

**KERAGAMAN GENETIK DAN VIRULENSI
ISOLAT *Phytophthora palmivora* DARI TIGA
LOKASI PERTANAMAN KAKAO DI SULAWESI SELATAN**

**ANDI HALIDA ASRIANI
P4100216003**



**SEKOLAH PASCASARJANA
PROGRAM STUDI ILMU HAMA DAN PENYAKIT TUMBUHAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

**KERAGAMAN GENETIK DAN VIRULENSI ISOLAT
Phytophthora palmivora DARI TIGA LOKASI
PERTANAMAN KAKAO DI SULAWESI SELATAN**

TESIS

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Magister

**Program Studi
Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan**

Disusun dan diajukan oleh :

ANDI HALIDA ASRIANI

Nomor Pokok P4100216003

kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2018

TESIS

**KERAGAMAN GENETIK DAN VIRULENSI
ISOLAT *Phytophthora palmivora* DARI TIGA
LOKASI PERTANAMAN KAKAO DI SULAWESI SELATAN**

Disusun dan diajukan oleh:

ANDI HALIDA ASRIANI

Nomor Pokok : P4100216003

Telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Tesis

Pada tanggal 28 Desember 2018

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,

Prof.Dr.Ir.Tutik Kuswinanti, M.Sc

Ketua

Dr. Ir .Vien Sartika Dewi, M.Sc .

Anggota

**Ketua Program Studi
Ilmu Hama dan Penyakit
Tumbuhan**

**Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Hasanuddin**

**Prof.Dr.Ir.Nur Amin,Dipl.Ing.Agr
NIP. 19660925 199412 001**

**Prof. Dr.Sc.Ir. Baharuddin
NIP. 19601224 198601 1 001**

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Andi Halida Asriani

Nomor Pokok Mahasiswa : P4100216003

Program Studi : Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini benar-benar merupakan karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Desember

2018

Yang menyatakan,

Andi Halida Asriani

PRAKATA

Segala puji bagi Allah yang hanya kepadaNya kami memuji, memohon pertolongan, dan mohon keampunan. Kami berlindung kepadaNya dari kekejian diri dan kejahatan amalan kami. Barang siapa yang diberi petunjuk oleh Allah maka tidak ada yang dapat menyesatkan, dan barang siapa yang tersesat dari jalanNya maka tidak ada yang dapat memberinya petunjuk. Dan aku bersaksi bahwa tiada sembah yang berhak disembah melainkan Allah saja, yang tiada sekutu bagiNya. Dan aku bersaksi bahwa Muhammad adalah hambaNya dan RasulNya.

Tesis ini dibuat sebagai salah satu syarat untuk mendapat gelar Magister Pertanian dari Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin. Judul Tesis ini adalah "**Keragaman Genetik Dan Virulensi Isolat *Phytophthora Palmivora* Dari Tiga Lokasi Pertanaman Kakao Di Sulawesi Selatan**". Dalam penyelesaian tesis ini banyak pihak yang telah memberikan perhatian, bantuan, bimbingan, motivasi dan arahan serta nasehat kepada penulis. Maka dari itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada :

1. Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu M.A selaku rektor Universitas Hasanuddin
2. Prof. Dr.Sc.Ir. Baharuddin selaku dekan fakultas pertanian Universitas Hasanuddin
3. Prof.Dr.Ir.Tutik Kuswinanti, M.Sc dan Dr. Ir .Vien Sartika Dewi, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk

memberikan masukan, bimbingan, dan motivasi yang membangun kepada penulis hingga tesis ini terselesaikan dengan baik

4. Prof.Dr.Ir.Nur Amin,Dipl.Ing.Agr Ketua Program Studi Ilmu Hama dan Penyakit Tumbuhan Universitas Hasanuddin
5. Dosen Ilmu Hama Dan Penyakit Tumbuhan Yang Telah Mendidik dan Membimbing Penulis Selama Melaksanakan Pembelajaran di Almamater

Universitas Hasanuddin

6. Bapak Kamaruddin, Bapak Ardan dan Ukhti Nurhadina selaku laboran Ilmu Hama Dan Penyakit Tumbuhan serta staf administrasi Ilmu Hama Dan Penyakit Tumbuhan UNHAS
7. Teman-Teman Magister Ilmu Hama Dan Penyakit Tumbuhan Angkatan 2016 terima kasih atas Kerjasama dan dukungannya.
8. Keluarga Besar Hi.A.M Said dan Hi.Tjondong Muke. Drs. H. Syahrir Muke, Ibu Hj. Serry Taib, S.Sos, Auliya Muke, Odhat Muke, kosfia, Andi fitri, Andi Mega, serta om, tante dan spupu-spupuku yang tidak dapat disebutkan satu persatu kalian selalu memberikan bantuan motivasi untuk menyusun tesis ini.
9. Saudari-saudari dalam “lingkaran kecil Illahi”, yang selalu memberikan keceriaan, doa, senyuman, dan kekuatan dalam bingkai ukhuwah Dwi Sartika Rahim, Rahmawaty Rahman, Ariati Lara Prasasti Dahlan, Prizka Ekawati, Sumarni, Febriyanti, Rulikisriani Bahriul, Kurnia Mustika Sari, Ermida Karim L, Sp. Kalian adalah

sahabat-sahabat dan kakak-kakak yang luar biasa, Jazzakillah khoir atas begitu banyak hal berharga yang sudah sama-sama kita lewati selama ini. Begitu banyak pelajaran dan berkah dari pertemuan kita, keep istiqomah, dan semoga ukhuwah ini akan senantiasa kokoh hingga pertemuan kita kelak di surga-Nya, sukses selalu dalam mengejar mimpi kita masing-masing, ana ukhibukki fillah.

10. Kepada segenap keluarga besar FORUM MUSLIMAH DAKWAH KAMPUS INDONESIA MAKASSAR, Kak Fauziah Ramdani, Lizka Hamzah fitria nengsih, wahidah, Novi, Indah, Ilma, hafsah, Aqifah, Khaulah, Fitrah, Wiwi serta adik-adik Mutarabbiku terima kasih atas bantuan kalian semua semoga ALLAH memberikan kekuatan dan keistiqomahan dalam menjalani amanah ini.
11. Kepada segenap Keluarga Besar MUSLIMAH WAHDAH ISLAMİYAH terkhusus kepada Sang Murabbi kak Lutfah Djabrud (Ummu Fawwas) Syukran atas ilmu dan motivasi nya selama.
12. Teman-Teman Seliqo ABIDAT 7, Semoga Allah pertemukan diJannah-Nya kelak. Syukran Atas semangat dan Doa dari Kalian.

Terkhusus dan teristimewa kepada Kedua orang Tua Kami Andi Syahrial Hi.M.Said (Alm) dan Nurnaila,S.Ag. Syukran telah menjadi orang tua terhebat, yang selalu memberikan motivasi, nasehat, cinta, perhatian, dan kasih sayang serta doa yang tentu takkan bisa penulis balas. Semoga Allah membalas lebih dari apa yang kalian berikan kepada kami.

Tentunya bagitu banyak kekurangan yang terdapat di dalam Tesis ini olehnya penulis mengharapkan masukan dan kritikan. Dan semoga Tesis ini dapat bermanfaat di dunia dan akhirata.Aamiin.

ABSTRACT

Andi Halida Asriani (P4100216003). Morfology Diversity *Phytophthora palmivora* Isolates from Three Location of Cocoa Agriculture at South Sulawesi (Under the guidance of Prof. Dr. Ir. Tutik Kuswinanti, M.Sc and Dr. Ir .Vien Sartika Dewi, M.Sc)

This disease attacks cocoa pods, causing quantitative and qualitative yield losses. The study was conducted to morphologically identify different *P.palmivora* isolates isolated from cocoa plants in main cocoa-producing areas of South Sulawesi. Ccoa pods showing black pod symptoms were collected from the Regencies of Bone, Bulukumba and Pinrang. The pod samples were then brought to the lab for isolation and identification. Twenty one *P. palmivora* were obtained from the cocoa pod samples, 14 isolates from Bone (2 isolates of Itterung village, 6 isolates from Ajjalireng village and 4 isolates from Patangnga village), 6 isolates from Bulukumba (5 isolates from Karossil village and 1 isolate from Tanah Harapan village), and also 3 isolates from Padelo village, Pinrang. Based on the morphological characteristics, such as colony type, sporangium form, chlamydospora form and hyphae swellings, all 21 isolates examined were *P.palmivora*, the causel agent of the cocoa black pod disease.

Keywords: Black pod, diversity, morphology, isolate, *P.palmivora*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kakao merupakan salah satu komoditas andalan perkebunan yang peranannya cukup penting bagi perekonomian nasional, khususnya sebagai penyedia lapangan kerja, sumber pendapatan dan devisa negara. Disamping itu kakao juga berperan dalam mendorong pengembangan wilayah dan pengembangan agroindustri.

Di Sulawesi selatan, tanaman kakao merupakan tanaman andalan dalam sektor perkebunan, terlihat dari jumlah produksi nasional sebanyak 85 % berasal dari Sulawesi Selatan. Dinas Perkebunan Sulawesi Selatan merilis angka produksi kakao tahun 2015 yang berjumlah 140.317 ton. Di mana, produksi paling banyak ada di Kabupaten Luwu berjumlah 27.640 ton. Kemudian, Luwu Utara (Lutra) 22.160 ton, dan Kabupaten Bone 14.308 ton. Tetapi, Produktivitas kakao yang dicapai cenderung menurun dari tahun ke tahun dilihat pada tahun 2017 hanya 112.381 kg/ha, jika dibandingkan pada tahun 2016 produksinya 115.326 kg/ha (Dirjen Perkebunan, 2017).

Salah satu faktor yang menyebabkan rendahnya produksi kakao di Indonesia adalah serangan OPT (Organisme Pengganggu Tanaman) salah satunya disebabkan oleh adanya serangan penyakit *Phytophthora palmivora* penyakit yang menyebabkan busuk buah pada tanaman kakao,

penyakit ini sangat merugikan karena dapat menyerang langsung pada buah, sehingga dapat menurunkan produktivitas serta kualitas mutu biji kakao. Sebagai patogen memiliki ratusan inang dan menyebabkan kehilangan hasil secara global mencapai 20-30% (Guest, 2007). Menurut Urwah 2009, di Indonesia kerugian yang disebabkan mencapai 32,60% - 52,99%, dengan tingkat serangan yang berbeda pada setiap daerah, terutama Sulawesi yang memiliki areal pertanaman kakao terluas, kehilangan hasil akibat penyakit busuk buah di musim hujan dapat mencapai 60% (Rosmana et al., 2006; Rosmana et al., 2010).

Penetapan strategi pengendalian penyakit yang disebabkan *P. palmivora* pada perkebunan kakao tidak terlepas dari kemampuan kita dalam mengidentifikasi keragaman genetik isolat patogen, hubungan kekerabatan antar isolat *P. palmivora* baik yang terdapat pada tanaman kakao itu sendiri maupun pada tanaman inang alternatifnya, dan dinamika populasi patogen di dalam kebun (Darmono et al., 1997). Penggunaan penanda yang akurat dan cepat akan sangat membantu dalam usaha tersebut.

Identifikasi spesies melalui studi morfologi jamur *Phytophthora* spp. Meliputi sifat-sifat aseksual (tipe koloni, pembengkakan hifa, produksi dan diameter kladospora, 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. Oleh sebab itu, identifikasi molekuler perlu dilakukan dan sangat dibutuhkan dalam melengkapi pengkarakterisasian secara molekuler sehingga dapat membantu dalam mengidentifikasi beberapa jenis isolat *Phytophthora*. salah satu teknik yang dilakukan dengan teknik PCR yaitu untuk mengamplifikasi DNA secara *in vitro*. 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.

Selain Teknik PCR pada daerah rDNA (DNA ribosom) Berbagai teknik analisis DNA telah digunakan untuk mengetahui variasi di dalam dan di antara spesies *Phytophthora* yaitu dengan analisis DNA mitokondria dan nucleus dengan teknik RFLP dan analisis peruntukan (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).

Di Indonesia khususnya di Sulawesi Selatan analisis keragaman genetik *P. palmivora* telah banyak diteliti. Namun, belum ada identifikasi yang jelas apakah di antara spesies yang diteliti sudah terbentuk strain-strain yang baru dari cendawan *P. palmivora* dengan membandingkan hasil analisis karakter morfologi dan sekuensnya. Dengan adanya data

yang jelas mengenai karakter morfologi, molekuler serta virulensi dari beberapa isolat kakao yang ada di Sulawesi Selatan maka akan diketahui jenis-jenis *P. palmivora* apakah memiliki kesamaan atau terbentuk strain baru hingga terjadinya keragaman serta tingkat virulensinya. Dengan diketahuinya hal tersebut diharapkan mampu mempermudah teknik pengendalian yang akan diterapkan pada strain baru patogen pada lokasi yang berbeda.

1.2 Rumusan masalah

Penyakit busuk buah kakao yang disebabkan oleh *Phytophthora palmivora* merupakan penyakit penting di Indonesia. Pengembangan kakao di daerah–daerah sentra kakao di Sulawesi Selatan sangat riskan sebagai tempat endemik penyakit ini. Mengingat *P. palmivora* memiliki kisaran inang yang sangat luas serta cara adaptasinya yang sangat tinggi, sangat dimungkinkan akan menimbulkan variasi morfologi dan genetik diantara isolat *P. palmivora*. Selain itu kondisi pertanaman kakao yang berbeda baik secara biotik maupun abiotiknya sehingga akan memicu munculnya terbentuknya strain baru. Oleh karena itu, sangat perlu mengetahui apakah kondisi tersebut telah terjadi dilapangan, mengingat Sulawesi Selatan adalah penghasil terbesar kakao yang ada di Indonesia, dan kakao tersebut dihasilkan dari berbagai Kabupaten yang berbeda kondisi lingkungan sehingga berpeluang menghasilkan gejala yang berbeda pula.

Dengan adanya karakter *P. palmivora* yang berpotensi membentuk keragaman genetik yang tinggi maka kekhawatiran akan terjadinya epidemik busuk buah kakao perlu diwaspadai. Oleh karena itu, perlu dilakukan identifikasi spesies dari isolat *P. palmivora*. Selain itu, perlu dikaji keragaman isolat, virulensi isolat *P. palmivora* asal kakao di Sulawesi Selatan.

Berdasarkan hal tersebut rumusan masalah dalam penelitian ini :

1. Apakah ada perbedaan morfologi baik makroskopis maupun mikroskopis isolat *P. palmivora* pada tanaman kakao di beberapa daerah di Sulawesi Selatan.
2. Apakah terdapat keragaman genetik pada isolat *P. palmivora* asal kakao di beberapa daerah di Sulawesi Selatan berdasarkan teknik Repetitive
3. Apakah terdapat perbedaan tingkat virulensi *P. palmivora* di beberapa daerah di Sulawesi Selatan.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan pada uraian permasalahan diatas, dilakukan Penelitian yang bertujuan untuk:

1. Menganalisis perbedaan karakter morfologi *P. palmivora* baik secara makroskopis maupun mikroskopis, dan runutan ITS-DNA isolat pada tanaman kakao di beberapa daerah di Sulawesi Selatan,

2. Menganalisis keragaman DNA isolat *P. palmivora* asal kakao di beberapa daerah di Sulawesi Selatan berdasarkan teknik Repetitive
3. Menganalisis tingkat Virulensi *P. palmivora* dari beberapa daerah di Sulawesi Selatan.

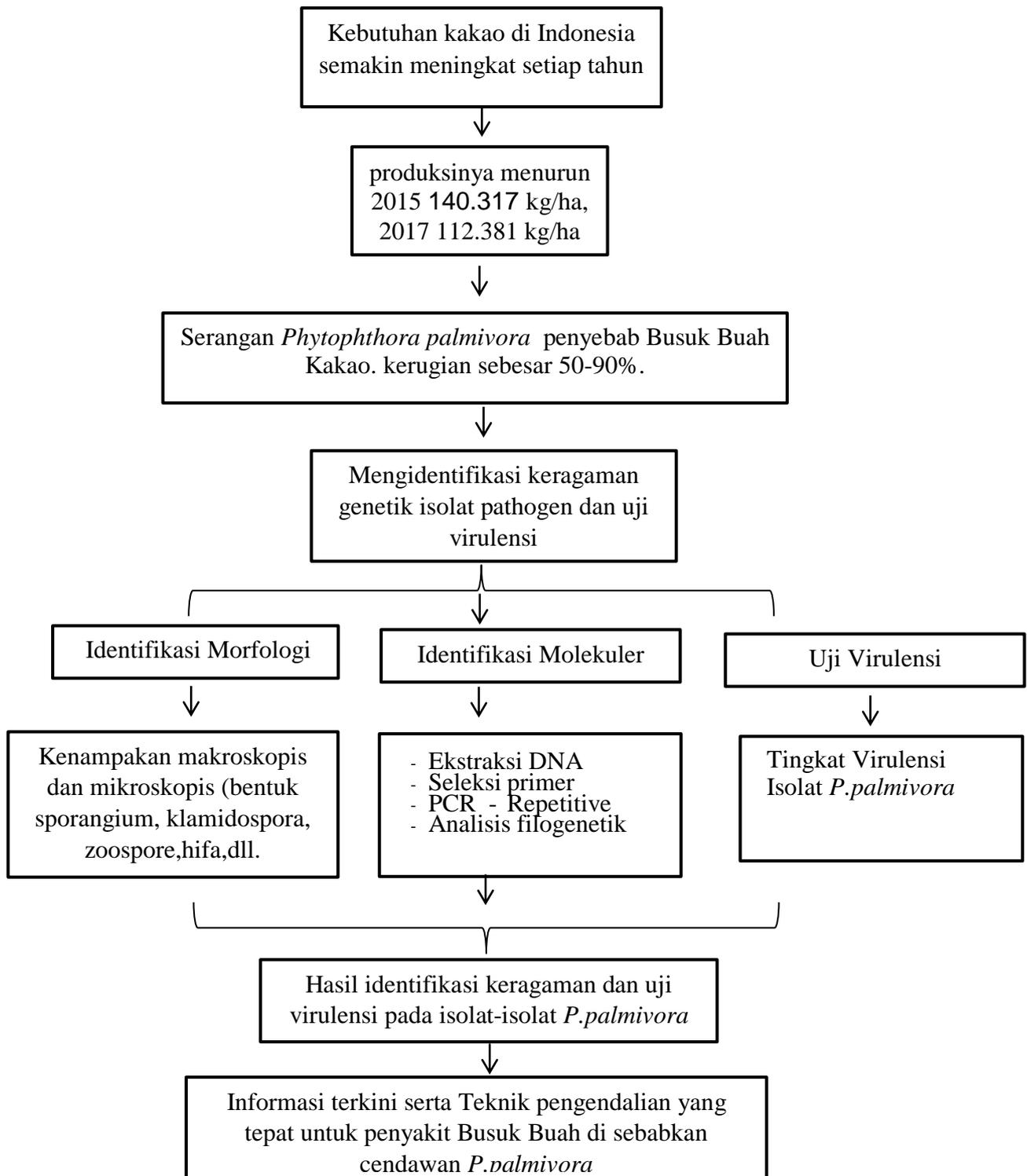
1.4 Kegunaan Penelitian

Adapun Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi yang terkini dalam menyusun pengelolaan penyakit busuk buah yang disebabkan oleh cendawan *phytophthora palmivora* pada perkebunan kakao terkhususnya di Provinsi Sulawesi Selatan.

