patogen yang sama yaitu *P. palmivora*.

Phytophthora palmivora adalah spesies heterotalik yang mempunyai tipe kawin A1 dan A2 sehingga interaksi antara keduanya dapat menghasilkan spora seksual (oospora) yang berbeda dengan kedua induknya. Keberadaan dua tipe kawin tersebut dalam satu area berpotensi dapat menciptakan fenotipik yang lebih virulen (GOODWIN *et al.*, 1995). Fenomena persilangan tersebut bukan hanya terjadi pada spesies yang sama tapi juga dapat terjadi pada spesies yang berbeda. Variasi genetik telah dihasilkan di laboratorium melalui fusi zoospora dari *P. capsici* dan *P. nicotianae* (SILVAR *et al.*, 2006) juga miselium dari *P. capsici* dan *P. palmivora*. Sumber variasi genetik kemungkinan dapat terjadi melalui mutasi, rekombinasi mitotik rekombinasi paraseksual, interspesifik hibridisasi, dan persilangan di antara ras yang berbeda (WHISSOM *et al.*, 1994). Spesies di dalam genus *Phytophthora* menunjukkan terdapat banyak variasi genetik dalam karakternya baik secara makroskopis maupun mikroskopis. Identifikasi variasi genetik pada tingkat spesies dan antara spesies sulit untuk diinterpretasi (APPIAH *et al.*, 2003).

Analisis variasi isolat menggunakan karakter morfologi dan bentuk koloni sudah biasa dilakukan. Menurut APPIAH *et al.*, (1999) karakter morfologi yang dapat membedakan spesies adalah bentuk koloni. *P. megakarya* memiliki bentuk koloni seperti kapas (*cottony*), *P. palmivora* berbentuk *stelate* dan *P. capsici* berbentuk *rosette*. Identifikasi dan karakterisasi *Phytophthora* menggunakan karakter morfologi sering bersifat subyektif dan sangat ditentukan oleh pengetahuan dan pengalaman karena beberapa karakter saling tumpang tindih di antara spesies dan variasi yang sangat nyata di antara isolat dalam spesies yang sama. Dengan demikian teknik molekular marker dikembangkan untuk menganalisis variasi dalam populasi ataupun mengidentifikasi isolat atau mutan. Pendekatan secara molekular dapat menyediakan metode yang akurat untuk identifikasi patogen, mendeteksi keberadaan patogen, dan mendeteksi variasi antara spesies pada tingkat perubahan satu basa (SCHLIK *et al.*, 1994).

Berbagai teknik analisis DNA telah digunakan untuk mengetahui variasi di dalam dan di antara spesies *Phytophthora* yaitu analisis DNA mitokondria dan nukleus dengan teknik RFLP (FÖRSTER *et al.*, 1987) dan analisis peruntutan (sequencing) ribosom RNA (rRNA). Analisis ruas DNA-ITS (internal transcribed spacer) dari RNA ribosom telah dilakukan untuk mendeterminasi keragaman di dalam spesies *Phytophthora* (COOK *et al.*, 1996) dan perbedaan runutan DNA telah digunakan untuk membedakan antara spesies *Phytophthora* (RISTAINO *et al.*, 1998).

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk membedakan karakter morfologi dan molekular dari isolat *P. palmivora* asal kelapa dan asal kakao baik secara morfologi maupun peruntutan DNA ruas ITS rRNA.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan Tempat

Pengambilan sampel buah yang diduga terserang penyakit gugur buah kelapa dan busuk buah kakao dilaksanakan di Kabupaten Banyuwangi dan Jember, Jawa Timur, Kabupaten Minahasa dan Bolaang Mongondow, Sulawesi Utara, dan Kabupaten Gorontalo, Gorontalo. Sampel DNA dan karakter morfologi *P. palmivora* dianalisis di Laboratorium Mikologi dan Laboratorium Virologi, Departemen Proteksi Tanaman, Fakultas Pertanian, IPB. Analisis Peruntutan DNA dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekular, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik, Bogor dan Laboratorium Bioteknologi LIPI, Serpong. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2005 sampai Februari 2007.

Isolasi Patogen *P. palmivora*

Patogen diisolasi dari buah kelapa yang menunjukkan gugur buah dan buah kakao yang menunjukkan busuk buah. Dari bagian yang aktif perkembangan penyakitnya, dipotong 3 x 3 mm² lalu disterilkan dengan alkohol 70% selama 30 detik.

Potongan-potongan tersebut kemudian ditanam pada media Selektif V8 (Agar Bacto 1,5%, V8 Juice 200 ml yang telah dimurnikan dengan CaCO₃ 3 gr, dan aquades steril sampai 1 l) (MILLER, 1955) ditambah antibiotik (Pimaricin 10 ppm, Ampicilin 250 ppm, Rifampicin 10 ppm, dan Pentachloronitrobenzen 100 ppm) (PAPAVIZAS *et al.*, 1981) serta hymexazol 25 ppm (MASAGO *et al.*, 1977). Cawan berisi potongan jaringan sakit kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu kamar. Isolat *P. palmivora* yang tumbuh diisolasi dan diidentifikasi, selanjutnya digunakan dalam pengujian-pengujian lanjut.

