

## Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao

*Identification of isolates of Phytophthora from cocoa*

Abu Umayah<sup>1)</sup> & Agus Purwantara<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

<sup>2)</sup>Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia, Bogor 16151, Indonesia

### Summary

*Phytophthora spp. are responsible for some serious diseases of cocoa including pod rot, stem canker, leaf blight, seedling blight, and chupon wilt. Eight species of Phytophthora have been isolated from diseased cocoa worldwide, even though only three species cause most losses in cocoa production. Twenty isolates of Phytophthora sp. were isolated from various parts of the cocoa tree collected from six cocoa producing provinces in Indonesia, viz. North Sumatera, Lampung, West Java, East Java, South Sulawesi and Southeast Sulawesi. All isolates were then identified using their morphological characteristics and it was concluded that all of the isolates are Phytophthora palmivora. This identification was then confirmed with molecular identification by amplification of ITS of rDNA of the isolates with primers ITS 4 and ITS 5, followed by restriction of the amplicon with enzymes. The molecular identification confirmed that all isolates are P. palmivora.*

[Key words: *Theobroma cacao*, *Phytophthora* identification, Internal Transcribed-Spacer (ITS), pod rot, stem canker]

### Ringkasan

*Phytophthora* spp. merupakan penyebab beberapa penyakit penting pada kakao, termasuk busuk buah, kanker batang, hawar daun, hawar bibit, dan layu tunas air. Delapan spesies *Phytophthora* telah berhasil diisolasi dari tanaman kakao sakit di seluruh dunia, meskipun hanya tiga spesies yang meng-

akibatkan kehilangan produksi kakao yang nyata. Dua puluh isolat *Phytophthora* sp. telah diisolasi dari berbagai bagian tanaman kakao yang dikumpulkan dari enam provinsi sentra produksi kakao di Indonesia, yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara. Semua isolat diidentifikasi berdasarkan sifat-sifat morfologi dan dapat disimpulkan bahwa semua isolat adalah *Phytophthora palmivora*. Identifikasi selanjutnya dilakukan secara molekuler dengan amplifikasi daerah ITS dari rDNA isolat menggunakan pasangan primer ITS 4 dan ITS 5, kemudian diikuti dengan pemotongan amplicon menggunakan enzim restriksi. Identifikasi molekuler juga menunjukkan bahwa semua isolat *Phytophthora* penyebab penyakit pada kakao adalah *P. palmivora*.

### Pendahuluan

*Phytophthora* spp. adalah penyebab penyakit penting pada kakao, antara lain penyakit busuk buah, kanker batang, hawar daun, hawar bibit, dan layu tunas air. Di antara penyakit tersebut, busuk buah merupakan penyakit paling penting karena menyebabkan kerugian yang berkisar antara 10 sampai 30% di seluruh dunia, dan kerugian yang jauh lebih tinggi terjadi di daerah endemis, terutama di daerah basah pada musim hujan (McMahon & Purwantara, 2004). Delapan spesies *Phytophthora* telah dilaporkan dapat menyebabkan penyakit pada kakao,

yaitu *P. palmivora* (Butler) Butler di seluruh dunia (Erwin & Ribeiro, 1996), *P. megakarya* (Brasier & Griffin) di Afrika Barat (Brasier & Griffin, 1979), *P. citrophthora* (R.E. Smith & E.H. Smith) di Brazil dan India (Kellam & Zentmyer, 1981; Chowdappa & Mohanan, 1996), *P. capsici* (Leonian) di Brazil dan India (Campelo & Luz, 1981; Chowdappa & Mohanan, 1996), *P. katsurae* (Ko & Chang) di Sri Lanka (Liyanaage & Wheeler, 1989), *P. megasperma* (Dreschler) di Venezuela (Zadoks, 1997), *P. arecae* (Coleman) Pethybridge dan *P. nicotianae* (van Breda de Haan) (Kellam & Zentmeyer, 1986; Erwin & Ribeiro 1996). Namun, hanya tiga spesies, yaitu *P. palmivora*, *P. megakarya* dan *P. citrophthora* yang menimbulkan kerugian paling besar pada kakao (Erwin & Ribeiro, 1996; McMahan & Purwantara, 2004). Laporan yang ada menunjukkan bahwa spesies *Phytophthora* yang menyebabkan penyakit pada kakao di Indonesia adalah *P. palmivora* (Van Hall, 1912; 1914; Tollenaar, 1958; Turner, 1961; Purwantara, 1987; 1990; Sudarmadji & Pawirosoemardjo, 1990; Semangun 2000). Namun, Appiah *et al.* (2003) melaporkan terdapat isolat *P. citrophthora* yang menyebabkan penyakit pada kakao dari Indonesia. Sifat-sifat biologi, epidemiologi dan cara pengendalian penyakit di lapang berbeda di antara spesies *Phytophthora* (Zentmyer, 1974). Oleh karena itu survai spesies *Phytophthora* yang ada di Indonesia yang dilanjutkan dengan identifikasi menjadi sangat penting untuk dilakukan.

