

## Pengembangan penanda molekuler untuk deteksi *Phytophthora palmivora* pada tanaman kakao

*Development of molecular marker for the detection of  
Phytophthora palmivora in cacao*

T.W. DARMONO<sup>1)</sup>, Ilyas JAMIL<sup>2)</sup> & Dwi Andreas SANTOSA<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Indonesia

### Summary

*Pod rot is one of the most important diseases in cacao. This disease could be incited by Phytophthora palmivora, P. megakarya, P. capsici or P. citrophthora. The causal agent of pod rot disease in cacao in Indonesia is known to be P. palmivora. The success of pod rot disease management partly depends on the success of efforts in reducing the quantity and quality of the disease inoculum above and below soil surface. Provision of molecular-based detection system would improve the accuracy of determination of these two parameters. The objective of this experiment was to develop a pair of primers that could be used to specifically amplify rDNA fragments of P. palmivora associated with pod rot disease in cacao. Design of these primers was made based on the DNA sequence of rDNA fragment amplified using a pair of universal primers ITS4/ITS5. Regions showing high degree of dissimilarity among species of Phytophthora and high degree of similarity within the same species of P. palmivora were determined through DNA alignment. Specific forward primer (DTF) 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3' and reverse primer (Ilyas1R) 5'-GTT CAC CAA TCA TAC CAC C-3' were obtained. This pair of primers had been proven to specifically amplify only rDNA fragment, approximately 650 bp, of P. palmivora associated with pod rot disease and stem canker in cacao.*

[Keywords : *Phytophthora*, cacao, bioinformatics, molecular detection].

### Ringkasan

Penyakit busuk buah merupakan salah satu penyakit terpenting pada tanaman kakao. Penyakit ini dapat disebabkan oleh *Phytophthora palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* atau *P. citrophthora*. Di Indonesia busuk buah disebabkan oleh *P. palmivora*. Keberhasilan pengendalian penyakit busuk buah salah satunya tergantung kepada keberhasilan penekanan kuantitas dan kualitas inokulum baik yang berada di atas maupun di bawah permukaan tanah. Tersedianya perangkat deteksi molekuler akan sangat membantu dalam upaya penetapan kedua parameter tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengembangkan satu pasang primer yang secara spesifik mampu mengamplifikasi hanya fragmen rDNA *P. palmivora* yang berkaitan dengan husuk buah kakao. Desain primer dilakukan dengan mengacu kepada sekuen rDNA yang diamplifikasi dengan pasangan primer universal ITS4/ITS5. Daerah yang menunjukkan urutan basa dengan tingkat keragaman yang tinggi antar spesies *Phytophthora* dan yang menunjukkan tingkat kesamaan tinggi dalam satu spesies *P. palmivora* yang sama ditelusuri melalui penajajaran DNA. Hasil desain primer diperoleh primer *forward* (DTF) 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3' dan *reverse* (Ilyas1R) 5'-GTT CAC CAA TCA TAC CAC C-3'. Pasangan primer DTF dan Ilyas1R ini hanya mampu mengamplifikasi fragmen rDNA berukuran 650 bp dari *P. palmivora* penyebab penyakit buah dan kanker batang kakao.

## Pendahuluan

Kakao merupakan salah satu tanaman perkebunan dan merupakan komoditas ekspor penting di Indonesia, namun pengembangannya secara luas masih menghadapi hambatan antara lain oleh adanya serangan hama dan penyakit. Beberapa jenis penyakit dapat menyerang tanaman kakao, akan tetapi yang sangat penting dan penyebarannya sangat luas adalah penyakit busuk buah atau black pod rot yang disebabkan oleh *Phytophthora*. Sekurang-kurangnya terdapat tujuh spesies *Phytophthora* yang teridentifikasi di lapang, akan tetapi ahli mikologi sekarang ini mengkarakterisasi empat spesies utama yang menginfeksi kakao yaitu *P. palmivora*, *P. megakarya*, *P. capsici* dan *P. citrophthora* (Evan & Priori, 1987).