Pada lokasi penanaman kelapa atau kakao yang tidak menunjukkan adanya gejala penyakit gugur buah atau busuk buah diambil sebanyak 500 gr sampel tanah yang berada di bawah kanopi tanaman kelapa atau kakao. Isolat *P. palmivora* dari tanah diisolasi dengan cara menggenangi sampel tanah dengan air steril. Kemudian buah kelapa sehat umur enam bulan diletakkan di atas tanah tersebut. Spora *P. palmivora* akan berenang menuju ke permukaan kulit buah pada batas permukaan air. Buah yang terserang *P. palmivora* akan menampilkan bercak berwarna coklat. Jaringan sakit tersebut kemudian diisolasi dan ditumbuhkan pada media selektif V8. Isolat *P. palmivora* yang tumbuh kemudian diisolasi dan dipindahkan ke medium V8 baru yang tidak mengandung antibiotik dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari.

Karakterisasi Morfologi *P. palmivora*

Identifikasi *Phytophthora* secara morfologi dilakukan berdasarkan bentuk dan ukuran sporangia menurut petunjuk identifikasi STAMPS *et al.*, (1990). Sporangia didapatkan dari kultur berumur 6-10 hari yang ditumbuhkan dalam media agar V8. Dari tiap isolat diambil 5 potongan agar (5 mm diameter) dan tiap potongan diamati dengan mengambil 5-7 gambar sporangium di bawah mikroskop Olympus BX 51 dengan pembesaran 200 X (10x20) kemudian difoto menggunakan kamera digital mikroskop Olympus DP 11. Total sporangium setiap isolat yang diamati berjumlah 25 sampel. Selanjutnya foto ditransfer ke komputer menggunakan program morfometri *tpsdig* (BENNET dan HOFFMAN, 1998). Digitasi dilakukan pada setiap gambar sporangium dengan menentukan secara konsisten titik-titik panjang dan lebar. Pada proses ini ditentukan titik panjang mulai dari papilla sampai pangkal spora dan titik lebar. Setiap titik dari gambar pemotretan digitasi diubah dalam koordinat x dan y sehingga dapat diketahui jarak antar titiknya, dengan cara dimasukkan dalam persamaan jarak menggunakan program Microsoft Excel untuk memperoleh jarak yang sesungguhnya, yaitu :

$$D_{V(mm)} = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2}$$

(persamaan jarak -1)

$$D_{S(mm)} = D_V/D_P$$

(persamaan jarak -2)

di mana:

$D_{V(mm)}$ = jarak vektor,

$D_{S(mm)}$ = jarak sesungguhnya,

D_P = jarak pembesaran mikroskop,

X_1, X_2, Y_1, Y_2 = titik-titik vektor pada sumbu X dan Y

Ukuran panjang dan lebar sporangium merupakan akar dari jumlah kuadrat jarak antar titik tersebut di atas.

Hasil digitasi sporangium berbentuk vektor kemudian dikonversi dalam ukuran sesungguhnya dengan cara nilai vektor dibagi dengan 399.699. Nilai ini diperoleh dari digitasi skala mikrometer (sepanjang 1 mm) pada pembesaran yang sama saat pemotretan sporangium *P. palmivora* yaitu 10 X 20 atau (200x).

Pengukuran diameter koloni dilakukan dengan cara menentukan dua titik yang berlawanan pada permukaan koloni *P. palmivora* yang ditumbuhkan pada media V8 di dalam cawan petri, kemudian kedua titik tersebut dihubungkan dengan mistar untuk mengetahui jarak kedua titik tersebut. Pengamatan bentuk dan tipe koloni dengan menggunakan kunci identifikasi dalam ERWIN dan RIBEIRO (1996).

Identifikasi *P. palmivora* Secara Molekuler

Ekstraksi DNA *P. palmivora*

Metode ekstraksi DNA untuk PCR mengikuti cara yang dilakukan oleh GOODWIN *et al.*, (1992). Isolat *P. palmivora* berumur 6-10 hari dipindahkan ke media cair V8 dalam erlenmeyer. Setelah 7-10 hari miselium dipanen dan disaring dengan kertas Whatman Nomor 1 kemudian disimpan dalam tabung ependorf.