Identifikasi spesies melalui studi morfologi jamur *Phytophthora* spp. meliputi sifat-sifat aseksual (tipe koloni, pembengkakan hifa, produksi dan diameter

klamidospora, percabangan sporangiofor, bentuk dan ukuran sporangia, *caducity* (kemudahan sporangia untuk lepas dari sporangiofor), panjang pedisel dan papila) dan sifat seksual (ukuran anteridia, ukuran oogonia, ukuran oospora) sudah umum dilakukan (Waterhouse, 1974a; 1974b), sedangkan identifikasi secara molekuler belum banyak dilakukan. Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan amplifikasi daerah *Internal Transcribed Spacer* (ITS) dari DNA ribosom (rDNA) menggunakan PCR dengan pasangan primer ITS 5 dan ITS 4 atau ITS 1 dan ITS 4.

Hasil amplifikasi berupa pita (amplikon) tunggal berukuran lebih kurang 900 pasangan basa (pb) untuk *P. palmivora*, 862 pb untuk *P. capsici* dan 941 pb untuk *P. fragariae*. Sebaliknya, amplifikasi dengan primer ini pada jamur lain yang berasosiasi dengan tanaman menghasilkan pita berukuran 600 pb. Selanjutnya digesti hasil PCR dengan enzim restriksi menghasilkan pita-pita DNA yang spesifik spesies, sehingga analisis ini dapat digunakan untuk identifikasi spesies (Darmono & Purwantara 2001; Chowdappa *et al.*, 2003). Identifikasi spesies secara morfologi memiliki kelemahan karena dapat dipengaruhi oleh lingkungan, sebaliknya identifikasi secara molekuler akan menghasilkan informasi genetik dengan ketepatan yang lebih akurat dan relatif lebih cepat, dan hasilnya tidak dipengaruhi oleh lingkungan.

Tulisan ini melaporkan hasil isolasi dan identifikasi *Phytophthora* spp. dari berbagai bagian tanaman kakao yang berasal dari enam provinsi sentra produksi kakao di Indonesia. Dengan identifikasi spesies yang benar, diharapkan akan dapat direkomendasikan strategi pengendalian penyakit pada kakao yang tepat.

## Bahan dan Metode

### Isolasi jamur patogen

Jamur patogen diisolasi dari sampel buah atau batang kakao sakit atau tanah di sekitar tanaman kakao sakit yang dikumpulkan dari enam provinsi sentra produksi kakao di Indonesia, yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara. Isolasi patogen dari buah atau batang sakit dilakukan dengan desinfeksi permukaan buah atau batang sakit dan dilanjutkan dengan penanaman jaringan yang diambil dari perbatasan antara jaringan sehat dan sakit pada medium *potato dextrose agar* (PDA). Jamur yang tumbuh pada PDA selanjutnya dibiakkan dan dimurnikan pada medium yang sama sampai diperoleh biakan murni. Isolasi patogen dari tanah dilakukan dengan *baiting* tanah menggunakan buah kakao sehat dengan cara sebagai berikut: buah kakao sehat dibersihkan dengan menggunakan air yang mengalir dan permukaan buah didesinfeksi dengan alkohol 70 %. Buah kakao diiris dengan pisau steril sehingga membentuk sobekan sepanjang 2 cm dan sampel tanah disisipkan ke dalam sobekan. Buah dibungkus dengan kertas dan diinkubasi pada suhu ruang selama 3-5 hari. Setelah timbul gejala busuk berwarna kecoklatan pada buah, patogen diisolasi dari buah kakao sakit dengan cara seperti isolasi dari buah sakit. Isolat jamur patogen yang berhasil diisolasi disajikan pada Tabel 1.

### Identifikasi morfologi

Identifikasi jamur patogen dilakukan berdasarkan pada kriteria morfologi yang dikemukakan Waterhouse (1974a, 1974b),

Holliday (1980), Erwin & Ribeiro (1996), Dreth & Sendall (2001). Sifat morfologi yang digunakan untuk identifikasi adalah tipe koloni, pembengkakan hifa, produksi dan diameter klamidospora, percabangan sporangiofor, bentuk dan ukuran sporangia, *caducity*, panjang pedisel dan papila. Untuk keperluan ini, isolat ditumbuhkan pada medium PDA, dan pengamatan dilakukan dengan menggunakan mikroskop Olympus BX51 yang dilengkapi dengan mikrometer okuler, mikrometer obyektif, dan kamera Ricoh A50. Pengukuran sporangia dilakukan pada 60 sporangia yang dipilih secara acak untuk masing-masing isolat.