1.5 Hipotesis

1. Isolat-isolat *Phytophthora palmivora* yang berasal dari beberapa lokasi pertanaman kakao yang berbeda memiliki karakteristik yang berbeda pula.
2. Karakteristik morfologi *P. palmivora* secara makroskopis maupun mikroskopis memiliki perbedaan dengan karakteristik molekuler.
3. Terdapat Perbedaan tingkat Virulensi *P. palmivora* pada kakao yang berasal dari lokasi pertanaman yang berbeda di Sulawesi Selatan.

Secara Skematis kerangka pikir penelitian yaitu sebagai berikut :



Gambar 1. Kerangka Konsep Penelitian

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kakao (*Theobroma cocoa* L.)

Kakao merupakan salah satu komoditas ekspor yang mampu memberikan kontribusi sebagai upaya peningkatan devisa Indonesia. Komoditas kakao menempati peringkat ke tiga ekspor sektor perkebunan dalam menyumbang devisa negara, setelah komoditas karet dan CPO. Pertumbuhan produksi kakao dunia relatif tinggi dengan rata-rata sebesar 5,8% per tahunnya, sementara konsumen tumbuh 4,8% dengan kecenderungan terus meningkat. Indonesia merupakan pemasok ketiga terbesar di dunia setelah Pantai Gading dan Ghana. (Dirjen Perkebunan 2015).

Daerah penghasil kakao dengan urutan sebagai berikut ; Sulawesi Selatan 184.000 (31,9%), Sulawesi Tengah 137.000 ton (23,7%), Sulawesi Tenggara 111.000 ton (19,2%), Sulawesi Barat 76.743 ton (13,8 %), Sulawesi Utara 21.000 Ton (3,6 %), Lampung 17.000 ton (2,9%), Kalimantan Timur 15.000 Ton (2,6 %) dan daerah lainnya 15.257 ton (2,6%). Menurut usahanya perkebunan kakao Indonesia dikelompokkan dalam 3 (tiga) kelompok yaitu ; Perkebunan Rakyat 887.735 Ha , Perkebunan Negara 49.976 Ha dan Perkebunan Swasta 54.737 Ha (Dirjen perindustrian, 2010).

Tanaman kakao yang mempunyai nama ilmiah *Theobroma cocoa* L. merupakan anggota dari familia *Sterculiaceae* (Wood, 1975; Tjitrosoepomo, 1988). Kakao merupakan tanaman diploid yang mempunyai jumlah kromosom 20 ($2n = 2x = 20$). Ukuran genom kakao relatif kecil sekitar $0,43 \times 10^9$ bp sangat mirip dengan genom padi. Dengan demikian berdasar ukuran genomnya tanaman kakao merupakan tanaman perkebunan model untuk studi genomik. Sekuen acuan untuk beberapa genom kakao telah tersedia dan dapat diakses. Berdasar sekuen genom acuan ini, genom kakao mengandung sekitar 28.798 gen (Argout *et al.* 2011). Kakao merupakan jenis tanaman asli hutan hujan tropis Amerika Selatan (Wood, 1975) dan telah lama dibudidayakan di Indonesia yaitu sejak jaman “culturstelsel” tahun 1826 (Sunaryo & Situmorang, 1978). Diperkirakan kakao berasal dari hulu sungai Amazon, tempat *Theobroma* dan jenis sekerabatnya terdapat dalam populasi yang paling besar. Tanaman kakao tersebut merupakan satu-satunya species diantara 22 jenis dalam genus *Theobroma* yang diusahakan secara komersial. **Sistematika** tanaman kakao secara lengkap dapat diklasifikasikan dalam taksa-taksa sebagai berikut: Kingdom : Plantae, Divisi: *Spermatophyta*, Kelas: *Dicotyledoneae*, Ordo: *Malvales*, Familia: *Sterculiaceae*, Genus: *Theobroma*, Spesies: *Theobroma cocoa*, L. (Susanto, 2008).

Kakao merupakan tanaman tahunan yang mulai berbunga dan berbuah pada usia 3-4 tahun setelah tanam. Tanaman ini akan mencapai usia tua pada tahun ke 25 dan akan berkurang produktivitasnya, terutama jika pengelolaan yang dilakukan kurang tepat. Tanaman kakao yang dibudidayakan di kebun tinggi tanamannya adalah sekitar 1.8-3 meter pada umur 3 tahun (Karmawati et al. 2010).

Tanaman kakao membutuhkan curah hujan yang tidak tinggi tetapi merata sepanjang tahun, yaitu curah hujan antara 1100-3000 mm per tahun. Curah hujan yang melebihi 4.500 mm per tahun kurang baik untuk tanaman kakao karena dapat meningkatkan potensi serangan penyakit busuk buah. Daerah dengan curah hujan kurang dari 1.200 mm per tahun masih dapat ditanami kakao, tetapi dibutuhkan irigasi. Suhu ideal maksimum bagi tanaman kakao adalah 30–32°C, sedangkan suhu minimum idealnya berkisar antara 18-21°C.

Sulawesi Selatan merupakan pemasok/produsen utama kakao Indonesia, diikuti Sulawesi Tengah, Sulawesi Tenggara dan Sulawesi Barat. Dari ke empat propinsi tersebut, Sulawesi Selatan merupakan propinsi dengan pertumbuhan tertinggi yang mencapai 8,6%. Khusus di Sulawesi Selatan sentra kakao terdapat di Luwu Raya, dengan total produksi 63.259,21 ton dari total luas areal 133.469,70 Ha yang terdiri dari 3 Kabupaten (Kabupaten Luwu, Kabupaten Luwu Utara, Kabupaten Luwu

Timur) dan 1 Kota (Kota Palopo), ini berarti Luwu Raya memasok sekitar 54% dari total produksi kakao di Sulawesi Selatan sebanyak 117.118,52 ton (Dirjen Perkebunan,2015).

Berdasarkan data yang dihimpun, produksi kakao tahun 2012 mencapai 175.813 ton. Sedangkan, pada 2013, produksi kakao menurun menjadi 148.956 ton. Kemudian, kembali menurun 143.237 ton pada 2014. Dinas Perkebunan Sulsel mencatat produksi 145.674 ton kakao pada tahun 2016. Produksi berasal dari 239.266 hektar lahan yang tersebar di 22 kabupaten/ kota. Produksi tersebut senilai Rp 4,6 Triliun.

2.2 Penyakit Busuk Buah (*Phytophthora palmivora* Butl.) dan Penyebarannya

Penyakit Busuk Buah merupakan penyakit terpenting pada tanaman kakao karena paling merugikan dibanyak daerah sentra produksi kakao. Busuk buah pada kakao terutama disebabkan *Phytophthora palmivora* Butl. Sejak tahun 1979, setelah Brasier dan Griffin mempublikasikan kajian taksonomi *Phytophthora*, diketahui ada spesies lain yang patogenik terhadap kakao, tetapi hanya menimbulkan masalah local ataupun regional, misal *P. arecae* di Vanuata, *P. capcisi* di Kamerun dan Brazil, *P. citrophthora* di Brazil, *P. faberi* dan *P. megakarya* di Afrika Barat (Zadock, 1997). Sebagai patogen tropika, berdasarkan penyebaran inang aslinya, diperkirakan *P. palmivora* berasal dari Amerika Tengah/Selatan atau Indo-Pasifik (Zentmyer, 1988).

Phytophthora palmivora pertama kali diidentifikasi sebagai *P. omnivora* (Masse, 1899), penyebab penyakit busuk buah (black pod) pada kakao kemudian diketahui disebabkan *Pythium palmivorum* (Butler, 1907), Patogen kemudian berganti nama menjadi *P. palmivora* oleh Butler pada tahun 1919 (Butler, 1919).

Delapan spesies *Phytophthora* telah berhasil diisolasi dari 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 (Liyanage & Wheeler, 1989), *P. megasperma* (Dreschler) di Venezuela (Zadoks, 1997), *P. arecae* (Coleman) Pethybridge dan *P. nicotianae* (van Breda de Haan) (Kellam & Zentmyer, 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; McMahon & 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.

Di Indonesia 20 isolat *Phytophthora* sp. dari berbagai bagian tanaman kakao di enam Provinsi (Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara) telah diidentifikasi yang merupakan daerah sentra produksi kakao di Indonesia. Hasil identifikasi secara molekuler menunjukkan bahwa semua isolat merupakan *P. palmivora* (Umayah, A., Agus P. 2006) Intensitas serangan *P. palmivora* dapat mencapai 85% pada daerah yang mempunyai curah hujan yang tinggi, dan menimbulkan kerugian lebih 20- 40%, dan bahkan menyebabkan kematian pohon kakao tersebut 10% per tahun (Sukamto, S. 2003) Kerugian akibat serangan *P. palmivora* pada tahun 2009 berkisar antara 32 – 52%, dan bahkan akan meningkat pada daerah yang mendukung perkembangan patogen tersebut (Umrah, T. Anggraeni, R. R. Esyanti, & I. N. P. Aryantha. 2009).

2.2.1 Taxonomi pathogen

De Bary pertama kali menamakannya sebagai *Phytophthora omnivora* pada tahun 1881. Pada tahun 1907 Butler mendeskripsikannya sebagai *Pythium palmivorum* yang ditemukannya dari penyakit merusak pada tanaman palem-paleman, dan pada tahun 1919 diganti menjadi *Phytophthora palmivora* karena pembelahan zoosporanya terjadi di dalam sporangium bukan pada vesikel eksternal.

Variasi dari *P. palmivora* kompleks menjadikan isolatnya dikelompokkan menjadi 4 bentuk morfologi (MF1 – 4) pada International Workshop on Cocoa *Phytophthora* yang diselenggarakan di Rothamsted, Inggris pada tahun 1976. Brasier dan Griffin (1979) berdasarkan bukti perbedaan kromosom, morfologi dan fisiologi mengelompokkan menjadi 3 spesies yaitu MF1 sebagai *P. palmivora* sensu Butler, MF3 sebagai spesies baru yaitu *P. megakarya* dan MF4 sebagai *P. capsici*. Sementara itu MF2 sebagai varian dari *P. palmivora*.

P. palmivora mempunyai empat tipe spora yang secara langsung maupun tidak langsung mampu menyebabkan infeksi: sporangia, zoospora, oospora dan klamidospora. Sporangia dihasilkan pada buah terinfeksi, daun, batang dan akar. Spora ini mampu berkecambah langsung pada permukaan tanaman atau di dalam tanah dan mampu memproduksi zoospora. Zoospora mampu berenang pada air tanah atau pada air di permukaan tanaman sampai menemukan jalan masuk ke dalam tanaman. Ketika terdapat dua tipe kawin zoospora A1 dan A2,

maka terbentuk oospora. Siklus seksual ini mampu menghasilkan variasi genetik dengan kemungkinan kemampuan untuk mematahkan ketahanan inang. Untungnya, kedua tipe mating ini biasanya tidak ditemukan secara bersamaan. Klamidospora diproduksi secara aseksual dan mampu bertahan di dalam tanah atau bagian tanaman mati pada kondisi tidak ada tanaman inang. Spora berkecambah ketika tanaman inang kembali tersedia pada kondisi cuaca yang mendukung.

Awalnya *Phytophthora* yang tergolong dalam kelas *Oomycetes* dimasukkan dalam kelompok alga (Pringsheim 1858) karena beberapa sifat yang dimiliki oleh kelas *Oomycetes* seperti menyerap nutrisi dan mempunyai miselium maka para ahli penyakit memasukkannya dalam kelompok cendawan. Selanjutnya Kreisel (1969) dan Shaffer (1975) mengeluarkan *Oomycetes* dari cendawan dan mengelompokkan kembali ke dalam alga. Saat ini *Oomycetes* digolongkan dalam Kingdom Stramenopila atau Chromista berdasarkan sifat yang dimiliki oleh zoospora yang mempunyai dua jenis flagela (Patterson & Sogin 1992). Menurut Rossman & Palm (2006), beberapa sifat yang membedakan kelas *Oomycetes* dari cendawan yaitu semua genus dari kelas *Oomycetes* memiliki fase seksual yang menghasilkan oospora, sedangkan cendawan tidak memiliki oospora tetapi zigospora, basidiospora, dan askospora. Miselium *Oomycetes* adalah diploid sedangkan cendawan adalah haploid atau dikariotik. Sifat yang lain dari kelas *Oomycetes* adalah

dinding sel terdiri dari β -glukan dan selulosa sedangkan cendawan mengandung kitin. Krista mitokondria *Oomycetes* berbentuk silinder sedangkan cendawan berbentuk datar. Selanjutnya kelas *Oomycetes* memiliki zoospora dengan dua flagela yaitu: *tinsel* dan *whiplash* sedangkan cendawan, jika memiliki flagela hanya terdiri dari *whiplash* flagella.

Taksonomi *Phytophthora palmivora* menurut (E. J. Butler) E. J.

Butler yaitu (CABI 2007):

Domain : Eukaryota
Kingdom : Chromista
Phylum : Oomycota
Class : Oomycetes
Order : Peronosporales
Family : Pythiaceae
Genus : *Phytophthora*
Spesies : *P. palmivora*

2.2.2 Epidemiologi dan Penyebaran Penyakit

Tanah merupakan sumber inokulum bagi *P. palmivora* (Guest, 2007). Propagul infeksi dari cendawan ini yang paling penting adalah zoospora motil dan zoospora tersebut terlepas dari sporangium oleh tetesan air, kemudian terbawa oleh turbulensi udara dan menyebar dalam bentuk tetesan yang bisa menginfeksi buah atau daun (McMahon & Purwantara, 2004; Konam & Guest, 2004). Selain tetesan air, rayap dan semut dapat membantu menyebarkan propagul seperti miselium dan klamidospora dari tanah ke permukaan tanaman kakao (Konam & Guest, 2004). Sebagai sumber infeksi, semut dapat membawa cendawan *P. palmivora* karena sering membuat sarang di tanah (McMahon & Purwantara, 2004). Peran semut ini sangat penting terutama dalam penyebaran secara vertikal seperti yang terjadi di Papua New Guinea dan Afrika. Keberadaan semut dalam populasi yang tinggi di kedua wilayah ini berhubungan dengan kerusakan yang berat oleh penyakit busuk buah kakao (McGregor & Moxon, 1985; Konam & Guest, 2004).

Buah kakao merupakan bagian yang sangat rentan terhadap penyakit busuk buah terutama pada buah yang belum matang. Patogen dapat menginfeksi semua bagian permukaan buah, tetapi yang paling rentan adalah bagian pangkal buah. Jika buah sudah terinfeksi *P. palmivora* maka permukaan buah akan menunjukkan

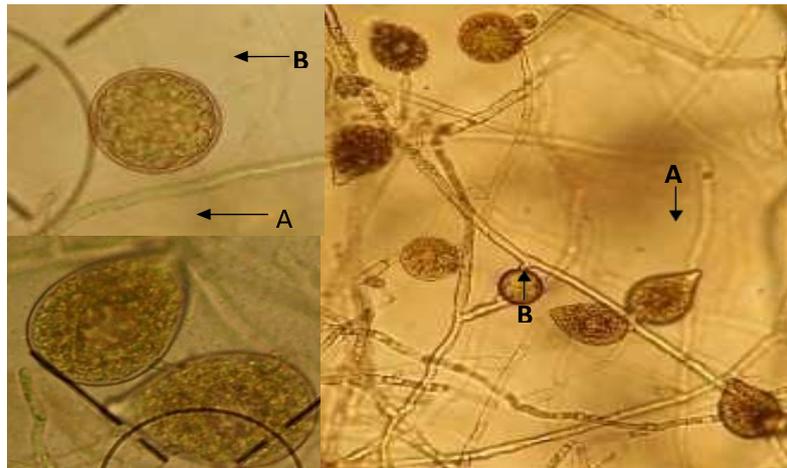
warna coklat kehitaman dan akan menyebar menutupi permukaan buah. Jika kelembaban sesuai maka seluruh permukaan buah akan ditutupi miselium yang berwarna putih dan mengandung sporangium.