Miselium digerus dalam nitrogen cair dan dipindahkan ke tabung reaksi yang telah diberi 1 ml larutan penyangga (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2% (w/v) CTAB, 1% β -mercaptoethanol). Setelah digerus campuran dikocok sampai homogen dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. RNase (10 μ l) ditambahkan, dikocok kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Setelah itu khloroform dan isoamil (24 : 1) ditambahkan dengan volume yang sama, dikocok dan disentrifus pada kecepatan 11.000 rpm selama 10 menit. Fase cair yang terpisah dipindahkan ke tabung baru kemudian ditambahkan 1000 μ l khloroform, dikocok kemudian disentrifus pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung baru kemudian ditambahkan 1000 μ l isopropanol dingin lalu dikocok, kemudian disentrifus pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Larutan dibuang selanjutnya pelet DNA, ditambahkan dengan 200 μ l TE (1x) dikocok perlahan dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambahkan 0,1 volume sodium asetat dan 2,5 volume ethanol absolut dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 10 menit. Pelet DNA dicuci dengan 70% ethanol 500 μ l dan disentrifus pada 12000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Ethanol dibuang dan pelet dilarutkan dalam TE 100 μ l pada suhu ruang kemudian disimpan pada suhu -80°C.

Amplifikasi Sekuen ITS-DNA

Dari 22 isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao hanya diambil 3 isolat (KelapaInd/P53KpTuSU, KakaoInd1/P22KoMrwSU, KakaoInd2/P40KoMpySU) untuk dilakukan analisis PCR dan peruntutan DNA. DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR berdasarkan metode TROUT *et al.* (1997) menggunakan primer universal ITS4 dan ITS5. Susunan basa primer ITS4 adalah 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC'-3' (WHITE *et al.* (1990) dan primer ITS5 adalah 5'-GGAAGTAAAAGTCGTA-ACAAG-3' (WHITE *et al.* (1990). Volume akhir setiap reaksi PCR adalah 25 µl terdiri atas : 10x PCR Buffer 1X (2.5µl), Mg²⁺ 0.5-2.5mM (1.5µl), dNTP 200µM (0.5µl) Primer ITS4 0.4 µM (1µl), Primer ITS5 0.4 µM (1µl), Tag DNA Polymerase 1 Unit (0.2µl), sampel DNA 50 ng (2 µl), ddH₂O (16.3 µl).

Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR Gene Amp PCR System 9700 berlangsung dengan tahapan sebagai berikut. Tahap pra amplifikasi 5 menit pada suhu 96°C, tahap pemisahan utas 1 menit pada suhu 96°C, tahap penempelan primer 1 menit pada suhu 47°C, tahap sintesis 1 menit pada suhu 72°C, tahap pasca amplifikasi 10 menit pada suhu 72°C menurut TROUT *et al.* (1997) dengan sedikit modifikasi pada suhu penempelan primer. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 35 siklus. Fragmen DNA hasil amplifikasi ditambah dengan 3 ul larutan penanda Bromofenol blue kemudian dipisahkan dengan elektroforesis pada gel Agarose 1% dan dilanjutkan dengan pewarnaan melalui perendaman gel Agarose dalam etidium bromida 0,5 ug/ml selama 30 menit dan dibilas dengan H₂O. Pita DNA hasil amplifikasi diamati di atas transiluminator UV dan dipotret dengan alat gel UV dokumentasi.

Peruntutan (Sequencing) DNA ITS-PCR *P. palmivora*

Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer ITS 4R dan ITS 5F terhadap 3 isolat *P. palmivora* selanjutnya dilakukan analisis peruntutan DNA dengan menggunakan mesin sekuensing ABI-Prism 3100 *Avant Genetic Analyser*. Peruntutan DNA dilakukan di Laboratorium Biomolekular, Balai Besar Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Bogor dan Laboratorium Bioteknologi, LIPI Serpong.

Data peruntutan DNA selanjutnya digunakan sebagai bahan analisis tingkat kesamaan genetik *P. palmivora* yang telah dikoleksi dengan *P. palmivora* dari daerah geografi lainnya, yaitu dengan memanfaatkan informasi peruntutan DNA yang tersedia dalam *GeneBank* menggunakan program BLAST dari (www.ncbi.nlm.nih). Hasil analisis gen ITS *P. palmivora* melalui program BLAST disajikan dalam Tabel 1.

Tabel 1. Nomor akses, inang, lokasi geografi dan kode isolat sekuen gen ITS *P. palmivora* pada *GeneBank*
Table 1. Accession number, host, geographical location and isolate code of ITS gene sequencing isolates of *GeneBank P. palmivora*