### Identifikasi molekuler

Isolat jamur ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Broth* (PDB) dalam tabung Erlenmeyer sebanyak 100 mL, di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama tujuh hari. Miselia disaring dengan menggunakan saringan teh steril, dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak tiga kali, dan digunakan untuk ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA jamur patogen dilakukan menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi khususnya penambahan *Polyvinyl Poly Pyrrolidon* (PVPP) pada waktu penggerusan di dalam lumpang porselin dan  $\beta$ -merkaptotanol ke dalam bufer ekstraksi. Setelah dilakukan pengujian kualitas dan penentuan kuantitasnya, larutan DNA digunakan untuk amplifikasi dengan PCR atau disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ . Amplifikasi DNA dilakukan dengan menggunakan primer spesifik ITS 4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC-3') dan ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG - 3') (White *et al.*, 1990) pada *Thermocycler*

Tabel 1. Daftar isolat *Phytophthora* sp. asal enam provinsi di Indonesia.Table 1. List of isolates of *Phytophthora* sp. from six provinces in Indonesia.

No. No	Kode isolat Code of isolate	Asal isolat Origin of isolate	Bahan isolasi Material for isolation
1	SU-3	Desa Sungai Tahuang, Kec. Secanggang, Kab. Langkat, Prov. Sumatera Utara	Buah
2	SU-4	Desa Sayumsabah, Kec. Sibolangit, Kab. Deli Serdang, Prov. Sumatera Utara	Buah
3	LP-B	Desa Negeri Sakti, Kec. Gedong Tataan, Kab. Lampung Selatan, Prov. Lampung	Buah
4	LP-T	Desa Negeri Sakti, Kec. Gedong Tataan, Kab. Lampung Selatan, Prov. Lampung	Tanah
5	JB-B1-CI0	Kebun BPBP Ciomas, Bogor, Prov. Jawa Barat	Buah
6	JB-T-CI0	Kebun BPBP Ciomas, Bogor, Prov. Jawa Barat	Tanah
7	JB-BLS2	Kebun Layungsari, PT. Intergreen Estate, Cianjur, Prov. Jawa Barat	Buah
8	JB-BLS4	Kebun Layungsari, PT. Intergreen Estate, Cianjur, Prov. Jawa Barat	Buah
9	JB-BLS6	Kebun Layungsari, PT. Intergreen Estate, Cianjur, Prov. Jawa Barat	Buah
10	JB-RAP	Kebun Rajamandala, PTPN VIII, Bandung, Prov. Jawa Barat	Buah
11	JB-BAP	Kebun Bunisari, PTPN VIII, Garut, Prov. Jawa Barat	Buah
12	JT-R	Kebun Renteng, PTPN X, Jember, Prov. Jawa Timur	Buah
13	JT-CP	Kebun Puslit Kopi & Kakao, Jember, Prov. Jawa Timur	Buah
14	JT-GC7	Kebun Puslit Kopi & Kakao, Jember, Prov. Jawa Timur	Buah
15	SS-B1	Bonepute, Kotip Palopo, Prov. Sulawesi Selatan	Buah
16	SS-B2	Bonepute, Kotip Palopo, Prov. Sulawesi Selatan	Buah
17	ST-6	Desa Tasahea, Kec. Tirawuta, Kab. Kolaka, Prov. Sulawesi Tenggara	Buah
18	ST-8	Desa Ujung, Kec. Liliriau, Kab. Soppeng, Prov. Sulawesi Selatan	Batang
19	ST-9	Desa Dangia, Kec. Ladongi, Kab. Kolaka, Prov. Sulawesi Tenggara	Buah
20	ST-10	Desa Gunung Jaya, Kec. Ladongi, Kab. Kolaka, Prov. Sulawesi Tenggara	Buah

### Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao

*Amplitrone*<sup>®</sup>-1 dengan program: tahap denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, tahap pemasangan (*annealing*) pada suhu 42°C selama satu menit, dan tahap pemanjangan (*extension*) pada suhu 72°C selama dua menit. Reaksi PCR berlangsung sebanyak 35 siklus, kemudian ditambah 72°C selama empat menit. Campuran reaksi PCR terdiri atas 50 ng masing-masing primer, 100 ng DNA templat, 10 mM masing-masing dNTP, satu unit polimerase DNA Taq dan H<sub>2</sub>O sampai volume 50 µL. Untuk mengetahui keberhasilan amplifikasi DNA, hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose 2%, dengan tegangan 50 V, selama satu jam. Gel kemudian difoto pada transiluminator UV. Sampel hasil PCR kemudian didigesti dengan enzim restriksi *Alu* I dan *Msp* I pada suhu 37°C selama satu jam, serta *Taq* I pada suhu 65°C selama satu jam. Hasil digesti selanjutnya dielektroforesis pada gel agarose 2%, 50 V, selama satu jam, kemudian difoto pada transiluminator UV.