Seluruh bagian tanaman kakao dapat terinfeksi oleh patogen tersebut mulai dari akar, batang, bunga, buah dan daun. Namun kerugian yang sangat tinggi disebabkan oleh serangan pada buah. Survei yang dilakukan di Jawa menunjukkan bahwa serangan penyakit busuk buah dapat menurunkan hasil sekitar 26 - 56% (Pawirosoemardjo & Purwantara 1992). Sekali patogen berhasil menginfeksi buah, maka tidak ada perlakuan apapun yang mampu mencegah perkembangan penyakit di dalam buah. Buah yang menjadi busuk akan menjadi sumber penularan penyakit yang sangat potensial. Oleh karena itu, upaya yang bertujuan untuk memperkecil peluang terjadinya infeksi merupakan tindakan utama yang harus dilakukan. Peluang terjadinya infeksi dapat diperkecil dengan menekan serendah mungkin kuantitas dan kualitas sumber infeksi atau inokulum penyakit. Berkaitan dengan itu perlu dikembangkan perangkat deteksi yang spesifik dan sensitif yang dapat digunakan untuk menetapkan atau mengukur kuantitas dan kualitas sumber infeksi. Sumber inokulum tidak hanya berasal dari buah, kulit, dan bantalan bunga yang terserang, tetapi juga berasal dari tanah.

*Phytophthora* spp. yang menyerang tanaman kakao dapat bertahan beberapa tahun di dalam tanah pada sisa-sisa kulit buah dan bahan organik lainnya.

Cara pendeteksian penyakit yang dilakukan selama ini masih bertumpu kepada karakter morfologis dan fisiologis patogen yang berhasil diisolasi. Isolasi dan penetapan karakter morfologis dan fisiologis sulit dilakukan karena memerlukan keahlian khusus, dan hanya seorang taksonomis yang mampu (Ristaino et al., 1998). Karakter fenotipik taksonomi bisa saling tumpang tindih di antara spesies dan perubahan-perubahan yang nyata dapat terjadi antara isolat dari spesies yang sama (Erwin & Ribeiro 1996; Ristaino et al., 1998). Perkembangan teknik molekuler yang sedemikian pesat pada tiga dasawarsa terakhir memberikan peluang yang besar bagi dikembangkannya perangkat deteksi yang sensitif dan spesifik dan dapat dilakukan dalam waktu yang relatif singkat. Pendekatan molekuler pada berbagai bidang penelitian semakin dipermudah dengan ditemukannya metode PCR untuk mengamplifikasi DNA secara in vitro. Perbedaan profil fragmen DNA hasil amplifikasi dengan PCR dapat digunakan sebagai alat untuk membedakan mikroba pada tingkat genus, spesies bahkan genotipe spesifik dari patogen (Edel, 1998).

Penggabungan metode PCR dan perancangan primer untuk mengamplifikasi berbagai daerah yang terdapat pada DNA ribosom (rDNA) sangat mendukung upaya pengembangan perangkat deteksi cendawan patogen tanaman. Pada DNA cendawan terdapat daerah konservatif yaitu gen penyandi rRNA 18S, 5.8S, 28S yang di antaranya terdapat daerah internal transcribe spacer (ITS). Daerah ITS biasanya mengalami perubahan atau mutasi sehingga dapat berbeda atau bervariasi di antara spesies. Beberapa peneliti telah melakukan kajian intensif secara molekuler terhadap spesies *Phytophthora* dengan teknik PCR pada daerah rDNA yang diikuti dengan analisis

*restriction fragment length polymorphism* (RFLP) dan *atau amplified fragment length polymorphism* (AFLP) untuk membedakan spesies serta menyusun filogenetiknya (Appiah *et al.*, 2004; Chowdappa *et al.*, 2003; Cooke *et al.*, 2000; Förster *et al.*, 2000; Ristaino *et al.*, 1998). Dengan menganalisis pola fragmen restriksi hasil amplifikasi rDNA, Ristaino *et al.* (1998) berhasil mengelompokkan berbagai isolat sampel ke dalam enam group morfologi *Phytophthora*. Primer spesifik untuk mendeteksi *P. capsici* pada tanaman lada berhasil diciptakan. Appiah *et al.* (2004) telah mampu membedakan spesies *Phytophthora* utama penyebab penyakit busuk buah kakao dengan mengamplifikasi rDNA kemudian dilanjutkan dengan analisis restriksi. Penanda molekuler untuk deteksi *P. palmivora* pada tanaman kakao di Indonesia dengan akurasi yang tinggi dan lebih sederhana perlu dikembangkan.