Sumber/ No. Akses	Inang	Lokasi geografi	Kode isolat
Penelitian ini	<i>Cocos nucifera</i>	Desa Tungoi, Kabupaten Bolmong, Sulawesi Utara, Indonesia	KelapaInd/P53KpTuSU
Penelitian ini	<i>Theobroma cacao</i>	Desa Marinsow, Kabupaten Minahasa, Sulawesi Utara, Indonesia	KakaoInd1/P22KoMrwSU
Penelitian ini	<i>Theobroma cacao</i>	Desa Mopuya, Kabupaten Bolmong, Sulawesi Utara, Indonesia	KakaoInd2/P40KoMpySU
AF467093/ APPIAH <i>et al.</i> (2003)	<i>Theobroma cacao</i>	Taiwan	KakaoTaiwan1
AF467094/ APPIAH <i>et al.</i> (2003)	<i>Theobroma cacao</i>	Taiwan	KakaoTaiwan2
AF467096/ APPIAH <i>et al.</i> (2003)	<i>Theobroma cacao</i>	Ghana	KakaoGhana1
AF467090/ APPIAH <i>et al.</i> (2003)	<i>Theobroma cacao</i>	Ghana	KakaoGhana2
DQ987920/ IRISH <i>et al.</i> (2007)	<i>Theobroma cacao</i>	Puerto Rico	KakaoPuertoRico
AY423300/ IVORS <i>et al.</i> (2004)	<i>Theobroma cacao</i>	Costa Rica	KakaoCostaRica

Analisis Filogenetik

Analisis filogenetik dan jarak genetik dari sekuen *P. palmivora* dari *GeneBank* dan *P. palmivora* dari penelitian ini (KelapaInd/P53KpTuSU, KakaoInd1/P22KoMrwSU, KakaoInd2/P40KoMpySU) dilakukan dengan menggunakan program PAUP versi 4.10.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Morfologi Isolat *P. palmivora*

Sebanyak 22 isolat *P. palmivora* telah berhasil diisolasi dari lokasi perkebunan kelapa dan kakao di Jember, Banyuwangi, Minahasa, Bolaang Mongondow dan Gorontalo (Tabel 2). Semua isolat yang diperoleh

Tabel 2. Daftar isolat *P. palmivora* yang digunakan dalam penelitian
Table 2. *P. palmivora* isolate list used in the research

No.	Kode isolat	Asal isolat			Pola tanam	Sumber inokulum
		Lokasi	Kabupaten	Propinsi		
1	P12KpMpgSU	KP Balitka Mapanget	Minahasa	Sulut	Monokultur	Buah kelapa
2	P13KpMpgSU	KP Balitka Mapanget	Minahasa	Sulut	Monokultur	Buah kelapa
3	P34KpMrwSU	PTP XIV Marinsow	Minahasa	Sulut	Tumpangsari	Tanah kelapa
4	P35KpMrwSU	PTP XIV Marinsow	Minahasa	Sulut	Tumpangsari	Tanah kelapa
5	P41KpHbGrto	Desa Anggrek Kelapa hibrida	-	Gorontalo	Monokultur	Tanah kelapa
6	P42KpHbGrto	Desa Anggrek Kelapa hibrida	-	Gorontalo	Monokultur	Tanah kelapa
7	P43KpKdGrto	Desa Anggrek Kelapa dalam	-	Gorontalo	Monokultur	Tanah kelapa
8	P44KpByASU	PTP XIV Boyong atas	Minahasa	Sulut	Monokultur	Buah kelapa
9	P46KpByASU	PTP XIV Boyong atas	Minahasa	Sulut	Monokultur	Buah kelapa
10	P51KpSkjtJT	Desa Sukojadi	Banyuwangi	Jatim	Monokultur	Tanah kelapa
11	P52KpTuSU	Desa Tungoi	Bolaang Mongondow	Sulut	Tumpangsari	Tanah kelapa
12	P53KpTuSU	Desa Tungoi	Bolaang Mongondow	Sulut	Tumpangsari	Tanah kelapa
13	P58KpSdksJT	Desa Senduk	Minahasa	Sulut	Monokultur	Tanah kelapa
14	P61KoSLorJT	Perkebunan Glen More Sepanjang Lor	Banyuwangi	Jatim	Tumpangsari	Buah kakao
15	P02KoKlTgJT	Perkebunan Glen More KaliTagir	Banyuwangi	Jatim	Monokultur	Buah kakao
16	P04KoTrbslJT	PT Lonsum Treblasala	Banyuwangi	Jatim	Tumpangsari	Buah kakao
17	P05KoKlwgJT	Kebun Kaliwining Puslit Kopi dan Kakao	Jember	Jatim	Monokultur	Buah kakao
18	P06KoKlwgJT	Kebun Kaliwining Puslit Kopi dan Kakao	Jember	Jatim	Monokultur	Buah kakao
19	P09KoKlktJT	PTP XII kebun Waringin Kalikempit	Banyuwangi	Jatim	Tumpangsari	Buah kakao
20	P19KoPglSU	PT Lonsum Kebun Pungkol	Minahasa	Sulut	Monokultur	Buah kakao
21	P22KoMrwSU	PTP XIV Kebun Marinsow	Minahasa	Sulut	Tumpangsari	Tanah kakao
22	P40KoMpySU	Desa Mopuya	Bolaang Mongondow	Sulut	Monokultur	Buah kakao

mencirikan *P. palmivora* dengan kriteria sebagai berikut : koloni berbentuk bulat dengan pinggiran rata. Terdapat empat bentuk sporangia ovoid, limoniform, obturbinate, dan obpyriform, panjang sporangium 40-62µm dan lebar 28-43µm, mempunyai papila, pedicel pendek, caducous, dan model percabangan simpel simpodia. Kriteria ini sesuai yang dideskripsikan oleh STAMPS *et al.* (1990).