Sumber inokulum *P. palmivora* dapat berasal dari akar, batang, dan alat- alat pertanian yang digunakan dalam proses panen. Pada akar dan batang yang terinfeksi dengan *P. palmivora* dalam keadaan tersedia air akan membentuk sporangium yang mengandung zoospora dan merupakan sumber inokulum yang potensial. Alat-alat pertanian seperti parang dan gunting stek yang digunakan pada tanaman yang terserang penyakit busuk buah dapat menyebarkan propagul *P. palmivora* jika digunakan pada tanaman sehat. Hujan yang disertai dengan angin dapat juga menjadi perantara bagi penyebaran penyakit busuk buah kakao pada tanaman kakao lainnya. Penyebaran inokulum dapat mencapai ketinggian empat meter. Semut dan tikus dapat menyebarkan sporangium, miselium, dan zoospora dari *P. palmivora*. Hasil penelitian Rosmana *et al*, 2010 menunjukkan bahwa semut (*Anoplolepis longipes*) dapat menyebarkan inokulum tetapi di lapangan tidak menunjukkan adanya peningkatan kejadian penyakit busuk buah kakao. Di Papua New Guinea golongan rayap (*Technomyrmex albipes*) dapat menyebarkan inokulum dan juga meningkatkan jumlah buah yang terserang penyakit busuk buah (McGregor & Moxon 1985).

2.2.3 Biologi Patogen

Secara umum *Phytophthora palmivora* mempunyai ciri-ciri yang istimewa dibandingkan dengan cendawan tingkat tinggi. Seluruh kehidupan *Phytophthora* adalah diploid, dinding selnya terdiri atas selulosa dan β 1,3-glucan (Barnicki- Garcia & Wang 1983). *Phytophthora palmivora* tidak menghasilkan sterol tetapi memerlukan β -hidroksi sterol untuk sporulasinya (Elliot 1983). Selain itu organisme ini tahan terhadap antibiotik seperti pimaricin. Menurut Stamps *et al.* (1990) *P. palmivora* dikelompokkan ke dalam kelompok II yang telah dideskripsikan secara lebih rinci oleh Waterhouse (1970) dan Stamps (1985).

Miseliumnya tidak bersepta, tumbuh menembus ke dalam sel-sel tanaman inang dan membentuk haustorium untuk mengabsorpsi nutrisi. Bentuk sporangium sangat beragam bergantung kepada tiap isolat tetapi umumnya berbentuk lonjong sampai bulat. Sebanyak 20 sporangium dapat dihasilkan dalam satu tangkai sporangium. Sporangium bersifat mudah lepas dari tangkai (*caducity*) dan setelah sporangium terpisah terlihat tangkai spora atau pedikel yang sangat pendek berukuran 5 μ m. Panjang sporangium berkisar 40-60 μ m dan lebar 25-40 μ m serta ratio panjang lebar adalah 1.4-2 (Holiday 1980). Bentuk sporangium, kladospora dan miselium *P. palmivora* ditampilkan dalam Gambar 2.

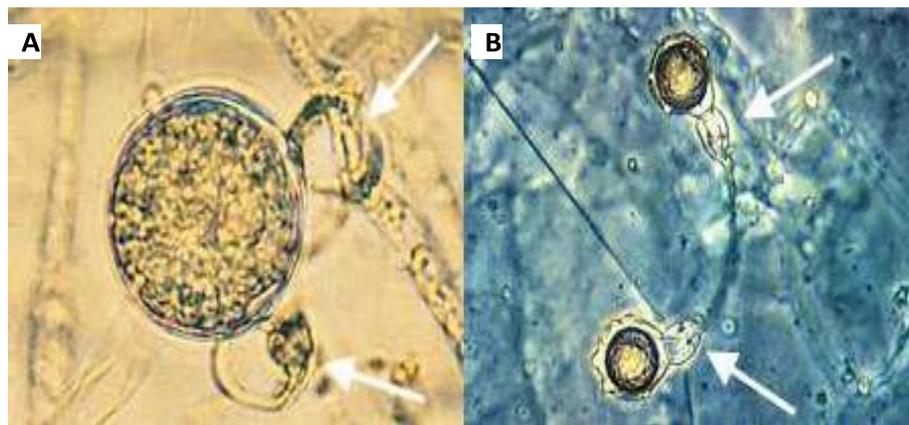


Gambar 2. *P. palmivora* : Sporangium (A) dan klamidospora (B)

Satu sporangium mengandung 10-40 zoospora yang berflagela dan akan dilepaskan apabila diinkubasikan dalam air (Holliday 1980). Kemudian zoospora akan melepaskan flagela yang berubah menjadi kista dan berkecambah membentuk tabung kecambah. Zoospora merupakan salah satu inokulum penting bagi penyebaran penyakit. Selain zoospora dan sporangium *Phytophthora* juga membentuk klamidospora yang terletak di ujung atau di tengah miselium. Klamidospora berbentuk globose sampai ke subglobose, terletak interkalari pada miselium dengan diameter berukuran 32-42 μm (Mchau & Coffey 1994).

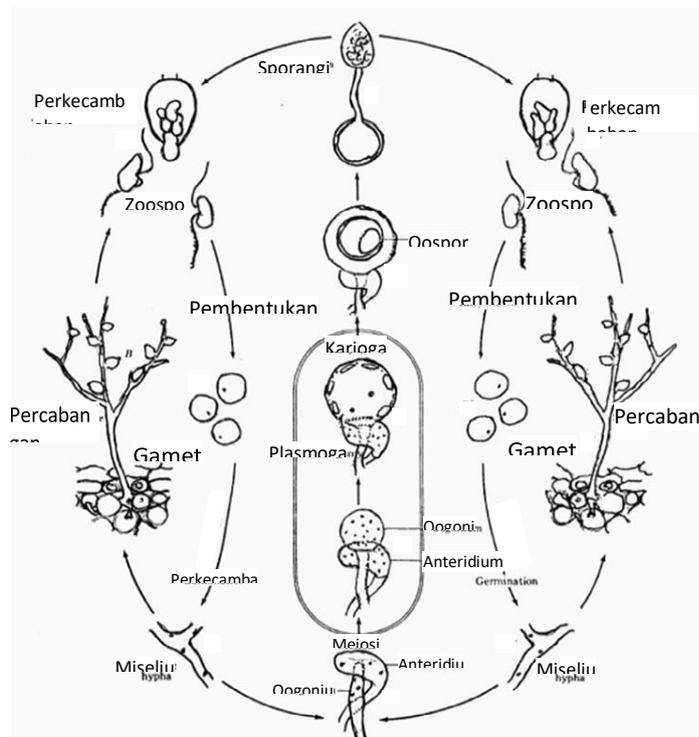
P. palmivora membentuk oogonium dan anteridium secara alami atau buatan. Oogonium dibentuk secara lateral atau terminal berdinding tipis dan tidak berwarna waktu masih muda. Setelah matang oogonium akan berdinding tebal dan berwarna coklat keemasan. Anteridium juga dibentuk secara lateral atau terminal, berdinding tipis,

tidak berwarna pada waktu muda tetapi akan berwarna kuning hingga coklat keemasan apabila telah matang. Pada kelas *Oomycetes* terdapat dua tipe anteridium yaitu *amphigynous* dan *paragynous*. Jika posisi anteridium berada disamping oogonium dinamakan *paragynous* anteridium dan jika posisi anteridium terlihat mengapit pada bagian basal oogonium disebut *amphigynous* anteridium (Gambar 3).



Gambar 3. Anteridium *paragynous* dari *Phythium* (A), anteridium *amphigynous* dari *P. cambivora* (B) (Hefler *et al.* 2002). Keterangan : tanda panah menunjukkan anteridium.

Apabila oogonium dan anteridium dari *P. palmivora* berpasangan maka terjadi fertilisasi antara kedua tipe kawin tersebut sehingga terbentuk oospora (Brassier & Griffin 1979). Secara *in vitro* oospora dibentuk pada suhu rendah (20°C) dalam keadaan gelap dan nutrisi yang sesuai. Pada keadaan alami, oospora dibentuk pada jaringan berkayu atau sisa-sisa tanaman yang terhindar dari cahaya. Perkembangan siklus hidup asexual maupun sexual *P. palmivora* ditampilkan dalam Gambar 4.



Gambar 4. Siklus hidup *Phytophthora palmivora* (Alexopoulos *et al.* 1996)

2.3 Keragaman Genetik *Phytophthora palmivora*

P. palmivora tipe A2 biasanya diisolasi dari buah kakao, sedangkan tipe A1 diisolasi dari pucuk kelapa dan batang karet. Pada kakao kedua tipe kawin A1 dan A2 ditemukan, dengan A2 merupakan isolat yang dominan. Di Afrika Barat *P. megakarya* tipe A1 yang menjadi predominan pada buah kakao, sedangkan tipe A2 sejauh ini hanya ditemukan pada buah kakao di Kamerun. Dari 70 isolat *P. palmivora* yang dikoleksi oleh Appiah *et al.* (2003) dari pertanaman kakao di seluruh dunia hanya 16 isolat tipe A1 sedangkan yang lainnya adalah tipe A2. Sebaliknya *P. palmivora* yang dikoleksi dari inang di luar kakao terdapat 19 tipe A1 dari 29 isolat. Oospora hampir belum

pernah ditemukan di lapang, namun oospora bisa didapatkan jika tipe kawin A1 dan A2 dipasangkan secara *in vitro* pada media V8. Turner (1960) mendapatkan koleksi isolat *P.palmivora* dunia yang mempunyai karakter morfologi yang seragam. Brasier dan Griffin (1979) juga melaporkan karakter morfologi dari isolat *P. palmivora* yang ada di *International Collection* relatif seragam.

Penelitian tentang keragaman DNA dan virulensi antar spesies maupun antar isolat sudah dilakukan pada beberapa spesies *Phytophthora*, misalnya *P. infestans* (Gotoh *et al.* 2005), dan *P. cinnamomi* (Chang *et al.* 1996). 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. Selanjutnya Appiah membedakan spesies *Phytophthora* antara *P megakarya* yang bentuk koloninya seperti kapas (*cottony*), *P. palmivora* yang berbentuk *stelate* dan *P capsici* yang berbentuk *rosette*.

Analisis genetik dengan penanda RFLP dan isozim dapat memberikan pemahaman tentang struktur populasi dan evolusi yang terjadi pada beberapa spesies *Phytophthora* (Fry *et al.* 1993). Goodwin *et al.* 1994 mengemukakan sebelum tahun 1980 isolat-isolat dari klon tunggal tipe A1 dan US-1 didominasi oleh *P. infestans*. Isolat US-1 merupakan isolat hasil propagasi asexual dari strain- strain *P. infestans* yang masuk pada tahun 1980 dari Mexico ke Amerika Utara dan

menyebar ke seluruh dunia (Goodwin 1997). Tooley *et al.* (1986) telah membandingkan variasi genetik berdasarkan penanda isozim dan molekuler pada isolat asexual *Phytophthora* spp. dari Amerika Utara dan Mexico. Teridentifikasi bahwa terdapat 15 kelompok genotipe pada populasi *Phytophthora* dari Mexico yang mempunyai rekombinasi genetik yang tinggi. Sebaliknya pada tipe asexual dari Amerika Utara hanya terdapat empat kelompok genotipe dan tidak terdapat rekombinasi genetik.

2.4 Identifikasi *Phytophthora palmivora*

Identifikasi spesies *P. palmivora* adalah salah satu langkah awal yang harus dilakukan untuk mendapatkan metode pengendalian. Sampai saat ini identifikasi secara konvensional seperti pengamatan morfologi masih digunakan. Waterhouse (1963) mengidentifikasi *Phytophthora* berdasarkan karakter morfologi sebagai berikut :

1. Tipe anteridium : *amphygenous* atau *paragynous*, dan pembentukan oospora secara homotalik atau heterotalik.
2. Bentuk, ukuran, dan rasio panjang/lebar dari sporangium. Ada atau tidak ada papila pada sporangium.
3. Ada atau tidak ada sifat sporangium yang mudah lepas dari tangkai sporangium (*caducity*) dan panjang pedikel.
4. Proliferasi sporangium.
5. Tipe percabangan.

6. Ada atau tidak ada klamidospora.
7. Ada atau tidak ada pembengkakan hifa.
8. Suhu maksimum untuk pertumbuhan.

Selain itu, tipe koloni dan diameter koloni merupakan karakter yang penting dalam mengidentifikasi *Phytophthora*. 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).

Umumnya patogen yang menyerang kakao adalah *P. palmivora* dan sebagian lagi *P. megakarya* dan *P. citrophthora* (Brasier dan Griffin 1979). Selanjutnya isolat *P. palmivora* yang berasal dari Afrika Barat diidentifikasi mempunyai tiga bentuk morfologi yaitu : *morphological form* (MF)-1 adalah *P. palmivora* (Waterhouse 1974), MF3 *P. megakarya* (Griffin 1977, Brasier & Griffin 1979), dan MF-4 *P. capsici* (Tsao & Alizadeh 1988). Pengelompokan menurut *morphological form* (MF)1, MF3, dan MF4 berdasarkan panjang

pedikel (Zentmyer *et al.* 1977) , ukuran dan jumlah kromosom (Sansome *et al.* 1975) serta bentuk morfologi sporangium dan oogonium (Brasier *et al.* 1981).

2.5 Identifikasi *P.palmivora* dengan teknik molekuler runutan DNA

Fungsi-fungsi gen sering dapat diturunkan dari sekuen nukleotidanya, misalnya dalam membandingkan sekuen sampel dengan sekuen gen yang telah diketahui fungsinya. Informasi sekuen nukleotida sangat penting dalam bidang kloning molekuler sebab dengan mengetahui sekuen DNA maka dapat ditentukan situs enzim restriksi spesifik atau dapat memprediksi *open reading frame* (ORF) sekuen DNA yang bersangkutan.

Metode pertama yang dilakukan untuk merunut bentangan panjang DNA ialah dengan melakukan degradasi secara kimia. Metode ini melibatkan degradasi kimia terhadap fragmen DNA yang akan dirunut (Ilyas 2005). Akan tetapi metode ini menghasilkan ketidakstabilan beberapa reaktan sehingga menyebabkan hasil tidak konsisten. Selain itu, metode ini juga menggunakan bahan kimia yang berbahaya seperti hidrasin, piperidine, dan dimetylsulfat (Zyskind & Berastein 1992) sehingga metode ini jarang digunakan. Metode kedua adalah metode terminasi rantai atau juga disebut metode dideoksi. DNA yang akan dirunut diinkubasi dengan DNA polimerase I, primer dan dNTP dengan melibatkan penanda radioaktif pada salah satu dNTPnya (Voot *et al.* 1999).

Saat ini perkembangan perunutan DNA dimudahkan dengan adanya bantuan komputer dalam menganalisis ruas basa-basa DNA secara otomatis. Metode ini merupakan satu variasi dari metode terminasi rantai dimana primer yang digunakan dalam reaksi perpanjangan rantai masing-masing dihubungkan dengan warna pendaran yang berbeda (Voot *et al.* 1999).

Analisis perunutan DNA hanya dilakukan pada sekuen DNA tertentu, dalam banyak analisis terutama dilakukan pada ruas ITS-DNA (Tan *et al.* 1996) dan ruas 5.8S rDNA (Bailey *et al.* 1996). Analisis ruas ITS-DNA dari RNA ribosom telah dilakukan untuk mendeterminasi keragaman di dalam spesies *Phytophthora* (Cook *et al.* 1996). Perbedaan runutan DNA telah digunakan untuk membedakan antar spesies *Phytophthora* (Ristaino *et al.* 1998). Runutan ruas DNA ITS telah digunakan untuk mempelajari hubungan kekerabatan dari banyak spesies *Phytophthora* (Lee & Taylor 1992).

Berbagai teknik analisis DNA telah digunakan untuk mengetahui variasi di dalam dan antar spesies *Phytophthora* seperti analisis DNA mitokondria dan nukleus dengan teknik RFLP (Förster *et al.* 1987) dan analisis perunutan (*sequencing*) ribosom RNA (rRNA).

2.6 Penggunaan PCR untuk mendeteksi *Phytophthora*

Dewasa ini untuk mengkarakterisasi maupun mendeteksi cendawan telah dikembangkan teknik molekuler *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Teknik ini merupakan metode *in vitro* untuk mensintesis asam nukleat atau nukleotida dengan cara satu bagian DNA dapat diperbanyak dalam waktu singkat.

Pada dasarnya amplifikasi DNA dalam mesin PCR mengikuti pola sintesis DNA di dalam sel. Di dalam sel proses sintesis DNA meliputi penguraian utas ganda DNA menjadi utas tunggal yang disebut denaturasi. Kemudian sintesis rantai DNA baru dengan menggunakan utasan tunggal sebagai model atau cetakan. Sintesis DNA dimulai dengan penempelan primer pada utas tunggal DNA cetakan, dilanjutkan dengan pemanjangan rantai DNA dan pembentukan utas ganda kembali. Sintesis DNA mempunyai arah pertumbuhan 5 – 3 , yaitu dua nukleotida digabungkan satu dengan lainnya dengan cara merangkaikan karbon gula kelima (C5) yang mengandung fosfat dari satu nukleotida kepada karbon gula ketiga (C3) yang mengandung OH dari nukleotida lain membentuk ikatan fosfodiester.

Seperti halnya sintesis DNA di dalam sel, amplifikasi DNA pada mesin PCR secara *in vitro* membutuhkan enzim DNA polimerase, primer, basa nukleotida (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), MgCl₂ dan buffer yang berfungsi sebagai kofaktor enzim serta H₂O. Reaksi PCR

melibatkan pengaturan suhu pada mesin PCR selama pengulangan siklus. Setiap siklus terdiri atas tiga tahap : 1) Denaturasi dengan pemisahan DNA untai ganda menjadi untai tunggal pada suhu 94°C, 2) Penempelan primer (*anealing*) dilakukan dengan menurunkan suhu reaksi sehingga primer dapat menempel pada DNA target sesuai dengan ruas komplementernya. Suhu *annealing* berkisar antara 50-60 °C. 3) Sintesis DNA pada suhu 72 °C sehingga memungkinkan enzim DNA polimerase bekerja lebih aktif. Selanjutnya primer secara langsung diperpanjang dengan bantuan DNA polimerase untuk mensintesis untai komplemen dari DNA target dengan adanya dNTP (Voot *et al.* 1999). Ketiga tahapan tersebut dilakukan dalam satu siklus, namun untuk memperoleh jumlah DNA yang banyak maka siklus PCR diulang 30-40 kali.