### Hasil dan Pembahasan

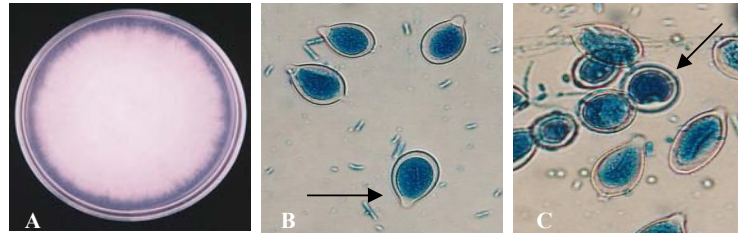
*Sifat-sifat morfologi isolat Phytophthora sp.*

Sebanyak 20 isolat *Phytophthora* sp. berhasil diisolasi dari buah dan batang kakao sakit serta dari tanah di sekitar pertanaman kakao dari berbagai sentra produksi kakao di Indonesia, yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara. Koloni semua isolat mempunyai morfologi yang sama walaupun disubkulturkan berkali-kali, yaitu tumbuh lambat pada PDA, berbentuk bulat dengan pinggiran tidak rata, seperti kapas, berwarna putih, jika dipotong-potong

menggunakan skalpel terasa agak kenyal (Gambar 1). Pada umumnya sporangia berbentuk buah pir (ovoid) meskipun ditemukan juga variasi bentuk lainnya, mempunyai papilla yang jelas, bersifat *caducous* (mudah lepas dari sporangiofor) dengan tangkai pendek (Gambar 1). Morfologi dan ukuran sporangia dan klamidospora disajikan pada Tabel 2 dan 3.

Penelitian sebelumnya melaporkan morfologi jamur yang hampir sama yaitu koloni berwarna putih, tumbuh sangat baik pada medium Corn Meal Agar (CMA) dan Lima Bean Agar (LBA), dengan sporangia lebih banyak diproduksi pada medium LBA, tetapi tumbuh lebih lambat dengan sporangia yang dihasilkan lebih sedikit pada medium PDA dan V8 Juice Agar (Purwantara, 1987). Hendrawati (1997) juga melaporkan bahwa koloni beberapa isolat *Phytophthora* sp. asal kakao yang dipelajarinya berbentuk bulat dengan pinggiran tidak rata, berwarna putih, dengan hifa tampak lurus, jika dipotong menggunakan skalpel akan terasa kenyal sehingga agak menyulitkan ketika akan disubkulturkan pada medium kaldu kentang.

Variasi di antara dua puluh isolat yang dipelajari sangat sedikit, terutama terjadi pada bentuk hifa dan diameter klamidospora, sedangkan semua isolat memproduksi klamidospora berbentuk bulat, terminal dan beberapa interkalar, dengan cabang sporangiofor *simple sympodial*, *caducous* dengan pedisel berukuran 4-6 µm. Pedisel dengan ukuran tersebut dikategorikan sebagai pedisel yang pendek (Waterhouse, 1974a). Pada umumnya sporangia berbentuk ovoid atau buah pir, dengan satu papila yang jelas, banyak juga yang berbentuk globose dan ada juga beberapa isolat yang mempunyai bentuk obpyriform dan ellipsoid, dengan



Gambar 1. A. Morfologi koloni *Phytophthora* sp. pada PDA umur 12 hari. B. Sporangia mempunyai papila yang jelas dengan tangkai pendek (panah). C. Klamidospora (panah). Perbesaran B dan C: 400 x.

Figure 1. A. Morphology of colony of *Phytophthora* sp. on PDA, 12-day old. B. Sporangia with prominent papillae and short pedicels (arrow). C. Chlamydospores (arrow). Magnification for B and C: 400 x.

ukuran sporangia 53-61 x 32-42  $\mu\text{m}$ . Sifat-sifat morfologi semua isolat yang dikumpulkan dari enam provinsi penghasil kakao di Indonesia ini menunjukkan bahwa semua isolat adalah *Phytophthora palmivora* (Waterhouse, 1974ab, Stamps *et al.*, 1990; Drenth & Sendall, 2001).

Menurut Semangun (2000), sporangia *P. palmivora* penyebab busuk buah kakao berbentuk buah pir, dengan ukuran 30-60 x 20-53  $\mu\text{m}$ . Sporangiofor *P. palmivora* tumbuh sympodial, dengan sporangianya berbentuk ovoid, ellipsoid atau obpyriform, mempunyai papila, l/b rasio 1,6 - 2,0, dengan ukuran sporangia 35-60 x 20-40  $\mu\text{m}$ . Variasi ukuran ini di antaranya disebabkan oleh perbedaan kondisi medium, inang, umur biakan, kelembaban dan cahaya (Waterhouse, 1974a; Holliday, 1980; Erwin & Ribeiro, 1996; Drenth & Sendall, 2001).