Karakteristik koloni *P. palmivora* pada umumnya berbentuk bulat dengan pinggiran yang tidak rata dan berwarna putih. Tipe koloni dari 22 isolat tersebut dapat dikategorikan menjadi tiga kelompok yaitu *stelate*, *rosaceous* dan *cottony*. Pada isolat asal kakao terdapat dua tipe koloni yaitu tipe *stelate* (4 isolat) dan *rosaceous* (5 isolat), sedangkan pada isolat asal kelapa terdapat tipe *stelate* (11 isolat) dan *cottony* (2 isolat) (Gambar 1). Berdasarkan data ini nampak bahwa isolat *P. palmivora* mempunyai tipe koloni *stelate*, baik isolat kelapa maupun kakao. Sedangkan tipe *cottony* hanya terdapat pada isolat kelapa dan tipe *rosaceous* terdapat pada isolat kakao.

Menurut APPIAH *et al.* (1999) spesies *Phytophthora* dapat dibedakan dari bentuk koloni yaitu *P. megakarya* berbentuk *cottony*, *P. palmivora* berbentuk *stelate* dan *P. capsici* berbentuk *rossaceous*. Namun, dalam penelitian ini pengenalan spesies *Phytophthora* hanya berdasarkan bentuk koloni saja tidak konsisten karena ketiga tipe koloni *stelate*, *cottony* dan *rossaceous* ditemukan pada spesies *P. palmivora*, walaupun pada umumnya bentuk koloni isolat *P. palmivora* dalam penelitian adalah *stelate*. Seperti juga dikemukakan oleh WATERHOUSE *et al.*, (1983). Jika dilihat dari bentuk koloni saja maka isolat *P. palmivora* tidak dapat dibedakan antara isolat kelapa dan isolat kakao.

Berdasarkan diameter, koloni *P. palmivora* isolat kelapa berbeda nyata dengan isolat kakao ($p=0.0082$). Rata-rata diameter isolat *P. palmivora* asal kelapa (54,8 cm) lebih besar dibandingkan dengan rata-rata diameter asal kakao (43,5 cm) (Gambar 2A). Hasil sidik ragam rata-rata panjang dan lebar sporangium antara rata-rata populasi isolat asal kelapa berbeda nyata dengan rata-rata populasi isolat asal kakao ($p=0,008$ panjang, $p=0.001$ lebar). Rata-



Gambar 1. Tipe koloni isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao
Figure 1. *P. palmivora* isolate colony type from coconut and cacao

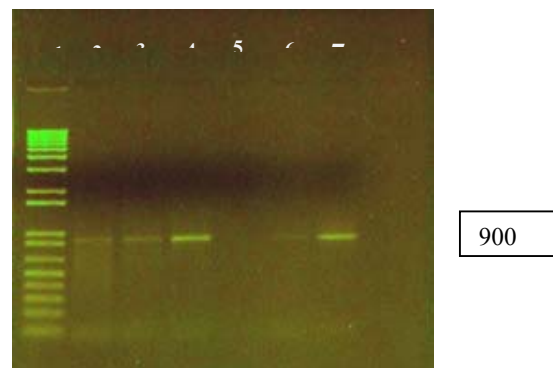
rata panjang sporangium isolat kelapa (53,4) lebih panjang dari isolat kakao (47,5), begitu juga rata-rata ukuran lebar isolat kelapa (38,2) lebih lebar dari isolat kakao (32,8) (Gambar 2B). Hasil sidik ragam perbandingan panjang dan lebar isolat *P. palmivora* asal kelapa 1,41 tidak berbeda nyata dengan isolat asal kakao 1,45. Menurut STAMP *et al.* (1990) panjang dan lebar sporangium *P. palmivora* 35-60 μm dan 20-40 μm serta perbandingan panjang dan lebar rata-rata 1,5 (1,3-1,8) (MCHAU dan COFFEY 1994).