Penggunaan teknik PCR untuk deteksi dan analisis keragaman *Phytophthora* banyak dilakukan. Förster *et al.* (2000) telah mempelajari hubungan filogenetik beberapa spesies *Phytophthora* berdasarkan analisis ruas daerah ITS rRNA dengan membandingkan kelompok morfologi V dan VI dari Waterhouse. Hibridisasi secara alami antara *P. nicotianae* dan *P. cactorum* telah dideteksi melalui PCR-RAPD (Willem *et al.* 1998).

Salah satu faktor penting yang mempengaruhi kualitas PCR ialah konsentrasi komponen reaksi (MgCl₂, buffer, enzim, DNA cetakan, primer, nukleotida, dan H₂O), suhu denaturasi, suhu penempelan primer, suhu pemanjangan primer, jumlah siklus, serta keutuhan dan kemurnian DNA cetakan (Halden *et al.* 1996).

2.7 Virulensi *P. palmivora*

Satu spesies *Phytophthora* dapat menyebabkan beberapa penyakit pada tanaman yang sama maupun yang berbeda. *P. infestans* dapat menyebabkan penyakit hawar daun pada tanaman kentang dan tomat. Berdasarkan karakterisasi DNA mitokondria, tipe isoenzim dan kepekaan terhadap metalaksil diketahui *P. infestans* asal kentang berbeda dengan *P. infestans* asal tomat (Wangsomboodee *et al.* 2002).

Pengujian Virulensi 26 isolat *P. palmivora* asal durian pada tanaman durian, karet, dan lada menunjukkan dapat menyebabkan bercak coklat pada tanaman lada dan karet meskipun pada tanaman durian patogenisitasnya lebih tinggi (Pongpisutta & Sangchote (2004). Virulensi isolat *P. palmivora* asal kakao dapat menginfeksi bibit tanaman karet sehingga menyebabkan penyakit pada daun dan pucuk tanaman setelah 7-8 hari, sedangkan isolat *P. palmivora* asal karet tidak dapat menginfeksi tanaman kakao (Orellana 1959).

Kharie *et al.* (1992) melakukan pengujian patogenisitas *P. palmivora*, *P. arecae* dan *P. nicotianae* pada kelapa GKN. Hasil pengujian patogenisitas yang paling tinggi adalah *P. palmivora*. Berdasarkan hal ini di dalam penelitian ini penulis menggunakan *P. palmivora* sebagai penyebab penyakit gugur buah pada kelapa dan busuk buah pada kakao, meskipun kedua patogen *P. arecae* dan *P. nicotianae* dilaporkan juga sebagai penyebab penyakit gugur buah pada kelapa dan busuk buah pada kakao (Quillec *et al.* 1984).

Kellam dan Zentmyer (1981) telah mempelajari Virulensi *P. palmivora*, *P. citrophthora* dan *P. capsici* pada bibit kakao. Tidak ada satupun bibit yang mati ketika diinokulasi dengan *P.capsici* setelah delapan minggu, tetapi bibit yang diinokulasi dengan *P. palmivora* dan *P. citrophthora* menyebabkan kematian bibit sebesar 67% dan 53%.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel buah yang diduga terserang penyakit busuk buah kakao dilaksanakan di Kabupaten Bone, Bulukumba dan Pinrang. karakter morfologi *P. palmivora* diidentifikasi di Laboratorium Penyakit, Jurusan Ilmu hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Tadulako. Analisis Molekuler dilaksanakan di Laboratorium RS. Universitas Hasanddin. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2017 sampai September 2018.

3.2 Metode Pelaksanaan

3.2.1 Identifikasi *P.palmivora*

Pengambilan sampel busuk buah kakao di lakukan di tiga lokasi pertanaman kakao dengan keadaan ekologi yang berbeda-beda. yaitu pada kabupaten Bone, kabupaten Bulukumba dan kabupaten Pinrang. Dari masing-masing wilayah Sampel diambil secara purposive sampling, dengan pengambilan sampel sesuai gejala yang menunjukkan busuk pada buah yang ada di lapangan dan kemudian dibawa ke laboratorium untuk dilakukan proses identifikasi. Proses identifikasi awal dilakukan dengan mengamati miselium yang tumbuh pada permukaan buah kakao dibawah mikroskop untuk memastikan adanya spora *phytophthora*.

3.2.1.1 Isolasi dan Koleksi *P. palmivora*

Isolasi patogen dari buah sakit dapat dilakukan dengan proses penanaman langsung ke media dan atau dengan menginokulasi pada bagian buah yang sehat. Tahapan inokulasi pathogen dilakukan dengan menyediakan buah kakao yang bergejala dan buah kakao yang sehat. Kemudian melakukan sterilisasi permukaan pada masing-masing buah sehat dan buah bergejala dengan mencuci masing-masing buah tersebut dengan air dan Alkohol 70%, agar cendawan pada permukaan buah tidak terikut saat proses inokulasi. Selanjutnya, penanaman jaringan dengan mengambil bagian buah bergejala yang menunjukkan infeksi aktif dengan menggunakan korkborer hal ini dilakukan pada perbatasan antara jaringan sehat dan sakit, kemudian dipindahkan pada buah yang sehat. Setelah itu, buah yang telah diinokulasikan dibalut dengan wrapping plastic dan diinkubasi selama tiga hari sampai gejalanya muncul.

Media untuk perbanyak isolat yang digunakan dalam percobaan ini adalah media *potato dextrose agar* (PDA) yang telah dimodifikasi. Permukaan buah sakit disterilisasi dengan alkohol 70%, penanaman dilakukan dalam *laminar air flow cabinet* yaitu dengan mengambil jaringan pada perbatasan antara jaringan sehat dan sakit berukuran 0,5 cm x 1 cm lalu ditanam pada media PDA di dalam cawan petri, kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu 15-25°C. Isolat *P. palmivora* yang tumbuh diisolasi hingga didapat biakan murni, selanjutnya diidentifikasi, dan digunakan dalam pengujian-pengujian lebih lanjut.

Media padat yang digunakan adalah media modifikasi dari V8 Jus (Dina, 2016). Pembuatan media terdiri dari difco bacto agar 15 gram, 50 ml clarified V8 concentrate, chloramphenicol 250 mg dan 950 ml aquades untuk pembuatan 1 liter media. Clarified V8 concentrate merupakan V8 yang sudah dijernihkan (diganti dengan V8 Jus modifikasi) yaitu 50 ml V8 jus yang ditambahkan CaCO₃ 0,5 gram kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 20 menit dan disaring (Jeffer, 2006) cairan hasil penyaring digunakan sebagai bahan pembuatan media. Selanjutnya media di autoclave dan dituang pada cawan petri untuk keperluan isolasi.

Pemurnian isolat dari tiga lokasi pertanaman kakao dilakukan dengan menumbuhkan kembali cendawan yang tumbuh pada media hingga diperoleh isolat *P. palmivora* murni. isolat yang berhasil dimurnikan selanjutnya masing-masing diperbanyak pada media padat yang diinkubasi pada suhu 25⁰C dalam kondisi gelap. Perbanyak isolat pada media padat, selain untuk penyimpanan juga digunakan untuk proses identifikasi morfologi dan perbanyak pada media cair untuk keperluan identifikasi secara molekuler.

Isolat *P. palmivora* yang terpilih kemudian ditumbuhkan pada media cair untuk keperluan ekstraksi DNA pada proses identifikasi secara molekuler. Media cair yang digunakan memiliki komposisi yang sama dengan pembuatan media padat tetapi tidak menggunakan agar bacto. Selanjutnya dimasukkan pada botol media sebanyak 100 ml kemudian di autoclave. Setelah dingin, masing-masing isolat dari media padat

dikorkbohrer dan dipindahkan ke dalam botol media cair yang telah diberi label kemudian diletakkan pada shaker selama 8-15 hari hingga terbentuk gumpalan miselium dalam media cair tidak pada permukaan media cair, karena sifat *P. palmivora* dalam media cair terbentuk seperti gumpalan dalam media cair.

3.2.1.2 Identifikasi Morfologi *P. palmivora*

Identifikasi *Phytophthora* secara morfologi dilakukan berdasarkan bentuk dan ukuran sporangium, diameter koloni, tipe koloni, papila dan pedikel, *caducity*, tipe anteridium, tipe percabangan miselium, dan tipe kawin menurut petunjuk identifikasi Waterhouse *et al.* (1983) dan Stamp *et al.* (1990). Pengamatan tipe koloni dilakukan dengan melihat model pertumbuhan dari miselium yang dikategorikan dalam bentuk *stelate*, *rossaceous* dan *cottony*. Pengamatan papila dan pedikel dilakukan hanya dengan melihat ada atau tidak ada papila dan pedikel. Pengamatan *caducity* yaitu dengan melihat sifat sporangium yang mudah lepas dari tangkai spora. Pengamatan percabangan miselium dilakukan dengan mengamati banyak atau sedikitnya percabangan miselium.

3.2.1.3 Identifikasi Molekuler *P. palmivora*

Metode ekstraksi DNA untuk PCR mengikuti cara yang dilakukan oleh Goodwin *et al.* (1992) dan Sambrook *et al.* (1989). Isolat *P. palmivora* berumur 6- 10 hari dipindahkan ke media cair V8 dalam

tabung erlemeyer. Setelah 7-10 hari miselium dipanen dan disaring dengan kertas Whatman Nomor 1 kemudian disimpan dalam tabung *ependorf*, jika sampel belum digunakan maka dapat disimpan pada suhu -20°C . Miselium ini akan digunakan dalam ekstraksi DNA *P. palmivora*.

Miselium dari beberapa isolat *P. palmivora* 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 μl 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 μl khloroform, dikocok kemudian disentrifus pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Supernatan diambil dan dipindahkan ke tabung baru kemudian ditambahkan 1000 μl isopropanol dingin lalu dikocok, kemudian disentrifus pada kecepatan 11000 rpm selama 10 menit. Larutan dibuang selanjutnya pelet DNA ditambahkan 200 μl TE (1x) dikocok perlahan dan diinkubasikan selama satu jam pada suhu 37°C . Selanjutnya ditambahkan 0.1 volume Sodium Asetat dan 2.5 volume etanol murni dan disentrifus pada 14.000 rpm selama 10 menit.

Pellet DNA dicuci dengan 70% etanol 500 µl dan disentrifus pada 12000 rpm pada suhu 4°C selama 5 menit. Kemudian etanol dibuang dan pellet dilarutkan dalam TE 100 pada suhu ruang kemudian disimpan pada suhu 80°C.

Melakukan Elektroforesis untuk memastikan kuantitas DNA yang diperoleh dari hasil ekstraksi DNA pada tabung eppendorf apakah sudah siap untuk di PCR. Sampel ekstraksi disimpan pada freezer jika belum digunakan.

3.2.1.3.1 Amplifikasi sekuen ITS-DNA

DNA hasil ekstraksi diamplifikasi dengan teknik PCR berdasarkan metode Trout *et al.* (1997) menggunakan primer universal I2reverse dan A2forward. Susunan basa primer I2reserve adalah 5'-GAT ATC AGG TCC AAT TGA GAT GC-3' dan primer A2forward adalah 5'- ACT TTC CAC GTC AAC CGT TTC AA-3' (White *et al.* (1990).

Tabel 1 Campuran reaksi amplifikasi ITS-DNA dengan teknik PCR

No	Komponen	Volume (1 sampel)
1	dH2O	5,5 µl
2	Primer I2reverse	1 µl
3	Primer A2forward	1 µl
4	Taq DNA Polymerase	12,5 µl
5	Template DNA	5 µl
	Total	25 µl

Amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR Gene Amp PCR System 9700 berlangsung dengan tahapan sebagai berikut. Tahap pra amplifikasi 10 menit pada suhu 95°C, tahap denaturasi 30 detik pada suhu 95°C, annealing selama 30 detik pada suhu 50-60 °C dan tahap extension selama 45 detik pada suhu 72°C. Pada tahap akhir proses PCR dilakukan Final Extension selama 7 menit pada suhu 72°C dengan 34 siklus.

3.2.1.3.2 Elektroforesis

Untuk mendapatkan gambar pita DNA hasil amplifikasi dengan PCR maka DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel Agarose. Fragmen DNA hasil amplifikasi ditambah dengan 3 ul larutan penanda Bromofenol blue dimasukkan ke dalam lubang-lubang gel Agarose 0,9%. Selanjutnya pita dilarikan pada gel elektroforesis dengan menyambungkan pada *power supply* 100 volt selama 30 menit. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel Agarose dalam etidium bromida 0.5 ug/ml selama 30 menit lalu dibilas dengan H₂O. Pita DNA hasil amplifikasi diamati di atas transiluminator UV dan dipotret dengan alat dokumentasi gel UV.

3.2.1.3.3 Analisis Keragaman Genetik

DNA ke 21 isolat *P. palmivora* yang telah diekstrak kemudian diamplifikasi dengan teknik PCR. Seleksi primer dilakukan terhadap isolat *P. palmivora* yaitu primer BOX A1R.

Volume akhir campuran reaksi PCR adalah 40 ul. Komposisi reaksi adalah sebagai berikut : 1x larutan penyangga reaksi (50 nM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.8 dan 0.1% triton X-100), 200 uM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.4 µM primer, 1 U *Tag* DNA polymerase (*Invitrogen*), 50 ng DNA genom dan dd H₂O sehingga mencapai 25 ul.

Amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR berlangsung dengan tahapan sebagai berikut. Tahap pra amplifikasi 5 menit pada suhu 94°C, tahap pemisahan utas 1 menit pada suhu 94°C, tahap penempelan primer 1 menit pada suhu 55°C, tahap sintesis 1 menit pada suhu 72°C, tahap pasca amplifikasi 5 menit pada suhu 72°C. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 38 siklus. Untuk mendapatkan gambar pita DNA isolat *P. palmivora* hasil amplifikasi dengan PCR maka DNA hasil amplifikasi dielektroforesis pada gel Agarose. Fragmen DNA hasil amplifikasi ditambah dengan 3 ul larutan penanda Bromofenol blue dimasukkan ke dalam lubang-lubang gel Agarose 1%. Selanjutnya pita dilarikan pada gel elektroforesis dengan menyambungkan pada *power supply* 70 volt selama 60 menit. Pewarnaan dilakukan dengan merendam gel Agarose dalam etidium bromida 0.5 ug/ml selama 30 menit lalu dibilas dengan H₂O. Pita DNA hasil amplifikasi diamati di atas transiluminator UV dan dipotret dengan alat dokumentasi gel UV.

3.2.3 Virulensi *P. palmivora*

3.2.3.1 Persiapan inokulum

Inokulum yang akan digunakan dalam pengujian ini diambil dari biakan murni ke 21 isolat *P. palmivora* yang telah dikoleksi. Isolat *P. palmivora* ditumbuhkan pada medium agar V8 selama 7 hari. Biakan murni yang mengandung miselium dan sporangium dipotong dengan diameter 0.3 cm, lalu diinokulasi pada buah kakao.

3.2.3.2 Metode inokulasi pada buah kakao

Sebelum diinokulasikan pada bagian permukaan kulit buah kakao dilakukan pembersihan dari sisa-sisa bahan organik yang menempel pada kulit buah. Inokulasi inokulum *P. palmivora* dilakukan dengan cara menempelkan potongan agar yang mengandung sporangia dan miselium berumur 7 hari pada bagian tengah bidang dari buah kakao. Lalu, potongan agar tersebut ditutup dengan pita berperekat dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7hr. Peubah yang diamati adalah masa inkubasi (hari), luas bercak cm^2 , keparahan penyakit (%), dan prakiraan laju infeksi (r).

Periode laten

Periode laten dihitung mulai dari waktu inokulasi sampai dengan munculnya gejala awal yang ditandai oleh adanya bercak coklat pada daerah sekitar tempat inokulasi.

Luas bercak

Pengukuran luas bercak dilakukan terhadap bagian permukaan kulit buah yang mempunyai bercak coklat. Pengukuran ini dilakukan setiap hari dengan menggunakan milimeter blok transparan sejak munculnya gejala awal hingga 7 hari masa inkubasi.