#### Identifikasi molekuler isolat *Phytophthora* sp.

Amplifikasi DNA 20 isolat patogen dengan pasangan primer ITS 4 dan ITS 5 menghasilkan pita DNA tunggal ber-

ukuran lebih kurang 900 pb (Gambar 2). Setelah digesti dengan enzim restriksi *Alu* I diperoleh pita-pita yang berukuran  $\pm$  500, 160 dan 155 pb, dengan enzim restriksi *Msp* I diperoleh pita-pita yang berukuran  $\pm$  500 dan 400 pb, dan dengan enzim restriksi *Taq* I diperoleh pita-pita berukuran  $\pm$  300, 280, 150 dan 100 pb (Gambar 3). Sifat-sifat molekuler tersebut merupakan sifat-sifat yang dimiliki oleh *P. palmivora* Darmono & Purwantara, 2001; Purwantara & Darmono, 2002).

Berdasarkan sifat-sifat morfologi dan molekuler di atas maka dapat diidentifikasi bahwa dua puluh isolat tersebut adalah *P. palmivora* sebagai penyebab penyakit busuk buah dan kanker batang kakao di Indonesia. Hasil ini mendukung laporan sebelumnya bahwa penyakit utama pada tanaman kakao di Indonesia adalah busuk buah, kanker batang dan hawar daun yang disebabkan oleh *P. palmivora* (Butler) Butler (MF1) (Van Hall, 1912; 1914; Tollenaar, 1958; Turner, 1961; Purwantara, 1987; 1990; Sudarmadji & Pawirosemardjo, 1990; Semangun, 2000). Meskipun Appiah *et al.* (2003) melaporkan terdapat isolat

Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao

Tabel 2. Karakteristik isolat *Phytophthora* sp. asal kakao.  
Table 2. Characteristics of isolates of *Phytophthora* sp. from cocoa.

No. No.	Isolat <sup>a)</sup> Isolate	Pembengkakan hifa <sup>b)</sup> Hyphal swelling	Klamidospora <i>Chlamydospore</i>		Sporangia <i>Sporangia</i>		
			Produksi <sup>c)</sup> Presence	Ø (µm)	Cabang Sporangiofor Branching	<i>Caducity</i> <sup>d)</sup>	Panjang pedisel Pedicel length (µm)
1.	SU-3	-	+	28-40	Simple sympodial	+	4-6
2.	SU-4	-	+	23-38	„	+	4-6
3.	LP-B	+/-	+	28-38	„	+	4-6
4.	LP-T	-	+	34-38	„	+	4-6
5.	JB-BLS2	-	+	28-38	„	+	4-6
6.	JB-BLS4	+/-	+	25-38	„	+	4-6
7.	JB-BLS6	-	+	28-38	„	+	4-6
8.	JB-B-C10	-	+	28-38	„	+	4-6
9.	JB-T-C10	-	+	21-38	„	+	4-6
10.	JB-BAP	-	+	34-40	„	+	4-6
11.	JB-RAP	-	+	28-40	„	+	4-6
12.	JT-GC7	-	+	23-38	„	+	4-6
13.	JT-CP	+/-	+	28-38	„	+	4-6
14.	JT-R	-	+	28-38	„	+	4-6
15.	SS-B1	+/-	+	21-40	„	+	4-6
16.	SS-B2	-	+	19-34	„	+	4-6
17.	ST-6	-	+	23-47	„	+	4-6
18.	ST-8	+/-	+	25-38	„	+	4-6
19.	ST-9	+/-	+	19-40	„	+	4-6
20.	ST-10	+/-	+	34-47	„	+	4-6

<sup>a)</sup> Kode isolat lihat Tabel 1 (*See codes of isolates on Table 1*)

<sup>b)</sup> - Tidak ada pembengkakan hifa (*No hyphal swelling*);

+/- Ada/tidak ada pembengkakan hifa (*Yes/no hyphal swelling*)

<sup>c)</sup> + Klamidospora diproduksi (*Chlamydospores are present*)

<sup>d)</sup> + Sporangia *caducous*.

*P. citrophthora* yang menyebabkan penyakit pada kakao dari Indonesia, diduga *P. citrophthora* hanya ditemukan secara lokal dan bukan penyebab penyakit utama pada kakao di Indonesia.

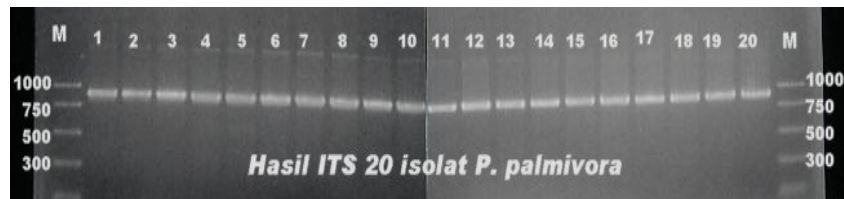
Di antara spesies *Phytophthora* yang berasosiasi dengan kakao, empat spesies, yaitu *P. palmivora*, *P. citrophthora*, *P. capsici* dan *P. nicotianae* sudah lama dilaporkan menyerang tanaman selain

kakao di Indonesia (Semangun, 2000; Purwantara *et al.*, 2004). Di samping itu, *P. palmivora* merupakan patogen pada lebih dari 150 spesies tanaman di antaranya tanaman kakao, kelapa, durian, karet, nangka, pepaya, jeruk, anggrek, lada, vanili dan manggis (Bennet *et al.*, 1986; Drenth, 2001). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat spesifisitas di dalam spesies dan di antara spesies *Phytophthora*