Beberapa peneliti sebelumnya telah mendeskripsikan ciri khas dari *P. palmivora*. Patogen ini sangat berbeda dengan jenis *Phytophthora* lainnya yang tergolong dalam kelompok heterotalik karena sporangianya mempunyai bentuk papila yang mencolok. Bentuk sporangia sangat beragam tergantung pada isolatnya, umumnya berbentuk elipsoid sampai ke ovoid dan mempunyai papila yang menonjol. Sporangia *P. palmivora* adalah caducous dengan pedikel $< 5 \mu\text{m}$, dan sangat beragam dalam ukuran panjang dan lebar, berkisar antara 40-60 μm panjang, lebar 20-40 μm dan perbandingan panjang lebar 1,4-2,0 μm (ERWIN dan RIBEIRO, 1996). Dalam penelitian ini kami mengamati juga bahwa panjang sporangia mencapai 62 μm dan lebar 43 μm . Dari ketiga variabel tersebut menunjukkan bahwa isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao tidak dapat dibedakan dari bentuk koloninya, tetapi dapat dibedakan dari panjang dan lebar sporangium serta diameter koloni.

Perunutan DNA ITS-PCR *P. palmivora*

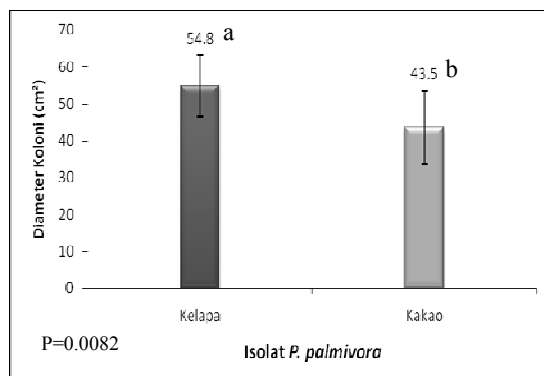
Hasil amplifikasi DNA dengan teknik PCR menggunakan primer ITS 4R dan ITS 5F terhadap 3 isolat *P. palmivora* menghasilkan satu pita dengan ukuran 900 bp (Gambar 3). Pita dengan ukuran ini merupakan spesies *P. palmivora*. Hasil ini sesuai dengan yang diperoleh Umayu (2004). Pita dengan ukuran 900 bp dari ketiga isolat tersebut selanjutnya dilakukan analisis perunutan DNA dengan menggunakan mesin sekuensing ABI-Prism 3100 *Avant Genetic Analyser*.

Hasil penelusuran kesamaan genetik pada *GeneBank* hanya ditemukan isolat *P. palmivora* yang berasal dari kakao, sedangkan isolat asal kelapa tidak ditemukan dalam *GeneBank*. Hasil perunutan DNA selanjutnya digunakan untuk analisis kesamaan genetik dengan menggunakan program PAUP versi 4.10 menunjukkan bahwa isolat *P. palmivora* asal Indonesia terbagi dalam dua kelompok yaitu satu kelompok terdiri dari 2 isolat kakao (KakaoInd1/P22KoMrwSU dan KakaoInd2/P40KoMpySU) dan kelompok lainnya terdiri dari 1 isolat kelapa (KelapaInd/P53KpTuSU). Kedua kelompok ini terpisah dari isolat-isolat asal negara lain (Gambar 4). Jarak kesamaan genetik isolat *P. palmivora* asal kelapa dan asal kakao di Indonesia adalah 73%.



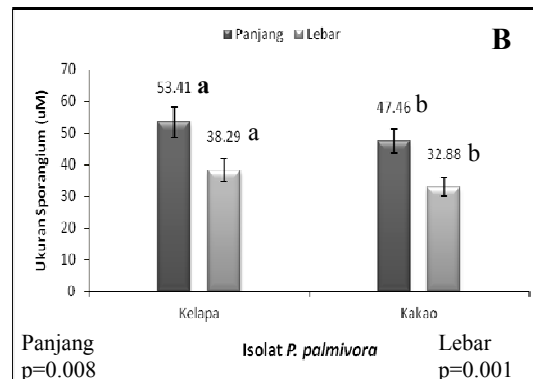
Gambar 3. Hasil amplifikasi ITS-DNA beberapa isolat *P. palmivora* menggunakan sepasang primer ITS 4F dan ITS 5R. Lajur 1 Penanda DNA 1 kb (Invitrogen), lajur 3 isolat KakaoInd1/P22KoMrwSU, lajur 4 isolat KakaoInd2/P40KoMpySU, dan lajur 7 isolat KelapaInd/P53KpTuSU