Keparahan penyakit atau kerusakan jaringan buah

Keparahan penyakit dihitung menurut Rumus Townsend & Heöberger Unterstenhifer 1976, yaitu :

$$KpP = \frac{\sum_{i=0}^5 (ni \times vi)}{N} \times 100\%$$

Keterangan:

- KpP = Presentasi keparahan penyakit
- Ni = Jumlah buah yang berbercak pada setiap kategori
- Vi = Nilai numerik masing-masing serangan, dimana i adalah skor 1,2,3,4 dan 5
- V = Nilai numerik kategori serangan tinggi
- N = Jumlah buah yang diamati

Nilai skoring setiap kategori serangan berdasarkan pengamatan besarnya luas bercak (cm²) pada buah kakao yaitu :

Skor 0: tidak ada bercak,

Skor 1 : 0 < X ≤ 20,

Skor 2: 20 < X ≤ 40,

Skor 3: 40 < X ≤ 60,

Skor 4: 60 < X ≤ 80,

Skor 5: X ≥ 80

Laju infeksi

Perhitungan laju infeksi dilakukan menurut Rumus Zadoks dan Schein (1980),

$$r = \frac{2,3}{t_2 - t_1} \left(\log \frac{x_2}{1 - x_2} - \log \frac{x_1}{1 - x_1} \right)$$

Keterangan: r = Laju infeksi

t_1 = Waktu pengamatan keparahan penyakit pada X_1

t_2 = Waktu pengamatan keparahan penyakit pada X_2

x_1 = Nilai keparahan penyakit pada waktu t_1

x_2 = Nilai keparahan penyakit pada waktu t_2

Tingkat virulensi isolat *P. palmivora* ditentukan berdasarkan data periode laten, keparahan penyakit dan laju perkembangan penyakit. Kriteria penentuan tingkat virulensi setiap isolat *P. palmivora* asal kelapa maupun kakao ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 2 Kriteria penentuan tingkat virulensi isolat *P. Palmivora*

Periode Laten	Keparahan Penyakit (%)	Laju perkembangan penyakit (r)	Tingkat virulensi
$X > 7$	$0 < X \leq 10$	$r = 0$	Avirulen
$5 < X \leq 7$	$10 < X \leq 20$	$0 < r \leq 0.2$	Virulen rendah
$3 < X \leq 5$	$20 < X \leq 30$	$0.2 < r \leq 0.4$	Virulen sedang
$1 < X \leq 3$	$X > 30$	$r > 0.4$	Virulen tinggi

3.2.3.3 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan Analisis sidik ragam, bila perlakuan berpengaruh nyata maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Uji DMRT 5 %.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

Hasil pengamatan tentang keragaman genetik *phytophthora palmivora* serta Uji virulensi buah kakao di 6 lokasi pertanaman kakao yang berbeda yaitu Kabupaten Bone (Desa Itterung, Desa Ajjalireng dan Desa Patangnga) Kabupaten Bulukumba (Desa Tanah Harapan dan Desa Karossil) dan Pinrang (Desa Padelo) merupakan sentra pertanaman kakao di Sulawesi Selatan.

Kebun kakao yang kita amati merupakan kebun dengan pola tanam kakao Tumpangsari kakao, kelapa dan lamtoro dan Pisang. Di lokasi dijumpai banyak tanaman kakao yang menunjukkan gejala busuk buah. Di lokasi Bone varietas Kakao yang di tanam adalah kakao klon S1 dan klon S2, sedangkan pada Kabupaten Bulukumba jenis klonnya adalah 45 dan S1 dan serta Pinrang yaitu klon MO1 dan MO4. Selain itu pengambilan sampel dilakukan pada musim hujan sehingga mudah didapatkan sampel penyakit busuk buah pada kakao. Selanjutnya mengamati morfologi secara makroskopis dan mikroskopis yang dilanjutkan dengan analisis molekuler serta uji virulensi pada buah kakao.

4.1.1 Isolasi *Phytophthora palmivora*

Melalui isolasi patogen *P.palmivora* dari buah kakao diperoleh 21 isolat, yang terdiri dari 12 isolat *P. palmivora* asal Bone (2 isolat Desa Itterung, 6 isolat Desa Ajjalireng dan 4 isolat Desa Patangnga), 6 isolat *P. palmivora* asal Bulukumba (5 isolat Desa karossil dan 1 isolat Desa Tanah Harapan) serta 3 isolat asal Pinrang Desa Padelo (Tabel 3).

Tabel 3. Koleksi isolat *P. palmivora* asal kakao yang digunakan dalam penelitian

NO	Kode Isolat	Asal Isolat		Pola Tanam	Sumber Inokulum
		Lokasi	Kec/Kabupaten		
1	BnL1P2	Desa Itterung	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
2	BnL1P7	Desa Itterung	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
3	BnL2P2	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
4	BnL2P3	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
5	BnL2P5	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
6	BnL2P6	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
7	BnL2P8	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
8	BnL2P9	Desa Ajjalireng	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
9	BnL3P1	Desa Patangnga	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
10	BnL3P2	Desa Patangnga	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
11	BnL3P3	Desa Patangnga	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
12	BnL3P7	Desa Patangnga	Tellu Siatinge/Bone	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
13	BkL1P9	Desa Tanah Harapan	Rilau Ale/Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi

14	BkL2P2	Desa karossil	Herlan/ Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
15	BkL2P3	Desa karossil	Herlan/ Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
16	BkL2P6	Desa karossil	Herlan/ Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
17	BkL2P7	Desa karossil	Herlan/ Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
18	BkL2P9	Desa karossil	Herlan/ Bulukumba	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
19	PrL2P6	Desa Padelo	Mattiro Bulu/Pinrang	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
20	PrL2P7	Desa Padelo	Mattiro Bulu/Pinrang	Tumpang Sari	Buah terinfeksi
21	PrL2P8	Desa Padelo	Mattiro Bulu/Pinrang	Tumpang Sari	Buah terinfeksi

Isolasi patogen dari sampel buah kakao yang terserang penyakit busuk buah terlihat dengan adanya gejala berwarna coklat kehitaman yang akan menyebar menutupi permukaan buah.

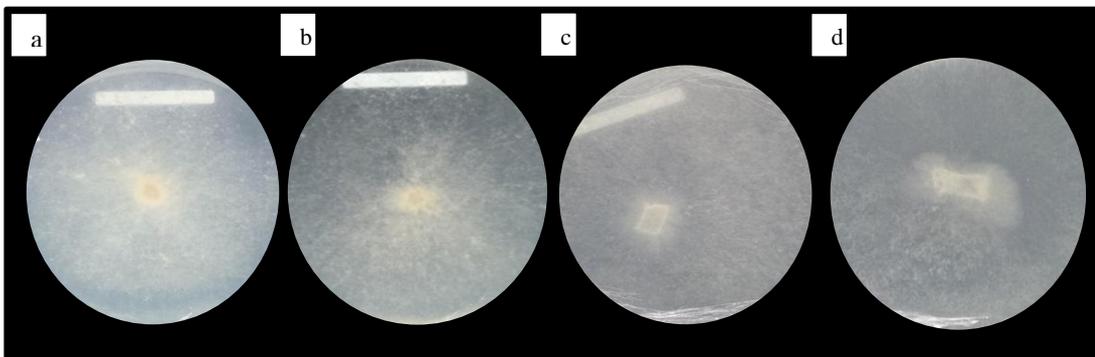
4.1.2 Karakter Morfologi *Phytophthora palmivora*

Sebanyak 21 isolat *P. palmivora* telah berhasil diisolasi dari lokasi perkebunan kakao di Kabupaten Bone, Bulukumba dan Pinrang (Sulawesi Selatan). Semua isolat yang diperoleh mencirikan *P. palmivora* dengan bentuk koloni yang sangat bervariasi, berbentuk bulat dengan pinggiran rata maupun tidak rata serta hifa berwarna putih. Sifat-sifat morfologi lain seperti bentuk dan ukuran sporangium, papila, pedikel, tipe koloni, klamidospora, akan diuraikan di bawah ini.

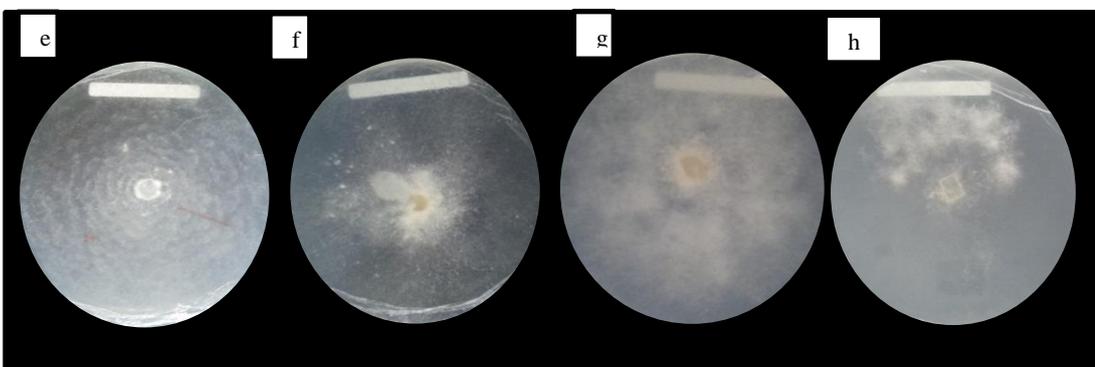
4.1.2.1 Koloni

Bentuk Koloni *P. palmivora* yang diamati sangat bervariasi, berbentuk bulat dengan pinggiran merata maupun yang tidak merata, mulai dari halus tidak berpola hingga yang tebal dan membentuk pola seperti bintang, serta hifa berwarna putih dan miselium yang tumbuh seperti kapas. Tipe koloni dari 21 isolat *P. palmivora* dikategorikan dalam tiga kelompok yaitu, tipe *stellate*, *rossaceous*, dan *cottony*.

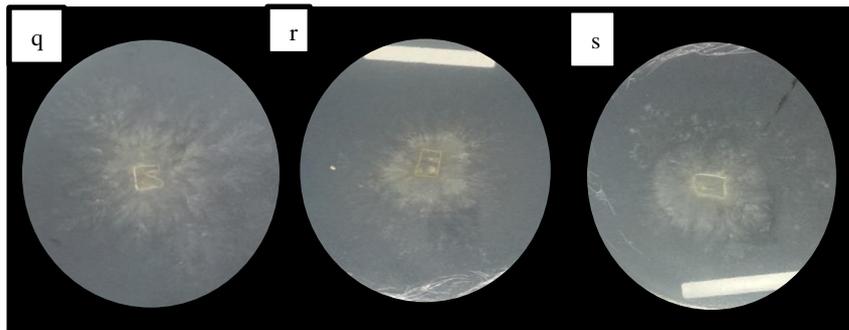
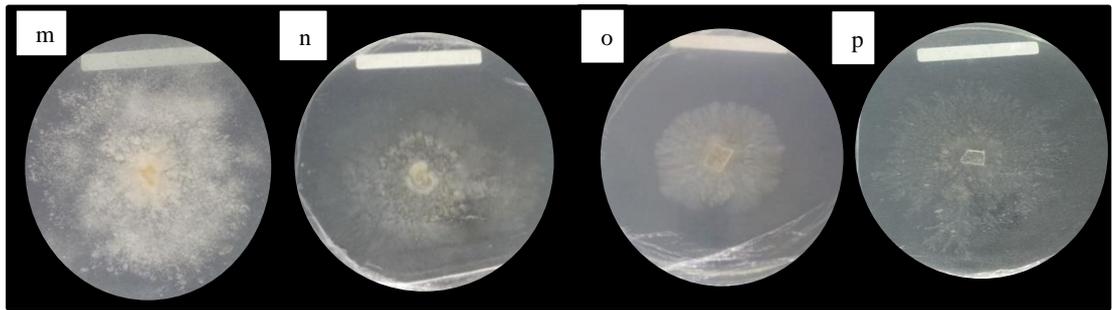
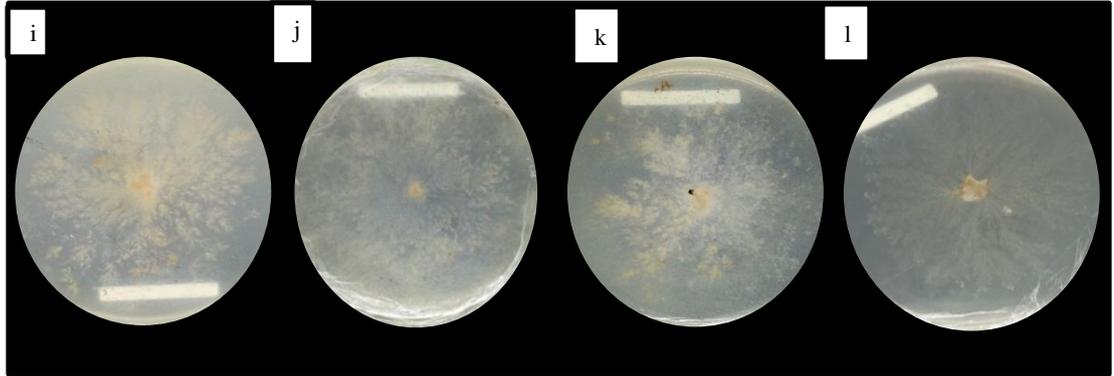
A. Tipe Rossaceous

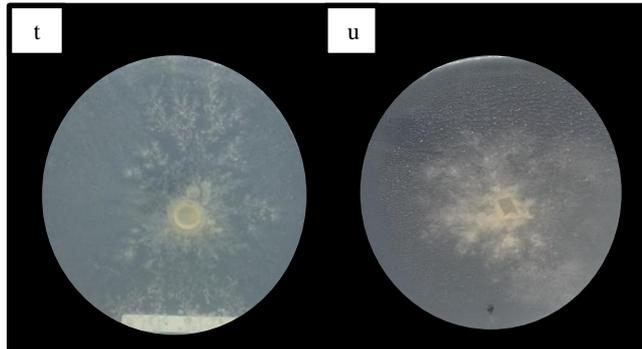


B. Tipe cottony.



C. Tipe *stelate*



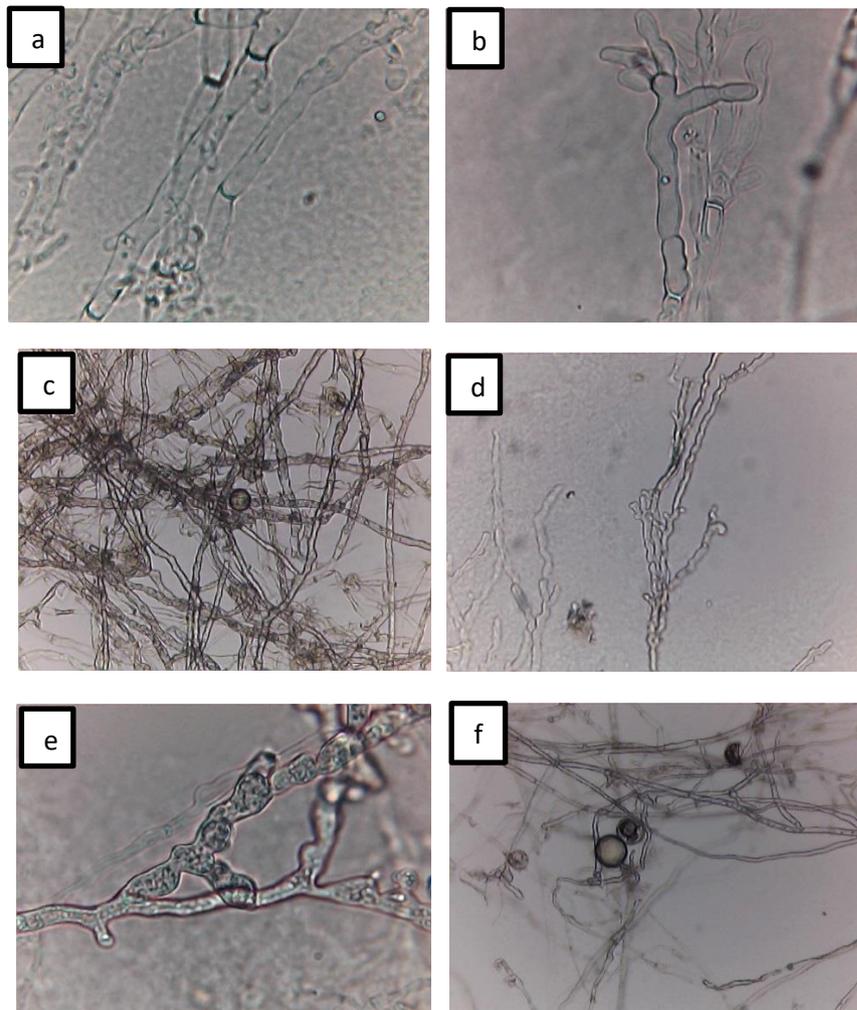


Gambar 5 Tipe Koloni *P. palmivora* : *Rosaceous* (a-d) BnL3P1, BnL2P6, BnL2P8, BnL2P9, Tipe *Cottony* (e-h) BnL2P5, BnL2P2, BnL3P2, PrL2P8. Tipe *Stelate* (i-u) BnL2P3, BnL3P3, BnL1P7, BnL3P7, BkL1P9, BkL2P2, BkL2P3, BkL2P6, BkL2P7, BkL2P9, PrL2P6, PrL2P7, PrL2P8.

Isolat *P. palmivora* yang tergolong tipe *rosaceous* BnL3P1, BnL2P6, BnL2P8, BnL2P9, tipe *cottony* adalah isolat BnL2P5, BnL2P2, BnL3P2, PrL2P8. dan tipe *stelate* adalah isolat BnL2P3, BnL3P3, BnL1P7, BnL3P7, BkL1P9, BkL2P2, BkL2P3, BkL2P6, BkL2P7, BkL2P9, PrL2P6, PrL2P7, PrL2P8 (Gambar 5). Karakter tipe koloni tidak dapat membedakan asal isolat *P. palmivora*. Isolat *P. palmivora* mempunyai tiga tipe koloni yaitu tipe *stelate* (13 isolat) dan *rosaceous* (4 isolat), dan *cottony* (4 isolat).

4.1.2.2 Hifa

Dari berbagai isolat menunjukkan berbagai macam tipe pembengkakan hifa (hyphal swellings). Hyphal swellings yang mengandung banyak inti dan tidak bersepta (senositik) pada *phytophthora* spp., umumnya berbentuk torulose, coralloid, smooth, coarse, irregular dan loops.