Perkembangan bioinformatika sebagai ilmu baru telah memberikan kemudahan dalam menganalisis berbagai data hasil penelitian di bidang biologi molekuler. Program serta data-data yang berhubungan dengan biologi molekuler dengan mudah dapat diakses dari internet, antara lain untuk mendapatkan sekuen nukleotida yang tersimpan dalam *GenBank*, menganalisis tingkat similaritas dengan *multiple Sequence alignment* menggunakan *Clustal-W*, membandingkan suatu sekuen dengan sekuen yang tersimpan dalam *Genbank* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), untuk mendesain primer, dan mengetahui situs enzim restriksi dalam utas DNA. Hal tersebut menjadi sangat bermanfaat dalam merancang primer untuk mendeteksi cendawan *P. palmivora* pada kakao. Penelitian ini bertujuan untuk merancang primer pada daerah ITS rDNA dan menguji primer tersebut dengan PCR untuk mendeteksi *P. palmivora* pada kakao.

## Bahan dan Metode

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia (BPBPI), Bogor. Isolat *P. palmivora* yang digunakan adalah P, RAP, RCP dari busuk buah kakao; BAC, BCC, BDC1, BDC2 dari kanker batang kakao dari BPBPI. Selain itu digunakan pula isolat cendawan dari genus lain yang berasal dari BPBPI yaitu *Trichoderma harzianum* DT038, *T. pseudokoningii* DT039 dan *Ganoderma lucidum*. Sedangkan isolat *P. capsici* dan *P. capsici* E.901 yang diisolasi dari tanaman lada diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, Bogor. Perancangan primer dilakukan dengan mengacu kepada sekuen rDNA yang diamplifikasi dengan pasangan primer universal ITS4/ITS5. Daerah yang menunjukkan urutan basa dengan tingkat perbedaan yang tinggi antar spesies *Phytophthora* dan yang menunjukkan tingkat kesamaan tinggi dalam satu spesies *P. palmivora* yang sama ditelusuri melalui penajajaran DNA dari data base.

### Penyiapan kultur cendawan

Cendawan *P. palmivora*, *P. capsici* dan *P. capsici* E.901 ditanam pada medium *potato dextrose* agar (PDA) (ekstrak dari 200 g kentang, 20 g gula pasir, dan 15 g agar), sedangkan *T. harzianum* DT038 dan *T. pseudokoningii* DT039 pada medium *malt extract agar* (MEA) (15 g *malt extract*, 5 g *bacto pepton* dan 20 g agar) dan *G. lucidum* pada medium MEA selektif (MEA ditambah *galic acid* 0,5%, *benomyl* 10 ppm, *phenyl phenol* 15 ppm), yang masing-masing disiapkan dalam volume satu liter disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit, kecuali *galic acid* yang disterilisasi dengan filtrasi 0,45 µm. Kultur diinkubasi pada suhu 27°C. Setelah

koloni cendawan tumbuh, umur lima hari, miselium dipindahkan ke medium PDB (sarna dengan medium PDA tetapi tanpa agar) dan diinkubasi di atas *shaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 5 - 7 hari. Miselium disaring kemudian dibilas dengan *phosphate buffer saline* (PBS) yang terdiri atas 8,00 g NaCl; 0,20 g KCl; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dengan pH 7,4. Selanjutnya miselium tersebut disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C atau langsung digunakan untuk ekstraksi DNA.

#### Ekstraksi DNA genomik dan PCR

Ekstraksi DNA genomik dari cendawan dilakukan dengan metode Orosco-Castillo et al. (1994) yang dimodifikasi dengan penambahan PVP dan β-merkapt-toetanol (Toruan-Mathius et al., 1997). Amplifikasi potongan daerah ITS rDNA terhadap isolat sampel dilakukan dengan mesin PCR menggunakan pasang primer umum ITS4/ITS5 dan DTF/IlyasIR.

Sebanyak 1 µL DNA sampel konsentrasi 25-50 ng/µL dimasukkan dalam tabung PCR yang berisi 17,6 µL ddH<sub>2</sub>O; 1,25 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega); 0,5 µL dNTP 10 mM (Promega); 0,15 µL enzim *Taq* DNA polimerase rkombinan 5U/µL (Invitrogen); 2,5 µL bufer 10X *Taq* polimerase (Promega); masing-masing 1 µL primer *forward* dan *reverse* dengan konsentrasi 50 ng/µL. Volume campuran reaksi 25 µL, selanjutnya dimasukkan dalam mesin PCR tipe Tpersonal (Bio-metra) dengan program : pemanasan awal pada suhu 94°C selama lima menit, denaturasi pada suhu 94°C selama satu menit, penempelan primer pada suhu 55°C selama satu menit, ekstensi DNA pada suhu 72°C selama 1,5 menit. Setelah 35 siklus PCR dibiarkan pada suhu 72°C selama tujuh menit kemudian suhu diturunkan sampai 4°C.