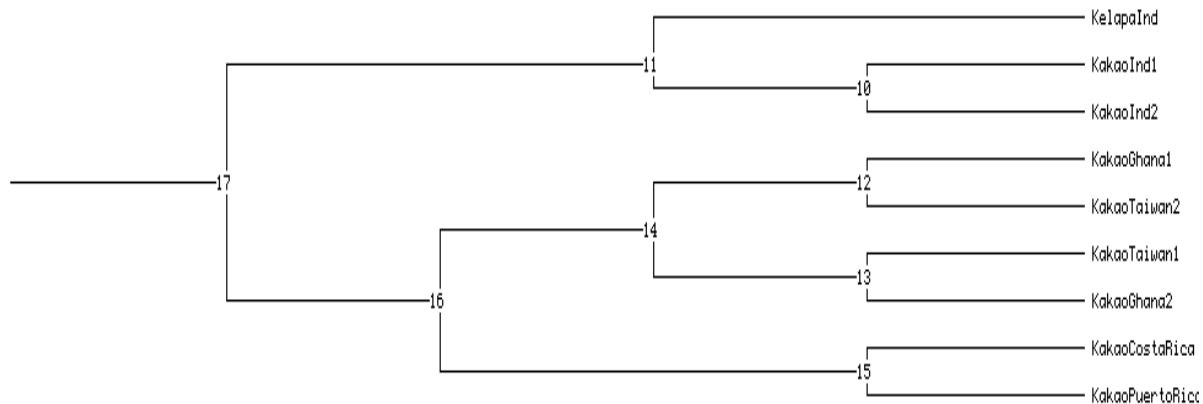
Figure 3. DNA-ITS amplification result of several isolates using a pair of ITS 4F and ITS 5R primers. First column DNA 1 kb (Invitrogen) code, third column isolate of CacaoInd1/P22KoMrwSU, fourth column isolate of CacaoInd2/P40KoMpySU, and 7th column isolate of CoconutInd/P53KpTuSU



Gambar 2. Diameter koloni dari rata-rata isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao (A) dan ukuran panjang dan lebar sporangium dari rata-rata isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao

Figure 2. Colony diameter of *P. palmivora* isolates from coconut and cacao (A) and measurement of sponarium length and width of *P. palmivora* isolates from coconut and cacao





Gambar 4. Dendrogram isolat *P. palmivora* asal Indonesia terhadap isolat dari lokasi lain yang ada pada *GeneBank*
Figure4. Dendrogram *P. palmivora* isolate of Indonesia compared with isolates from other locations

Hal ini menunjukkan bahwa isolat *P. palmivora* asal kelapa berbeda dengan isolat kakao. Isolat-isolat asal Indonesia tidak berada dalam kelompok yang mendekati dengan isolat Taiwan, Ghana, Puerto Rico dan Costa Rica. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi keragaman yang tinggi antar isolat kakao pada daerah-daerah produksi kakao di dunia. Jarak kesamaan genetik isolat asal kelapa dan kakao dari Indonesia maupun dengan isolat kakao dari *GeneBank* adalah 72%.

Berdasarkan peruntutan ITS-DNA didapatkan bahwa isolat *P. palmivora* asal kelapa berbeda dengan isolat asal kakao. Hal ini sangat mendukung hasil identifikasi berdasarkan morfologi kedua isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao. Pengujian virulensi dari setiap isolat pada buah kelapa dan buah kakao serta pengujian inokulasi silang antara isolat kelapa ke buah kakao dan sebaliknya isolat kakao ke buah kelapa perlu dilakukan untuk memastikan apakah terjadi perubahan virulensi dan inokulasi silang dari setiap isolat pada inang yang berbeda. Oleh karena itu sebaiknya dilakukan monitoring secara berkala terutama pada perkebunan tumpangsari kelapa - kakao, monokultur kelapa dan monokultur kakao untuk mengetahui apakah terjadi perubahan virulensi dari isolat kelapa ke kakao atau sebaliknya dari isolat kakao ke kelapa.

KESIMPULAN

Identifikasi secara morfologi dan molekuler dengan teknik PCR menggunakan primer ITS4 dan ITS5 berhasil mengidentifikasi penyakit gugur buah kelapa dan busuk buah kakao, yaitu *P. palmivora* dengan produk PCR 900 bp. Berdasarkan karakter morfologi *P. palmivora* seperti diameter koloni serta panjang dan lebar sporangium menunjukkan bahwa populasi isolat asal kelapa berbeda dengan

populasi isolat asal kakao. Sedangkan berdasarkan tipe koloni dan bentuk sporangium menunjukkan tidak ada perbedaan antara isolat asal kelapa dengan isolat asal kakao. Hasil peruntutan DNA hasil PCR menunjukkan adanya keragaman genetik antar isolat asal kelapa dan kakao di Indonesia. Isolat asal kakao berbeda dengan isolat asal kelapa berdasarkan peruntutan DNA ruas ITS. Isolat *P. palmivora* asal kelapa dan kakao dari Indonesia tidak berada dalam satu kelompok dengan isolat yang berasal dari Thailand, Taiwan, Korea, Puerto Rico, Ghana, dan Cameron.