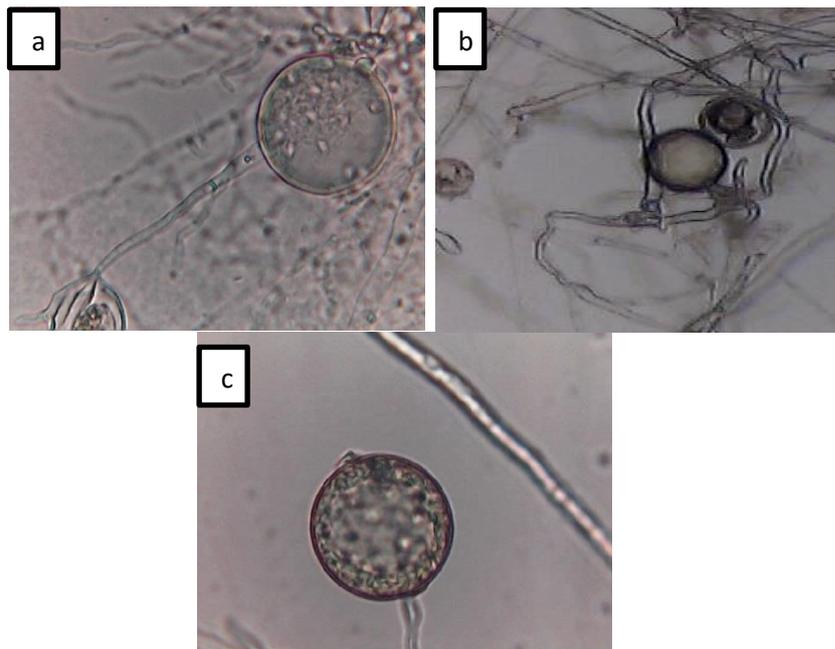
Gambar 6 Karakter morfologi bentuk pembengkakan hifa (hyphal swelling) isolat *P.palmivora* secara mikroskopis : (a-b) Bentuk loops, (c-e) coralloid dan (f) Bentuk irregular.

Pada pembentukan hyphal swellings biasanya inti membentuk titik cabang yang kemudian dilanjutkan dengan pembengkakan globular (bulat) membentuk dinding tebal yang disebut klamidospora.

4.1.2.3 Klamidospora

Klamidospora ke 21 isolat *P. palmivora* berbentuk *globose* dan *subglobose*, Klamidospora merupakan salah satu bentuk spora istirahat yang dimiliki oleh *Phytophthora* spp., ketika tidak adanya inokulum yang tersedia yang dapat tumbuh pada media biakkan.

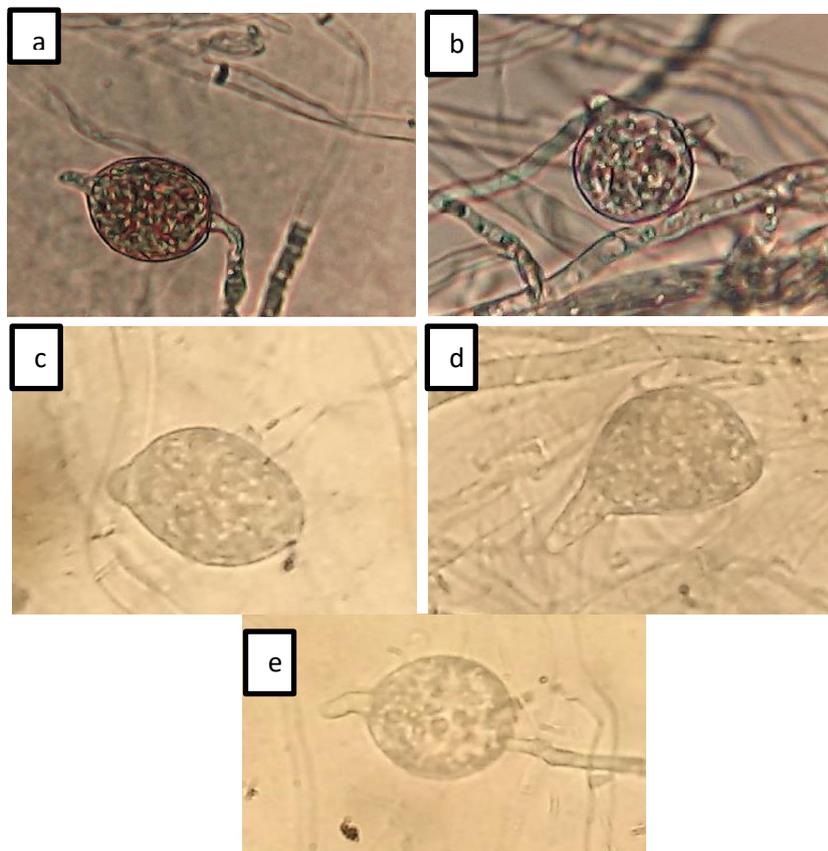
Klamidospora dapat tumbuh berada diantara hifa ((klamidospora intercalary (Ci)), diujung hifa ((terminal klamidospora (TC)) dan disamping hifa (klamidospora lateral intercalary(Cli)). (Gambar 7).



Gambar 7 karakter morfologi klamidospora *P.palmivora* secara mikroskopis (a) klamidospora intercalary (Ci), (b) klamidospora lateral intercalary (Cli), (c) terminal klamidospora (TC)

4.1.2.4 Sporangium

Hasil pengamatan terhadap sporangium dari ke-21 isolat *P. palmivora* hasil koleksi mempunyai bentuk sporangium yang berbeda yaitu: *globose*, *obturinate*, *ovoid*, *elipsoid*, dan *limoniform* (Gambar 8). Semua isolat *P. palmivora* mempunyai sporangium yang memiliki papila, pedikel yang berukuran panjang dan bersifat mudah lepas dari tangkai sporangium dengan model percabangan compound sympodia (CS), umbellate symposium (US) simpel simpodium (SS). Hasil pengamatan sporangium selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 2.



Gambar 8 karakter morfologi sporangium *P.palmivora* secara mikroskopis (a) limoniform, (b) ovoid, (c) obturbinate (d) elipsoid, (e) globose

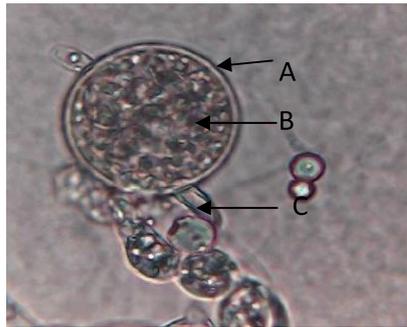
Untuk mendapatkan sporangium dan zoospora, maka koloni *P.palmivora* terlebih dahulu direndam dengan ekstrak air steril selama 6-8 jam. Waktu yang dibutuhkan untuk menghasilkan sporangium dari setiap isolat bervariasi dari 4-10 hari. Ada tiga bentuk papila yang diperoleh yaitu non-papila, semi-papila dan papila (Gambar 9).



Gambar 9 karakter morfologi papilla sporangium *P.palmivora* secara mikroskopis (a) non-papila, (b) semi-papila dan (c) papilla

Bentuk zoospora yang dihasilkan menunjukkan morfologi yang berbeda, zoospora tersebut keluar dari sporangium dengan cara berenang dengan flagelnya dan ketika mendapatkan media yang sesuai maka zoospora akan siap untuk berkecambah.

P.palmivora merupakan jenis cendawan heterotalik yang memiliki dua jenis tipe kawin yaitu A1 dan A2 yang dapat memproduksi gamet (oogonia dan anteridia) membentuk oospore dan oogonium dengan anteridium amphiginous dan anteridium paragynous. Karakteristik morfologi secara mikroskopis akan diuraikan pada gambar dan tabel berikut.



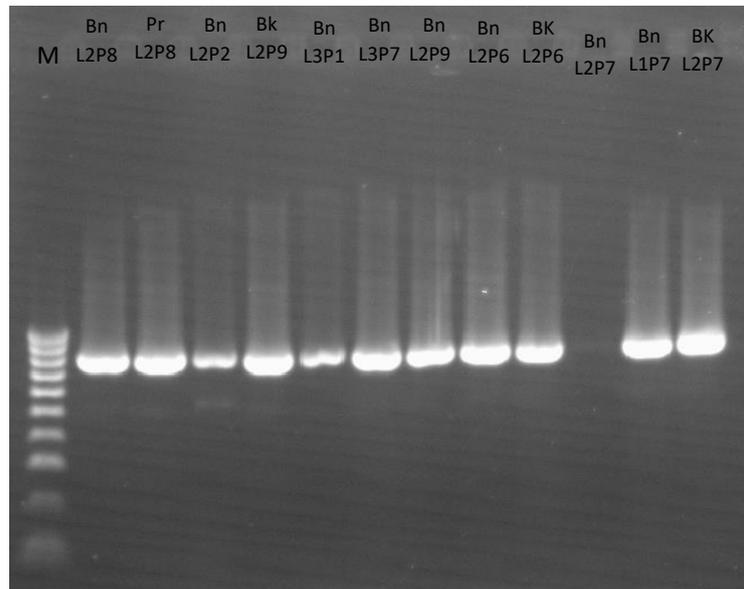
Gambar 10 Oogonium (A) *globose*, (B) oospora dan (C) anteridium *amphigynous* dari *P. palmivora*

Dari tabel diatas maka dapat dilihat perbedaan masing-masing isolat dari bentuk hyphal swelling terdapat empat tipe (torulose, loops, irregular dan coralloid) masing-masing isolate berbeda tipe hyphal swelling yaitu 6 ioslat tipe torulose, 8 isolat tipe loops, 3 isolat tipe irregular dan 4 isolat tipe coralloid. Bentuk sporangium terbagi atas lima yaitu ovoid, obturbinate, globose, ellipsoid dan limoniform dengan bentuk papilla yang bervariasi yaitu ada yang berbentuk non papilla atau yang tidak memiliki papilla, semi papilla dan yang memiliki papilla yang lonjong atau jelas ,dimana pada semua isolat tampak jelas pedikel panjang dengan tipe percabangan coumpound simpodia, umbelatte simpodia namun yang paling banyak yaitu simpel simpodia.

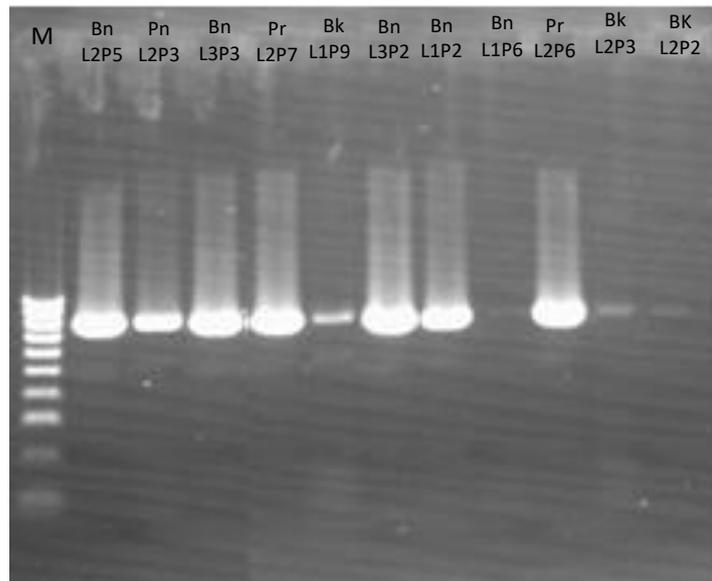
Bentuk klamidospora dari semua isolat yang ditemukan yaitu dari Kabupaten Bone tampak klamidospora yang melimpah dengan bentuk terminal klamidospora, klamidospora berada pada samping tengah. Isolat dari kabupaten Bulukumba mempunyai kemiripan dengan isolat Bone yang memiliki jumlah klamidospora melimpah. Sedangkan pada isolat dari kabupaten Pinrang memiliki jumlah klamidospora yang sedikit serta bentuk terminal klamidospora yang berbeda dalam pengamatan ini yaitu pada isolat PrL2P6 dengan bentuk klamidospora lateral intercalary serta Fase seksual yang ditemukan pada isolat secara umum tampak Oospora dengan oogonia berbentuk spherical dengan antheridium amphyginous.

4.1.3 Identifikasi Molekuler

Terdapat 21 isolat *P. palmivora* berhasil diekstraksi DNANYa, ke-21 isolat tersebut di amplifikasi ruas DNA dengan teknik PCR menggunakan primer spesifik I2reverse dan A2forward. Hasil amplifikasi DNA ke-21 isolat *P. palmivora* tersebut menghasilkan satu pita DNA dengan ukuran 900 bp (Gambar 11-12). Pita DNA dengan ukuran 900 bp merupakan spesies *P. palmivora* (Umayu 2004). Pita DNA dari 21 isolat *P. palmivora* tersebut dengan ukuran 900 bp selanjutnya dinalisis filogenik dengan tehknik repetitive.



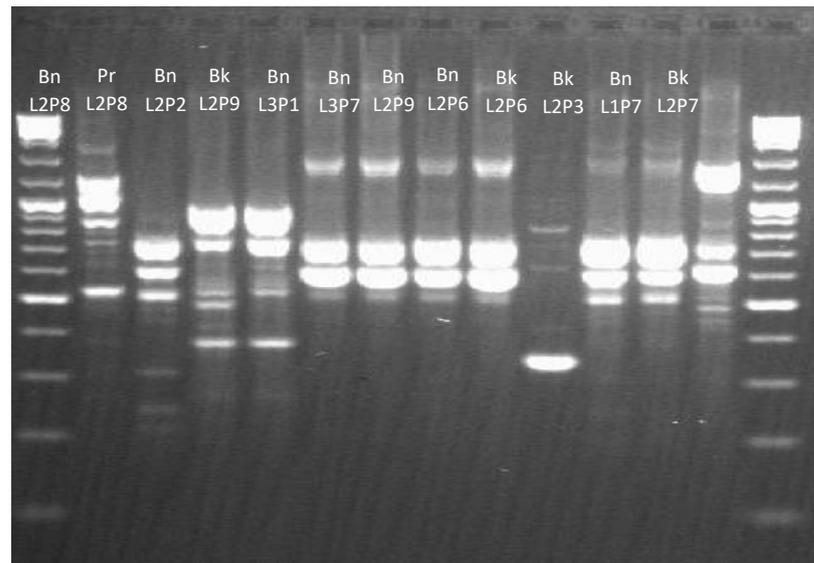
Gambar 11 Hasil amplifikasi ruas ITS-DNA 12 isolat *P. palmivora* menggunakan sepasang primer I2reverse dan A2forward menunjukkan pita hasil amplifikasi pada 900bp



Gambar 12 Hasil amplifikasi ruas ITS-DNA 11 isolat *P. palmivora* menggunakan sepasang primer 12reverse dan A2forward menunjukkan pita hasil amplifikasi pada 900bp

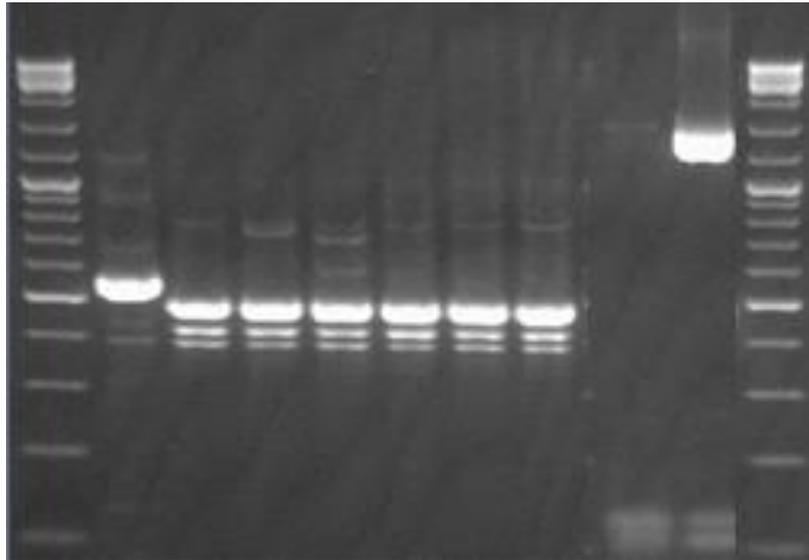
Terdapat 2 isolat yang tidak teramplifikasi pitanya hal ini disebabkan karena isolat tersebut terkontaminasi dengan cendawan yang lain diluar dari *P. palmivora* yaitu isolat BnL1P6 dan BnL2P7. Adapun pada isolat BkL2P3 dan BkL2P2 pita yang teramplifikasi terlihat tipis, hal ini kemungkinan DNA template yang diambil pada waktu akan diPCR jumlahnya sedikit.

Selanjutnya ke 21 isolat tersebut di uji lanjut dengan tehnik Repetitive menggunakan primer BOX A1R, hasil yang didapatkan dari pengamatan tersebut yaitu menunjukkan semua DNA isolat *P. palmivora* dapat diamplifikasi. Jumlah pita DNA hasil amplifikasi per primer berkisar antara 4-7 pita. Pita DNA hasil amplifikasi yang diperoleh berukuran 250-1500 pasang basa (Gambar 13-14).



Gambar 13 Pola pita DNA isolat *P. palmivora* hasil amplifikasi menggunakan primer BOX A1R. (M) Marker, (1-12) isolat *P. palmivora*

Berdasarkan gambar diatas kita dapat melihat enam isolat yang memiliki pola pita yang sama teramplifikasi pada 500bp,600bp dan teramplifikasi kembali pada 700bp yaitu isolat BnL3P1, BnL3 P7, BnL2P9, BnL2P6, BkL2P3 dan BnL1P7 kesemuanya berasal dari Bone kecuali BkL2P3. Tetapi tidak semua isolat yang berasal dari Bone teramplifikasi pada pola pita yang sama seperti halnya isolat BnL2P8, Bahkan ada isolat Bone yang memiliki pola pita yang sama dengan Bulukumba yaitu BnL2P2 dan BkL2P9. Adapun pada isolat Pinrang PrL2P8 memiliki pola pita yang berbeda dari isolat yang lain sama halnya dengan isolat asal Bulukumba BkL2P7 yang teramplifikasi pada 300bp,600bp dan kembali teramplifikasi pada 800bp.