Tabel 3. Morfologi dan ukuran sporangia *Phytophthora* sp. dari kakao  
 Table 3. Morphology and dimension of sporangia of *Phytophthora* sp. from cocoa

No.	Isolat <sup>a)</sup> <i>Isolate</i>	Bentuk <sup>b)</sup> <i>Form</i>	Panjang <i>Length=L</i> ( $\mu\text{m}$ )	Lebar <i>Breadth=B</i> ( $\mu\text{m}$ )	Rerata <i>Average</i> ( $\mu\text{m}$ )	Rasio L/B <i>L/B Ratio</i>	Papilla <sup>c)</sup> <i>Papilla</i>
1.	SU-3	Ovo; Glo	44-57	34-40	57x42	1,3-1,4	P
2.	SU-4	Ovo; Glo	40-66	34-47	57x40	1,2-1,4	P
3.	LP-B	Ovo; Glo	38-76	28-42	59x38	1,4-1,8	P
4.	LP-T	Ovo; Glo	38-76	21-40	57x38	1,8-1,9	P
5.	JB-BLS2	Ovo; Glo	38-57	28-38	57x38	1,4-1,8	P
6.	JB-BLS4	Ovo; Glo	38-66	34-38	59x38	1,2-1,7	P
7.	JB-BLS6	Ovo; Glo	38-57	34-38	57x38	1,4-1,5	P
8.	JB-B-C10	Ovo; Glo;Obp	40-61	28-38	59x34	1,4-1,6	P
9.	JB-T-C10	Ovo; Glo;Ellip	40-76	28-40	61x38	1,4-1,9	P
10.	JB-BAP	Ovo; Glo	45-63	34-38	61x34	1,4-1,7	P
11.	JB-RAP	Ovo; Glo	40-66	25-38	61x38	1,6-1,7	P
12.	JT-GC7	Ovo; Glo;Obp	38-66	28-38	57x34	1,4-1,7	P
13.	JT-CP	Ovo; Glo	40-59	25-34	57x32	1,6-1,7	P
14.	JT-R	Ovo; Glo	38-66	28-38	61x38	1,4-1,7	P
15.	SS-B1	Ovo; Glo;Obp	42-57	28-40	57x38	1,4-1,5	P
16.	SS-B2	Ovo	40-53	28-34	53x34	1,4-1,6	P
17.	ST-6	Ovo; Glo;Obp	38-76	34-38	57x38	1,4-2,0	P
18.	ST-8	Ovo; Glo;Obp	34-76	21-40	59x38	1,6-1,9	P
19.	ST-9	Ovo; Glo	38-57	21-38	57x34	1,5-1,8	P
20.	ST-10	Ovo; Glo	38-66	19-38	57x38	1,7-2,0	P

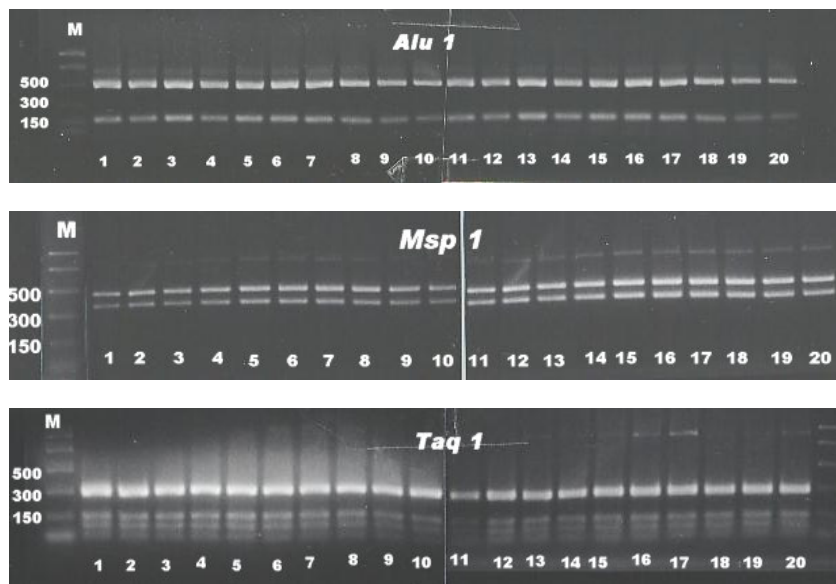
- <sup>a)</sup> Kode isolat lihat Tabel 1 (*See codes of isolates on Table 1*).  
<sup>b)</sup> Ovo = Ovoid; Glo = Globose; Obp = Obpyriform; Ellip = Ellipsoid  
<sup>c)</sup> P = Papilla.