DAFTAR PUSTAKA

- APPIAH AA, BRIDGE PD, FLOOD J, ARCHER SA. 1999. Variability, pathogenicity and resistance to *Phytophthora* species causing black pod disease of cocoa. Proceedings of the 5 International Conference on Plant Protection in the Tropics, 15-18 March 1999, Kuala Lumpur Malaysia. p.301-306.
- APPIAH AA, FLOOD J, BRIDGE PD, ARCHER SA. 2003. Inter and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolat from cocoa. Plant Pathology. 52: 168-180.
- BENNET DM, HOFFMANN AA. 1998. Effect of size and fluctuating asymmetry on field fitness of parasitoid *Trichogramma carverae* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). Annu Ecol. 67:580-591.
- COOKE DEL, KENNEDY DM, GUY DC, RUSSELL J, UNKLE SE, DUNCAN JM. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assed by random amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. Mycological Research. 100 : 297-303.

- ERWIN DC, RIBEIRO OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. St Paul Minnesota, APS Press. p.97-144.
- FÖRSTER H, KINSCHERF TG, LEONG SA, MAXWELL DP. 1987. Molecular analysis of the mitochondrial genome of *Phytophthora*. *Current Genetic*. 12: 215-218.
- FRANQUEVIELLE H, KOUASSI A. 1992 Development of an inoculation test with *Phytophthora katsurae*, a cause of immature nutfall in Ivory Coast Coconut *Phytophthora* Workshop Proc. Manado 26-30 October 1992.
- GOODWIN SB, DRENTH A, FRY WE. 1992. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNA's from *Phytophthora infestans*. *Current Genetic*. 22: 107-115.
- GOODWIN SB, SUJKOWSKI LS, FRY WE. 1995. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineages of the potato late blight disease fungus. *Phytopathology*. 85:669-676.
- IRISH, B., GOENAGE, R., PARK, S. and KANG, S. Unpublished. First Report of *Phytophthora palmivora*, Causal Agent of Black Pod, on Cacao (*Theobroma cacao* L.) in Puerto Rico. www.ncbi.nlm.nih.gov. 13 Februari 2007.
- IVORS KL, HAYDEN KJ, BONANTS PJM, RIZZO DM, GARBELOTTO M. 2004. AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Mycol. Res*. 108 (Pt 4), 378-392.
- MANGINDAAN HF, THEVENIN JM, KHARIE S, MOTULO HFJ. 1992. The susceptibility of coconut varieties to *Phytophthora* in Indonesia : the effect of environmental factors. Coconut *Phytophthora* Workshop Proc. Manado 26-30 October 1992.
- MASAGO H, YOSHIKAWA M, FUKADA M., NAKANISHI N. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. On a medium for direct isolation of *Phytophthora* spp. from soil and plants. *Phytopathology*. 67: 425-428.
- MCHAU GRA, COFFEY MD. 1994. Evidence for the existence of two distinct sub populations in *Phytophthora capsici* and redescription of the species. *Micological Research*. 99: 89-102.
- MILLER PM. 1955. V8-Juice agar as general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*. 45:461-462.
- OPEKE LK, GORENZ AM. 1974. *Phytophthora* pod rot ; symptoms and and economic importance. In: Gregory PH ed. *Phytophthora* disease of cocoa. New York Longman.
- PAPAVIZAS GC, BOWERS JH, JOHNSTON SA. 1981. Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils. *Phytopathology*. 71:129-133.
- RISTAINO JB, MADRITCH M, TROUT CI, PARRA G. 1998. PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 948-954.
- SCHLICK A, KUHLS K, MEYER W, LIECKFELD E, BORNER T, MESSNER K. 1994. Fingerprinting reveals gamma-ray induces mutation in fungal DNA, implications for the identification of patent strains of *Trichoderma harzianum*. *Current Genetic*. 26: 74-78.
- SILVAR C, MERINO F, DIAZ J. 2006. Diversity of *Phytophthora capsici* in North Spain : Analysis of virulence, metalaxyl response and molecular characterization. *Plant Disease*. 90:1135-1142.
- STAMPS DJ, WATERHOUSE GM, NEWHOOK FJ and HALL GS. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. *Common. Agric. Bur. Int. Mycol. Inst. Mycol. Pap*. 162. 28 pp.
- TROUT CL, RISTAINO JB, MADRITCH M, WANGSOMBOONDE T. 1997. Rapid detection of *Phytophthora infestans* in late blight potatoes and tomatoes using PCR. *Plant Dis*. 81:1042-1048.
- VAN DER VOSSEN HAM 1997. Strategies of variety improvement in cocoa with emphasis on durable disease resistance. *International Crop for Genetic Improvement of Cocoa*, pp.9-18.
- WATERHOUSE GM, NEWHOOK FJ, STAMP DJ. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. In: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH, ed. *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and pathology*. St Paul Minnesota, APS p.139-147.
- WHISSOM SC, DRENTH A, MACLEAN DJ, IRWIN JAG. 1994. Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker two avirulence genes. *Current Genetic*. 27:77-82.
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. p.315-322. In *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*, eds Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Pr Inc. New York.
- UMAYA A. 2004. Keragaman Genetik *P. palmivora* pada Kakao di Indonesia Berdasarkan Pendekatan Molekuler. Disertasi. Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.