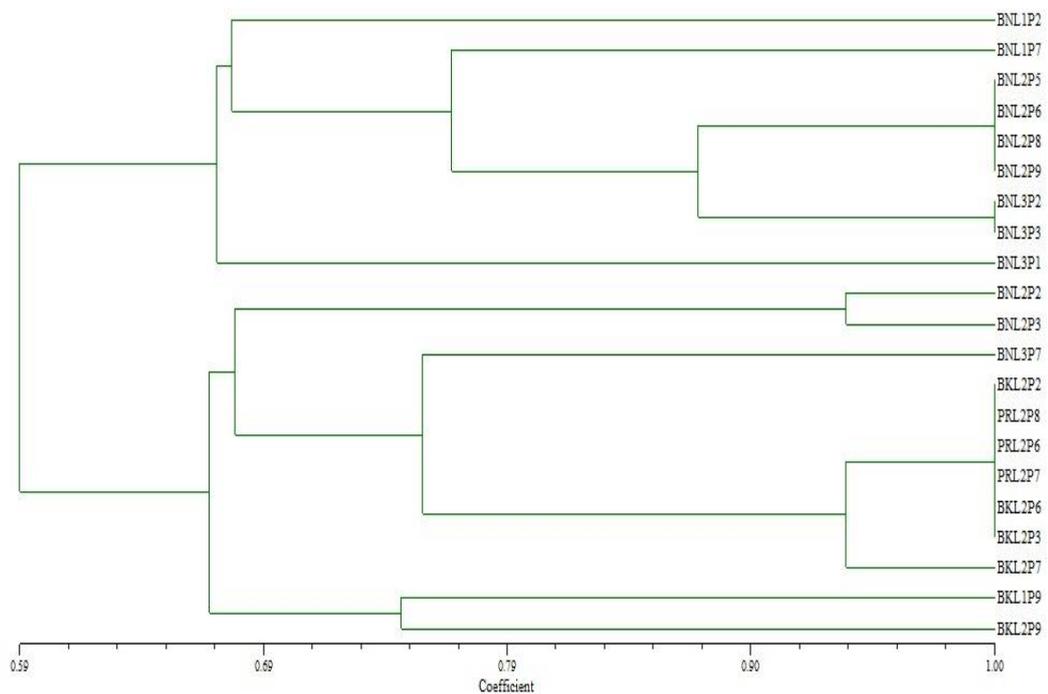


Gambar 14 Pola pita DNA isolat *P. palmivora* hasil amplifikasi menggunakan primer BOX A1R. (M) Marker, (13-21) isolat *P. palmivora*

Pada gambar 14 terlihat enam Isolat yang memiliki pola pita monomorf yang sama berkisar antara 400-500bp yaitu BnL2P3, BnL3P3, PrL2P6, PrL2P7, BkL1P9 dan BnL3P2. Sedangkan untuk isolat BnL2P5 tidak memiliki kesamaan pola pita dengan isolat yang lain yaitu 600bp, sama halnya dengan isolat BnL1P2 dan isolat BkL2P2 teramplifikasi pada 100bp dan terampifikasi kembali pada 1200bp yaitu berbeda dengan isolat yang lain.

4.1.3.1 Analisis filogenetik isolat *P. palmivora*

Hasil pengelompokan berdasarkan pada penanda Repetitive menggunakan primer BOX A1R memperlihatkan bahwa antar isolat *P. palmivora* mempunyai kemiripan genetik yang rendah ditunjukkan dengan mengelompoknya seluruh isolat *P. palmivora* pada tingkat kemiripan genetik 67%.



Gambar 29 Dendrogram ke 21 isolat *P. palmivora* berdasarkan repetitive sequence

Jika dilihat dari lokasi pengambilan sampel, maka isolat yang berasal dari lokasi yang sama atau berdekatan tidak selalu menunjukkan hubungan kekerabatan yang dekat sebaliknya isolat yang berasal dari lokasi yang berjauhan tidak selalu menunjukkan hubungan kekerabatan yang jauh. Isolat asal kakao BnL3P7 dari Bone mempunyai kemiripan genetik 68% dengan isolat kakao asal Bulukumba dan Pinrang yaitu BkL2P2, PrL2P8, PrL2P6. Begitupun dengan isolat PrL2P7 asal Pinrang dan isolat BkL2P6, BkL2P3 asal Bulukumba mempunyai tingkat kemiripan genetik 94%. Pengelompokan ini memperlihatkan bahwa isolat *P. palmivora* di lapangan sudah sangat beragam.

4.1.4 Virulensi *P.palmivora*

Untuk mengetahui virulensi dari isolat-isolat *P. palmivora* dilakukan pengamatan terhadap periode laten, dan laju perkembangan penyakit melalui luas bercak pada buah yang muncul akibat inokulasi *P. palmivora* pada buah kakao (Tabel 3). Periode laten ke 21 isolat *P. palmivora* berkisar antara 2-7 hari. Periode laten tercepat pada isolat BN L1 P2, BN L3 P2, BN L3 P7, BK L2 P6 yaitu 2 hari.

Tabel 3 Tingkat virulensi 21 isolat *P. palmivora* Tanaman kakao

Isolat	Periode laten (Hsi)	Rata-Rata Pertambahan Luas Bercak (cm ² /hari)	Keparahan Penyakit (%)	Tingkat virulensi isolat
BN L1 P2	2	56.14	86.67	Virulen tinggi
BN L1 P7	3	56.33	80	Virulen tinggi
BN L2 P2	3	33.37	66.67	Virulen tinggi
BN L2 P3	3	34.41	66.67	Virulen tinggi
BN L2 P5	>5	73.20	30	Virulen sedang
BN L2 P6	3	39.69	66.67	Virulen tinggi
BN L2 P8	4	71.21	80	Virulen tinggi
BN L2 P9	3	26.18	40	Virulen tinggi
BN L3 P1	3	45.11	66.67	Virulen tinggi
BN L3 P2	2	42.81	86.67	Virulen tinggi
BN L3 P3	>4	40.52	66.67	Virulen tinggi
BN L3 P7	2	24.82	60	Virulen tinggi
BK L1 P9	3	18.90	46.67	Virulen tinggi
BK L2 P2	>5	35.52	30	Virulen sedang
BK L2 P3	>5	29.41	30	Virulen sedang
BK L2 P6	2	44.26	66.67	Virulen tinggi
BK L2 P7	>5	69.32	30	Virulen sedang
BK L2 P9	3	25.03	40	Virulen tinggi
PR L2 P6	3	46.01	86.67	Virulen tinggi
PR L2 P7	3	49.59	60	Virulen tinggi
PR L2 P8	>4	34.06	60	Virulen tinggi

Hasil pengamatan laju infeksi dengan mengukur pertambahan luas bercak infeksi *p.palmivora* selama tujuh hari, terlihat bahwa rata-rata pertambahan luas bercak terkecil ada pada isolat BkL1P9 asal

Bulukumba yaitu sebesar 18,90 cm²/hari sedangkan rata-rata pertambahan luas bercak terbesar ada pada isolat BnL2P5 asal Bone sebesar 73,20 cm²/hari. Untuk Keparahan Penyakit isolat yang tertinggi adalah BN L1P2, BN L3 P2, BK L2 P7, PR L2 P6 yaitu 86,67%. Terlihat pula bahwa tingkat virulensi sebagian besar isolat *P.palmivora* tergolong virulen tinggi dan empat isolat yang tingkat virulensinya sedang yaitu BN L2 P5, BK L2 P2, BK L2 P3 dan BK L2 P7.

Tabel 4 Pertambahan Luas Bercak kakao

Isolat	Hari Setelah Inokulasi (Hsi)				
	3	4	5	6	7
BN L1 P2	8,55 ^{abcd}	33,75 ^{abc}	80,73 ^{ab}	139,81 ^{bcdef}	139,81 ^{bcdef}
BN L1 P7	19,56 ^d	39,96 ^{bc}	74,44 ^{ab}	149,46 ^{cdef}	149,46 ^{cdef}
BN L2 P2	6,85 ^{abcd}	29,99 ^{abc}	64,52 ^{ab}	94,29 ^{abcdef}	94,29 ^{abcdef}
BN L2 P3	11,09 ^{abcd}	32,51 ^{abc}	57,78 ^{ab}	120,21 ^{abcdef}	120,22 ^{abcdef}
BN L2 P5	5,002 ^{abc}	17,75 ^{abc}	60,90 ^{ab}	179,34 ^{def}	179,35 ^{def}
BN L2 P6	8,93 ^{abcd}	31,87 ^{abc}	62,07 ^{ab}	88,56 ^{abcde}	88,56 ^{abcde}
BN L2 P8	16,35 ^{cd}	44,38 ^c	74,12 ^{ab}	120,21 ^{abcdef}	178,23 ^{cdef}
BN L2 P9	0,71 ^a	6,63 ^a	29,84 ^{ab}	44,93 ^a	44,93 ^a
BN L3 P1	10,61 ^{abcd}	29,54 ^{abc}	61,81 ^{ab}	113,41 ^{abcdef}	113,41 ^{abcdef}
BN L3 P2	15,71 ^{bcd}	40,72 ^{bc}	71,48 ^{ab}	132,30 ^{bcdef}	132,31 ^{bcdef}
BN L3 P3	0,12 ^a	11,40 ^{abc}	31,37 ^{ab}	55,45 ^{ab}	55,45 ^{ab}
BN L3 P7	5,23 ^{abcd}	34,13 ^{abc}	56,13 ^{ab}	82,25 ^{abc}	82,25 ^{abc}
BK L1 P9	2,68 ^{abc}	17,76 ^{abc}	35,58 ^{ab}	80,66 ^{abc}	80,66 ^{abc}
BK L2 P2	2,40 ^{ab}	17,39 ^{abc}	32,77 ^{ab}	93,30 ^{abcdef}	93,30 ^{abcdef}
BK L2 P3	3,39 ^{abc}	14,48 ^{abc}	33,72 ^{ab}	118,15 ^{abcdef}	118,15 ^{abcdef}
BK L2 P6	6,14 ^{abcd}	10,47 ^{ab}	54,58 ^{ab}	99,11 ^{abcdef}	99,11 ^{abcdef}
BK L2 P7	14,75 ^{bcd}	19,29 ^{abc}	81,85 ^{ab}	190,73 ^f	190,73 ^f
BK L2 P9	0,38 ^a	34,71 ^{abc}	25,92 ^a	86,17 ^{abcd}	86,17 ^{bcd}
PR L2 P6	0,48 ^a	41,90 ^{bc}	85,12 ^b	147,87 ^{cdef}	147,87 ^{cdef}
PR L2 P7	6,58 ^{abcd}	27,11 ^{abc}	64,99 ^{ab}	182,78 ^{ef}	182,78 ^{ef}
PR L2 P8	10,43 ^{abcd}	31,23 ^{abc}	56,32 ^{ab}	99,08 ^{abcdef}	99,08 ^{abcdef}

Keterangan : *Angka yang diikuti oleh huruf yang sama berarti tidak berbeda nyata pada taraf 5% menurut uji DMRT

Berdasarkan hasil uji DMRT 5% pada hari ketiga didapatkan bahwa isolat yang sangat virulen adalah BNL1P7, isolat tersebut tidak berbeda nyata dengan isolat Bn L3 P7, Bk L2 P6 Pr L2 P7, Bn L2 P2, Bn L1 P2, Bn L2 P6, Pr L2 P8, BnL3P1, BnL2 P3, BkL2P7, BnL3P2, BnL2P8. Tetapi berbeda nyata dengan isolat BnL3P3, BkL2P9, PrL2P6, BnL2P9, BkL2P2, BkL1P9, BkL2P3 dan BnL2P5.

Pada hari ke empat hasil uji DMRT 5% menunjukkan bahwa isolat BnL2P8 berbeda nyata dengan isolat BnL2P9 dan BkL2P9 tetapi tidak berbeda nyata dengan isolat lainnya, begitupun pada hari ke lima isolat PrL2P6 berbeda nyata dengan isolat BkL2P9 tetapi tidak berbeda nyata dengan isolat lainnya. Sedangkan pada hari ke enam isolat BkL2P7 berbeda nyata dengan isolat Bn L2P9, Bn L3 P3, Bk L1 P9, Bn L3 P7, Bk L2 P9, Bn L2 P6 tetapi tidak berbeda nyata dengan isolat lainnya. Pada hari ke tujuh menunjukkan bahwa isolat BkL2P7 berbeda nyata dengan isolat BnL2P9, BnL3P3, BkL1P9, BnL3P7, BkL2P9, BnL2P6 tetapi tidak berbeda nyata dengan isolat BkL2P2, BnL2P2, PrL P8, BkL2P6, BnL3P1, BkL2P3, BnL2P3, BnL3P2, BnL1P2, PrL2P6, BnL1P7, BnL2P8, BnL2P5 Dan PrL2P7.

4.2 Pembahasan

Sebanyak 21 isolat *Phytophthora palmivora* berhasil diisolasi dari buah sakit dari pertanaman kakao di Sulawesi Selatan, yaitu 14 isolat asal Bone (2 isolat Desa Itterung, 6 isolat Desa Ajjalireng dan 4 isolat Desa Patangnga), 6 isolat *P. palmivora* asal Bulukumba (5 isolat Desa karossil dan 1 isolat Desa Tanah Harapan) serta 3 isolat asal Pinrang Desa Padelo.

Berdasarkan aspek morfologi 21 isolat *P. palmivora* menunjukkan karakter yang sangat beragam, bahkan dalam satu kabupaten yang sama memiliki koloni yang berbeda yaitu 5 isolat asal Bone (BnL1P7, BnL2P3, BnL2P5, BnL2P9, dan BnL3P2), 1 isolat BkL2P2 asal Bulukumba dan 1 isolat PrL2P7 asal pinrang. Tetapi dalam penelitian ini Secara umum bentuk koloni yang banyak didapatkan yaitu bentuk stellate, Adapun yang memiliki tipe koloni rossaceous hanya terdapat pada isolat asal 2 Pinrang yaitu PrL2P6 dan PrL2P8. Menurut Appiah *et al.* (1999) bentuk koloni dapat digunakan untuk membedakan spesies *Phytophthora* yaitu, bentuk koloni *P. megakarya* adalah cottony, *P. palmivora* stellate, dan *P. capsici* rossaceous. Waterhouse *et al.*, (1983). Jika dilihat dari bentuk koloni saja maka isolat *P. palmivora* tidak dapat dibedakan.

Selain itu perbedaan koloni yang tumbuh pada media bisa juga disebabkan karena penggunaan media selektif V8, hal ini dikemukakan oleh Scoot *et al*, (2009) bahwa penggunaan media yang berbeda untuk isolasi spesies *Phytophthora* menunjukkan morfologi pertumbuhan yang beragam.

Dari berbagai isolat menunjukkan berbagai macam tipe pembengkakan hifa (hyphal swellings). Secara mikroskopis dari setiap isolat menunjukkan 4 macam tipe pembengkakan hifa coralloid Torulose irregular dan loops. Dalam penelitian ini didapatkan 4 isolat berbentuk coralloid, 6 isolat berbentuk torulose, 3 irregular dan 8 berbentuk loops. Hyphal swellings yang mengandung banyak inti dan tidak bersepta. Hal ini sesuai dengan pendapat Drenth & Sendal (2001) yang menyatakan bahwa bentuk hyphal swelling dari *P. palmivora* sama dengan beberapa spesies phytophthora lainnya yaitu bentuk terulose, coralloid serta berbentuk loops.

Pengamatan bentuk sporangium ke-21 isolat *P. palmivora* sangat beragam, tapi umumnya berbentuk *elipsoid*, liminiform, obturbinat, globose dan *ovoid*. Dalam penelitian ini ditemukan 11 isolat yang memiliki sporangium berbentuk *ovoid*, 5 isolat yang memiliki sporangium bentuk liminiform, 7 isolat memiliki sporangium berbentuk obturbinat, globose dan elipsoid 2 isolat. Berdasarkan ukuran panjang dan lebar sporangium diketahui juga sangat bervariasi antar isolat *P. palmivora*, begitupun dengan bentuk papila sangat bervariasi, adapun

pada umumnya bahwa bentuk sporangium yang paling umum ditemukan adalah bentuk ovoid dengan bentuk papila yang menonjol memiliki bentuk pedikel yang panjang dengan tipe percabangan yang berbeda-beda. Selain itu, Produksi zoospora yang banyak dihasilkan pada setiap isolat yang bergerak aktif setelah keluar dari sporangium. Hal ini sesuai pendapat dengan Holliday (1980) yang menyatakan Satu sporangium mengandung 10-40 zoospora yang berflagela dan akan dilepaskan apabila diinkubasikan dalam air. Kemudian zoospora akan melepaskan flagela yang berubah menjadi kista dan berkecambah membentuk tabung kecambah. Drenth (2001) juga menyatakan bahwa sporangium *P.palmivora* berbentuk ovoid dengan papila yang menonjol menghasilkan zoospora (spora renang) yang memiliki flagella kemudian berenang mencari tempat untuk melanjutkan proses perkecambahan.

Dari 21 isolat *P. palmivora* tersebut terdapat 8 isolat yang tidak dapat membentuk oospora. Thorold (1974) melaporkan bahwa terdapat isolat *P. palmivora* yang diisolasi dari spora tunggal tidak menghasilkan oospora ketika dipasangkan. Sedangkan isolat *P. palmivora* yang bukan berasal dari spora tunggal dapat menghasilkan oospora. Kemungkinan hal yang sama terjadi pada isolat *P.palmivora* tersebut sehingga tidak menghasilkan oospora. Oospora yang merupakan spora seksual yang diidentifikasi dalam penelitian ini memiliki bentuk oogonia yang sama yaitu spherical

dengan anteridium amphigynous, dimana pertumbuhan oogonia terlihat mengapit pada bagian basal oogonium. *P.palmivora* merupakan jenis heterotalik yang memiliki dua tipe kawin yaitu A1 dan A2 Keberadaan kedua tipe kawin tersebut diyakini menjadi sumber keragaman dari spesies tersebut dan dapat menjadi indikasi adanya spesies baru.