Gambar 2. Pita DNA tunggal ( $\pm$  900 pb) hasil amplifikasi DNA dua puluh isolat *Phytophthora* sp. dengan primer ITS 4 dan ITS 5. (M) Marker, (1) isolat SS-B2, (2) JB-BLS6, (3) JT-CP, (4) ST-10, (5) ST-8, (6) JT-R, (7) JB-T-CIO, (8) JB-B1-CIO, (9) ST-9, (10) ST-6, (11) SU-4, (12) SU-3, (13) JB-BLS2, (14) JB-BLS4, (15) SS-B1, (16) JB-BAP, (17) LP-B, (18) LP-T, (19) JT-GC7, dan (20) isolat JB-RAP. Detail isolat lihat Tabel 1.

Figure 2. Single DNA fragment ( $\pm$  900 bp) amplified from DNA of twenty isolates of *Phytophthora* sp. using primers ITS 4 and ITS 5. (M) Marker, (1) isolate SS-B2, (2) JB-BLS6, (3) JT-CP, (4) ST-10, (5) ST-8, (6) JT-R, (7) JB-T-CIO, (8) JB-B1-CIO, (9) ST-9, (10) ST-6, (11) SU-4, (12) SU-3, (13) JB-BLS2, (14) JB-BLS4, (15) SS-B1, (16) JB-BAP, (17) LP-B, (18) LP-T, (19) JT-GC7, and (20) isolate JB-RAP. For details see codes of isolates on Table 1.

### Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao



Gambar 3. Pita-pita berukuran  $\pm 500$ , 160, 155 pb hasil restriksi dengan enzim *Alu* I (atas); pita-pita berukuran  $\pm 500$  dan 400 pb hasil restriksi dengan enzim *Msp* I (tengah); pita-pita berukuran  $\pm 300$ , 280, 150, dan 100 pb hasil restriksi dengan enzim *Taq* I (bawah); M = marker; 1-20 adalah nomor isolat *Phytophthora* sp. seperti pada Gambar 2.

Figure 3. Fragments of  $\pm 500$ , 160, 155 bp as results of digestion of amplified fragment using enzyme *Alu* I (top); fragments of  $\pm 500$  dan 400 bp as results of digestion of amplified fragment using enzyme *Msp* I (middle); fragments of  $\pm 300$ , 280, 150, dan 100 bp as results of digestion of amplified fragment using enzyme *Taq* I (bottom); M = marker; 1-20 are numbers of *Phytophthora* sp. isolates as shown in Figure 2.

yang mengakibatkan tidak semua isolat dari satu spesies dapat menyerang berbagai tanaman inang dalam waktu yang sama, misal isolat *P. citrophthora* penyebab penyakit pada jeruk di Indonesia tidak dengan mudah menyerang kakao, meskipun di negara lain (Brazil dan India) spesies ini mampu menyerang kakao dengan menimbulkan kerugian yang besar.

### Kesimpulan

Dua puluh isolat yang dikumpulkan dari enam provinsi sentra produksi kakao di Indonesia menunjukkan sifat-sifat morfologi dan molekuler yang relatif sama dan semuanya adalah isolat *P. palmivora*, sebagai penyebab penyakit busuk buah dan kanker batang kakao di Indonesia

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Ir. Meity S. Sinaga, MSc., Prof. Dr. Ir. Sarsidi Sastrosumarjo, dan Prof. Dr. Ir. Sintje Mandang Sumaraw atas saran dan masukan dalam penelitian dan penulisan makalah ini.

### Daftar Pustaka

- Appiah, A.A., J. Flood, P.D. Bridge & S.A. Archer (2003). Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Path.*, **52**, 168-180.
- Bennett, C.P.A., G. Sitepu, O. Roboth & A. Lolong (1986). Pathogenicity of *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler causing premature nut fall disease of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Indon. J. Crop Sci.*, **2**, 59-70.
- Brasier, C. M. & M. J. Griffin (1979). Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **72**, 111-143.
- Campelo, A.M.F.L. & E.D.M.N. Luz (1981). Etiologia de podridao-parda do cacauero, nos Estados da Bahia e Espirito Santo, Brazil. *Fitopatol. Bras.*, **6**, 313-321.
- Chowdappa, P., D. Brayford, J. Smith & J. Flood (2003). Molecular discrimination of *Phytophthora* isolates on cocoa and their relationship with coconut, black pepper and bell pepper isolates based on rDNA repeat and AFLP fingerprints. *Curr. Sci.*, **84**, 1235-1238.
- Chowdappa, P. & C. R. Mohanan (1996). Occurrence of *Phytophthora citrophthora* on cocoa in India. *Trop. Agric. (Trinidad)*, **73**, 158-160.
- Darmono, T.W. & A. Purwantara (2001). Practical work on detection of *Phytophthora*. *Training Course on Early Detection of Woody Plant Diseases With Latent Infection*. Biotechnology Research Unit for Estate Crops, Bogor, Indonesia.
- Drenth, A. (2001). Genetic diversity in *Phytophthora palmivora*. *CRC for Tropical Plant Protection*, Brisbane, Australia.
- Drenth, A. & B. Sendall (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. *CRC for Tropical Plant Protection*, Brisbane, Australia.
- Erwin, D. C. & O. K. Ribeiro (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. APS Press Minnesota.
- Hendrawati (1997). Analisis DNA *Phytophthora* spp. penyebab penyakit busuk pada buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan teknik RAPD. *Skripsi*. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Pakuan, Bogor
- Holliday, P. (1980). Fungus diseases of tropical crops. Cambridge Univ. Press, London.
- Kellam, M.K. & G.A. Zentmeyer (1981). Isolation of *Phytophthora citrophthora* from cocoa in Brazil. *Phytopathol.*, **71**, 230.
- Kellam, M.K. & G.A. Zentmyer (1986). Morphological, physiological, ecological and pathological comparisons of *Phytophthora* species isolated from *Theobroma cacao*. *Phytopathol.*, **76**, 159-164.
- Liyana, N.I.S. & E.J. Wheeler (1989). *Phytophthora katsurae* from cocoa. *Plant Pathol.*, **38**, 627-629.
- McMahon, P. & A. Purwantara (2004). *Phytophthora* on cocoa. In Drenth A. & D.I. Guest (eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. *ACIAR Monograph* No. 114, p. 104-115

Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao

- Orozco-Castillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **89**, 934-938.
- Purwantara, A. & T.W. Darmono (2002). Insiden dan identifikasi molekuler patogen penyakit gugur daun *Phytophthora* pada karet. In *Prosiding Kongres Nasional XVI dan Seminar Ilmiah PFI Bogor*, 22-24 Agustus 2001. p. 462-466.
- Purwantara, A. (1987). Penyebab penyakit *Phytophthora* pada tanaman kakao di Jawa. In *Prosiding Seminar Ilmiah Ilmu Penyakit Tumbuhan dan Kongres Nasional IX Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*. Surabaya 24-26 Nopember 1987, p. 283-290.
- Purwantara, A. (1990). Pengaruh beberapa unsur cuaca terhadap infeksi *Phytophthora palmivora* pada buah kakao. *Menara Perkebunan*, **58** (3), 78-83.
- Purwantara, A., D. Manohara & J.S. Warokka (2004). *Phytophthora* diseases in Indonesia. In Drenth A. & D.I. Guest (eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR Monograph No. 114, p. 70-76.
- Semangun, H. (2000). Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia. Yogyakarta, Gadjah Mada University Press.
- Stamps, D.J., G.M. Waterhouse, F.J. Newhook, G.S. Hall. (1990). Revised tabular key to the species of the *Phytophthora*. CAB London, International Mycological Institute. *Mycological Paper 162*. 128 pp.
- Sudarmadji, D & S. Pawirosoemardjo (1990). Hama dan penyakit, kendala utama dalam pengembangan kakao di Indonesia. Dalam S. Pawirosoemardjo et al. (Eds.) *Perlindungan Tanaman Menunjang Terwujudnya Pertanian Tangguh dan Kelestarian Lingkungan*. Bogor, PT. Agricon
- Tollenaar, D. (1958). *Phytophthora palmivora* of cocoa and its control. *Neth. J. Agric. Sci.*, **6**, 24-38.
- Turner, P.D. (1961). Strains of *Phytophthora palmivora* Butl. (Butl.) from *Theobroma cacao*: II Isolates from non-African countries. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **44**, 409-416.
- Van Hall, C.J.J. (1912). De cacao-kanker op Java en zijn bestrijding. *Mededelingen Proefstation Midden-Java*, **6**, 1-17.
- Van Hall, C.J.J. (1914). De bestrijding van de cacao-kanker op de onderneming Kemiri (Pekalongan). *Mededelingen Proefstation Midden-Java*, **14**, 1-10.
- Waterhouse, G.M. (1974a.) *Phytophthora palmivora* and some related species. In Gregory P.H. (ed.). *Phytophthora Disease of Cocoa*. London, Longman p. 51-70.
- Waterhouse, G.M. (1974b). Other *Phytophthora* species recorded on cacao. In Gregory P.H. (ed.). *Phytophthora Disease of Cocoa*. London, Longman p. 71-79.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J.W. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (eds.) *PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications*. New York, Academic Press Inc. p. 315-322.
- Zadoks, J.C. (1997). *Disease Resistance Testing in Cocoa: A Review on Behalf of FAO/INGENIC* (International Group for Genetic Improvement of Cocoa). University of Reading UK: INGENIC. p. 23-52.
- Zentmyer, G.A. (1974). Variation, genetics and geographical distribution of mating types. In Gregory P.H. (ed.). *Phytophthora Disease of Cocoa*, London, Longman, p. 89-101.