Selama ini diketahui bahwa isolat *P. palmivora* asal kakao hanya memiliki tipe kawin A2 (Warokka & Thevenin 1992). Adanya tipe kawin A1 dan A2 pada spesies *P. palmivora* asal kakao yang bersifat heterotalik dapat menimbulkan tingkat heterosigositas tinggi dalam populasi. Jadi dengan ditemukannya tipe kawin A1 pada isolat *P. palmivora* asal kakao dapat menimbulkan kekuatiran akan adanya progeni baru yang lebih virulen sehingga menimbulkan epidemik penyakit busuk buah kakao.

Berdasarkan karakter morfologi terlihat bahwa isolat *P. palmivora* mempunyai variasi yang tinggi, Variasi dalam tingkat isolat *P.palmivora* dapat terjadi secara asexual. Produksi zoospora yang bervariasi dalam satu isolat *P. palmivora* dapat terjadi karena heterokariosis dan rekombinasi paraseksual dapat terjadi pada genus *Phytophthora*. Beberapa variasi fenotipik yang terjadi juga dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti medium pertumbuhan dan suhu pada saat melakukan pemeliharaan isolat di laboratorium. Oleh karena variasi yang tinggi di dalam populasi sehingga kadang sulit untuk mengidentifikasi spesies. Dengan demikian untuk membedakan

isolat *P. palmivora* sangat sulit jika hanya berdasarkan karakter morfologi. Secara umum isolat *P. palmivora* akan sulit dibedakan ketika hanya berdasarkan karakter morfologi Untuk itu diperlukan cara lain agar dapat mengetahui isolat tersebut.

Identifikasi secara molekuler sangat diperlukan untuk dapat melengkapi data-data yang dapat membedakan tiap isolat. Untuk mengetahui karakter molekuler isolat *P. palmivora* dapat digunakan analisis amplifikasi DNA dengan teknik PCR. Sebanyak 21 isolat berhasil teramplifikasi pola pitanya dengan primer universal I2 reverse dan A2 forward dan menghasilkan pita DNA dengan ukuran 900 bp. Penelitian molekuler *Phytophthora* spp pada kakao dengan menggunakan primer universal menghasilkan pita DNA tunggal dengan ukuran 900 bp (Darmono dan Purwantara 2001). Pita berukuran ini sesuai dengan hasil yang didapatkan oleh Umayu (2004), Darmono *et al.* (2006) yang menggunakan primer yang sama untuk *P. palmivora* yang diisolasi dari kakao.

Hasil analisis keragaman genetik dengan menggunakan primer BOX A1R, menunjukkan bahwa 21 isolat *P. palmivora* memiliki pola pita yang beragam. Hal tersebut juga terlihat pada hasil pengelompokan dendogram. Berdasarkan hasil pengelompokan isolat *p.palmivora* terbagi kedalam delapan cluster, cluster tersebut memperlihatkan bahwa isolat yang berasal dari lokasi yang sama tidak selalu berada dalam satu cluster yang sama pula, pun sebaliknya isolat yang berasal dari lokasi yang

berbeda ada pada satu cluster yang sama. Hal ini membuktikan bahwa jarak yang dekat tidak mempengaruhi tingkat kekerabatan suatu isolat. Menurut Hiasinta (2007) bahwa isolat yang berasal dari lokasi yang sama atau berdekatan tidak selalu menunjukkan hubungan kekerabatan yang dekat sebaliknya isolat yang berasal dari lokasi yang berjauhan tidak selalu menunjukkan hubungan kekerabatan yang jauh.

Berdasarkan analisis filogenetik diketahui kemiripan genetik populasi isolat asal kakao 67%. Hasil ini sangat berbeda dengan yang didapatkan oleh Umayu (2004), bahwa kemiripan genetik *P. palmivora* asal kakao adalah 83%. Perbedaan ini dapat terjadi kemungkinan disebabkan karena sampel isolat *P. palmivora* dan primer acak RAPD yang digunakan tidak sama dengan yang digunakan dalam penelitian ini.

Secara umum hasil uji virulensi dari isolat *P. palmivora* menunjukkan isolat *P. palmivora* memiliki virulen tinggi terhadap kakao. Dari 21 isolat yang diuji terdapat 4 isolat yang tingkat virulensinya sedang yaitu BnL2P5, BkL2P2, BkL2P3 dan BkL2P7. Menurut Arios (2005) Lingkungan dapat mempengaruhi laju pertumbuhan dan tingkat virulensi patogen, serta penyebarannya oleh angin, air, vektor, dll. (Arios, 2005). Pada kondisi yang menguntungkan atau memiliki kelembaban yang tinggi, sporangia melepaskan zoospora, propagul infeksi (Tamu, 2007).

Hasil pengujian berdasarkan morfologi, molekuler, dan virulensi dari isolat *P. palmivora* menunjukkan adanya keragaman di dalam spesies *P. palmivora*. Keragaman dari isolat *P. palmivora* yang tinggi membuktikan telah terjadi perubahan mutasi pada populasi *P. palmivora*. Laju perubahan mutasi pada isolat *P. palmivora* asal kakao belum diketahui. Menurut Hiasinta 2007 Selain itu fusi antara dua inti yang berbeda dalam miselium (heterokariosis) dapat terjadi pada *P. palmivora* yang dapat menyebabkan perubahan genetik. Terjadinya epidemik penyakit busuk buah kakao juga dipengaruhi oleh adanya aliran gen. *P. palmivora* memiliki propagul asexual dalam bentuk sporangium, zoospora, dan klamidospora. Propagul asexual ini merupakan suatu mata rantai dari gen-gen yang sudah beradaptasi dan terseleksi kebugarannya pada lingkungan pertumbuhan tanaman.

Penanaman tanaman kakao yang tahan terhadap patogen *P. palmivora* yang ditanam dalam areal yang luas serta penggunaan bahan kimiawi untuk pengendalian penyakit busuk buah kakao memicu terjadinya tekanan genetik dalam populasi *P. palmivora*, sehingga menyebabkan perubahan genetik *P. palmivora* dari avirulen menjadi virulen.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa Pola kekerabatan yang terbentuk tidak memperlihatkan adanya hubungan antara keragaman molekuler dengan virulensi masing-masing isolat. Isolat Bone merupakan isolat paling tinggi tingkat virulensi secara konsisten tergabung dalam satu kelompok dengan isolat Bulukumba lebih rendah virulensinya.

Pola potongan pita DNA yang terbentuk juga tidak dapat membedakan antara isolat paling virulen dengan isolat yang lebih rendah virulensinya ataupun antara isolat dengan virulensi yang sama. Potongan pita DNA pada isolat Bone sama dengan isolat Bulukumba yang berlawanan virulensinya. Isolat Pinrang dan Bulukumba mempunyai virulensi yang sama tetapi terdapat pola pita DNA yang berbeda pada masing-masing isolat. Hal tersebut menunjukkan bahwa pola potongan pita DNA yang terbentuk tidak berhubungan dengan virulensi masing-masing isolat. Diduga bahwa, virulensi ditentukan oleh adanya interaksi antar ekspresi.

BAB V

SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Dari hasil penelitian diatas dapat disimpulkan bahwa :

1. Terdapat 21 isolat *Phytophthora palmivora* berhasil diisolasi dari buah sakit dari 3 lokasi pertanaman kakao di Sulawesi Selatan, isolat-isolat tersebut memiliki perbedaan karakter morfologi baik secara makroskopis maupun mikroskopis.
2. Identifikasi Molekuler fragmen DNA isolat *P.palmivora* berukuran sebesar 900 bp. Analisis keragaman genetik dengan menggunakan primer BOX A1R menunjukkan keragaman yang tinggi yaitu 67%. Serta menunjukkan bahwa ke-21 isolat secara morfologi berbeda namun secara molekuler sama yaitu *P.palmivora*.
3. Bahwa pola potongan pita DNA yang terbentuk tidak memperlihatkan adanya hubungan antara lokasi pengambilan sampel keragaman molekuler dengan tingkat virulensi. 4 isolat virulen rendah yaitu BN L2 P5, BK L2 P2, BK L2 P3 dan BK L2 P7 selebihnya memiliki tingkat virulensi yang tinggi.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan uji keragaman genetic dari lokasi yang berbeda serta dengan menggunakan tehnik analisis molekuler yang berbeda pula.

DAFTAR PUSTAKA

- Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Appiah AA, Bridge, 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. Hlm 301-306.
- Appiah AA, Flood J, Bridge PD, Archer SA. 2003. Inter and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolate from cocoa. *Plant Pathology* 52: 168-180.
- Bailey JA, Nash C, Morgan LW, O'Connell RJ, TeBeest DO. 1996. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the *Malvaceae*. *Phytopathology* 86: 1076-1083.
- Brasier, C. M. & M. J. Griffin (1979). Taxonomy of *Phytophthora palmivora* on cocoa. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 72, 111-143.
- Cooke DEL, DM Kennedy, DC Guy, J Russell, SE Unkles, & JM Duncan (1996). Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycol Res* 100, 297-303.
- Darmono TW, Suharyanto & A Darussamin (1997). Development of specific antibody for serological detection of *Phytophthora palmivora* associated with cacao. *In: Proc Indonesian Biotechnol Conf 1997*. Jakarta p. 615-632. Ed. rev. San Diego Academic Press.
- Drenth, A. & B. Sendall (2001). Practical guide to detection and identification of *Phytophthora*. In. CRC for Tropical Plant Protection, Brisbane, Australia.
- Darmono, T.W. & A. Purwantara (2001). Practical work on detection of *Phytophthora*. In Training Course on Early Detection of Woody Plant Diseases With Latent Infection. Biotechnology Research Unit for Estate Crops, Bogor, Indonesia.
- Elliot CG. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. Di dalam Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH (ed) *Phytophthora : Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. St. Paul Minn : American Phytopathological Society. hlm 71-80.

- Erwin DC, Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. St Paul Minnesota, APS Press. Hlm 97-144.
- Förster H, Kinscherf TG, Leong SA, Maxwell DP. 1987. Molecular analysis of the mitochondrial genome of *Phytophthora*. *Current Genetic* 12: 215-218.
- 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.
- Guest, D. (2007). Black pod: Diverse pathogens with a global impact on cocoa yield. *Phytopathology*, 97, 1650-1653.
- Halden HC, Hansen M, Nilsson NO, Hjerdin A. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 93:1185-1192.
- Hall G, Warokka JS. 1992. Species of *Phytophthora* implicated in bud rot and nutfall of coconut in Ivory Coast and Indonesia. *Coconut Phytophthora Workshop Proc.* Manado 26-30 Oktober 1992. Hlm 69-70.
- Hefler V, Powelson MR, Johnson KB. 2002. Oomycetes. The Plant Health Instructor. www.apsnet.org/education/LabExercises/oomycetes/Top.html (22 November 2017).
- Hiasinta (2007). Karakter morfologi dan molekuler isolat *Phytophthora palmivora* Asal kelapa dan kakao. *Jurnal Littri* 13(3), ISSN 0853-8212.
- Holliday P. 1980. *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Cambridge UK : University Press.
- Ilyas J. 2005. Analisis Sekuen Daerah ITS DNA Ribosom (rDNA) dan Desain Primer Untuk Mendeteksi *Phytophthora palmivora* Butl. Pada Kakao, (Tesis). Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. Improvement of Cocoa. hlm 9-18.
- Jackson, G.V.H and Wright, J.G. 2001. Black pod and canker of cacao. PEST ADVISORY LEAFLET NO.7. Plant protection service, secretariat of the pacific community.
- Kellam MK, Zentmyer GA. 1981. Isolation of *Phytophthora citrophthora* from cocoa in Brasil. *Phytopathology* 71:230.

- Konam, J.K. & D.I. Guest (2004). Role of beetles (Coleoptera: Scolytidae and Nitidulidae) in the spread of *Phytophthora palmivora* pod rot of cocoa in Papua New Guinea. *Australian Plant Pathology*, 33, 55-59.
- Kreisel H. 1969. Grunzuge eines naturlischen system der pilze. Di dalam : Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Lee SB, Taylor JW. 1992. Phylogenie of five fungus like prototistan *Phytophthora* species inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Molecular Biology and Evolution* 9: 636-653.
- Massee G. 1899. Cacao disease in Trinidad. *Kew Bull.* Hal. 1-6
- McGregor, A.J. & J.E. Moxon (1985). Potential for biological control of tent building species of ant associated with *Phytophthora palmivora* pod rot of cocoa in Papua New Guinea. *Annal of Applied Biology*, 107, 271-277.
- Mchau GRA, Coffey MD. 1994. Isozyme diversity in *Phytophthora palmivora* : Evidence for Southeast Asia Centre of origin. *Mycol. Res.* 98 : 1269-1299.
- Nurhadina (2016). Keragaman Morfologi dan Analisa Molekuler Isolat *Phytophthora palmivora* dari Tiga Lokasi Pertanaman Kakao di Sulawesi Selatan. Hama dan Penyakit Tanaman, Universitas Hasanuddin.Makassar,
- Opeke LK, Gorenz AM. 1974. *Phytophthora* pod rot ; symptoms and and economic importance Di dalam: Gregory PH, editor. *Phytophthora* disease of cocoa. New York Longman.
- Patterson DJ, Sogin ML. 1992. Eukaryote origins and Protistan diversity. Di dalam Hartman H dan Matsuno K, editor. *The Origin and evolution of the cell.* Word Scientific, Singapore.
- Pringsheim N. 1858. Beitrage zur Morphologie und Systematik der Algen. Di dalam : Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M. 1996. Introductory Mycology 4th Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Pusat Penelitian Kopi dan Kakao. 2004. Panduan Lengkap Budidaya Kakao. Agromedia Pustaka. Pendidikan Perkebunan. Terjemahan dari : De Cocopalms.

- 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.
- Rosmana, A.; E. Sahrani; W. Saharuddin & M. Junaid (2006). Comparison of *Trichoderma* use with synthetic fungicide to control phytophthora pod rot of cocoa. *Fitomedika*, 6: 22-25.
- Rosmana, A.; M. Shepard; P. Hebbar & A. Mustari (2010). Control of cocoa pod borer and Phytophthora pod rot using degradable plastic pod sleeves and a nematode, *Steinernema carpocapsae*. *Indonesian Journal of Agricultural Science* (In Press).
- Rossmann AY, Palm ME. 2006. Why are *Phytophthora* and other *Oomycota* not true fungi. USDA Agriculture Research Service, USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Systematic Botany & Mycology Laboratory, Beltsville, Maryland 20705. www.apsnet.org/education/IntroPlantPath/PathogenGroup/oomycetes/default.htm (29 september 2017).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Ed.2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sansome E, Brasier CM, Griffin MJ. 1975. Chromosome size differences in *Phytophthora palmivora*, a pathogen of cocoa. *Nature (London)* 255: 704- 705.
- 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 Genetics* 26: 74-78.
- Stamp 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 hlm.
- Tan MK, Timmer LW, Broadbent P, Priest M, Cain P. 1996. Differentiation by molecular analysis of *Elsinoe* spp. causing scab diseases of citrus and its epidemiological implications. *Phytopathology* 86:1039-1044.
- Thorold CA. 1974. History up to 1930 of black pod disease and other cocoa diseases caused by *Phytophthora palmivora*. Di dalam: Gregory PH, editor. *Phytophthora Diseases of Cocoa*. Longman, London. Hlm 13-20.

- 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.
- Umaya A. 2004. Keragaman Genetik *P. palmivora* pada Kakao di Indonesia Berdasarkan Pendekatan Molekuler. (Disertasi). Bogor : Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- Van Hall, C.J.J. (1914). De bestrijding van de cacao-kanker op de onderneming Kemiri (Pekalongan). Mededelingen Proefstation Midden-Java, 14, 1-10.
- Voot D, Voot JG, Pratt CW. 1999. Fundamental of Biochemistry. New York.
- Waterhouse GM, Newhook FJ, Stamp DJ. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. Di dalam: Erwin DC, Bartnicki-Garcia S, Tsao PH, editor. *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. St Paul Minnesota, APS hlm: 139-147.
- Waterhouse GM. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycol. Pap.92. Commonw. Mycol. Inst. Kew, UK.
- Waterhouse GM. 1970. Taxonomy in *Phytophthora*. *Phytopathology* 60 : 1141- 1143.
- Waterhouse GM. 1974. *Phytophthora palmivora* and some related species. Di dalam : Gregory, PH editor. *Phytophthora Diseases of Cocoa*. Longman London.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.p.315-322. Di dalam : Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editor. PCR Protocol: A Guide to Methods and Applications, Academic Pr. Inc. New York.
- Willem A, Man in't V, Wil J, Veenbaas R, Elena I, Arthur WAM, de Cock, Peter JM, Bonants, Rob P. 1998. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and Random Amplified Polymorphic DNA. *Phytopathology* 88:922-929.

- Zadoks JC, Schein RD. 1980. Epidemiology and plant diseases management, the known and the needed. Di dalam Palti J, Kranz J, editor. Comparative Epidemiology, A Tool for Better Diseases Management. Centre for Agric. Publ. And Doc. Wageningen, The Netherlands.
- Zentmyer GA, Kaosiri T, Idosu G. 1977. Taxonomic variants in the *Phytophthora palmivora* complex. Trans. Br. Mycol. Soc. 69:329-332.
- Zentmyer GA, Mircetish SM, Mitchell DM. 1968. Tests for resistance of cacao to *Phytophthora palmivora*. *Plant. Dis. Rep* 52: 790-791.
- Zentmyer GA. 1987. Taxonomic relationships and distribution of species of *Phytophthora* causing black pod of cacao. Proc. Tenth Int. Cocoa Res. Conf. Santo Domingo, Dominican Republic. 17-23 May 1987. Cocoa Prod. Alliance , London hlm:391-395.
- Zyskind JW and Berstein SI. 1992. Recombinant DNA Laboratory Manual.