#### Elektroforesis

Produk PCR selanjutnya dielektroforesis dalam gel agarosa 0,9% dalam larutan bufer TBE 0,5X. Sebanyak 10 µL DNA hasil PCR dicampur dengan 2 µL *loading dye* kemudian dimasukkan dalam sumur yang terdapat pada gel. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya gel hasil elektroforesis diletakkan di atas UV transiluminator dan difoto untuk dokumentasi.

#### Hasil dan Pembahasan

Selama ini pendekatan molekuler untuk mendeteksi *P. palmivora* dengan PCR di Indonesia bertumpu pada penggunaan pasangan primer ITS4/ITS5 padahal primer ini bersifat universal yang dapat mengamplifikasi rDNA berbagai cendawan. Dengan demikian, apabila hanya berdasar kepada ukuran fragmen produk PCR hasil amplifikasi menggunakan primer ITS4/ITS5 dikhawatirkan terjadi kesalahan positif di mana fragmen berukuran sama bukan berasal dari *P. palmivora* tetapi dari cendawan lainnya. Oleh karena itu dalam kegiatan penelitian ini didesain primer spesifik pada daerah ITS rDNA untuk mendeteksi *P. palmivora* pada kakao. Pada penelitian sebelumnya, hasil amplifikasi rDNA apitan ITS4/ITS5 dari enam isolat *P. palmivora* telah berhasil disekuen. Dari data sekuen yang ada keenam isolat tersebut memiliki tingkat kesamaan yang sangat tinggi. Sekuen yang ada selanjutnya digunakan untuk pembuatan desain primer baik *forward* maupun *reverse*.

#### Perancangan primer

Analisis primer *forward* menggunakan sekuen daerah ITS rDNA *P. palmivora*

dengan urutan basa 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3'. Berpatokan pada sekuen tersebut maka dapat dilihat banyak perbedaan basa antara *P. palmivora* dengan spesies *Phytophthora* lainnya dari *GenBank*. Pada Tabel 1 terlihat bahwa sekuen *P. palmivora* memiliki kesamaan dengan sekuen *P. arecae*. Hal ini disebabkan isolat *P. arecae* (*GenBank* nomor akses AF266781) sebenarnya adalah *P. palmivora* yang berasal dari Indonesia yang diisolasi dari kelapa (Appiah *et al.*, 2004, dan Cooke *et al.*, 2000), demikian pula *P. arecae* bersifat konspesifik (*conspecific*) dengan *P. palmivora* (Erwin & Ribeiro 1996). Setelah dilakukan analisis dengan [www.cybergene.se](http://www.cybergene.se) maka primer dengan urutan basa 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3' hasilnya tidak ditemukan struktur *palindrom* dan jepit rambut, dengan  $T_m = 55,6^{\circ}\text{C}$ ,  $T_a = 50,6^{\circ}\text{C}$  dan rasio G/C sebanyak 50,0%.

Untuk merancang primer *reverse* pada daerah ITS rDNA *P. palmivora* maka dipilih sekuen yang tinggi keragamannya dibandingkan dengan spesies *Phytophthora* lainnya dari *GenBank*. Sekuen primer *reverse* yang dianalisis adalah 5'-GGT GGT ATG ATT GGT GAA C-3' pada *P. palmivora*, kemudian dikomplementasi menjadi 3'-CCA CCA TAC TAA CCA CTT G-5' setelah itu *direverse* menjadi 5'-GTT CAC CAA TCA TAC CAC C-3'. Pada primer ini nampak banyak perbedaan basa antara *P. palmivora* dengan spesies *Phytophthora* lainnya yang dapat diakses dari *GenBank* (Tabel 2.). Hasil analisis menunjukkan bahwa pada sekuen tersebut tidak terdapat struktur *palindrom* dan jepit rambut, dengan  $T_m = 54,2^{\circ}\text{C}$  serta  $T_a = 49,2^{\circ}\text{C}$  dengan rasio G/C sebanyak 47,4%. Hasil perancangan primer pada daerah ITS rDNA *P. palmivora* ditetapkan primer *forward* adalah 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3' yang diberi nama DTF dan

primer *reverse* 5'-GTT CAC CAA TCA TAC CAC C-3' yang diberi nama Ilyas1R.

#### Amplifikasi daerah rDNA

Pasangan primer DTF/Ilyas1R digunakan untuk mengamplifikasi rDNA terhadap semua isolat sampel. Sebagai pembandingan amplifikasi dengan primer umum yaitu ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' dan ITS5 5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3' juga dilakukan.

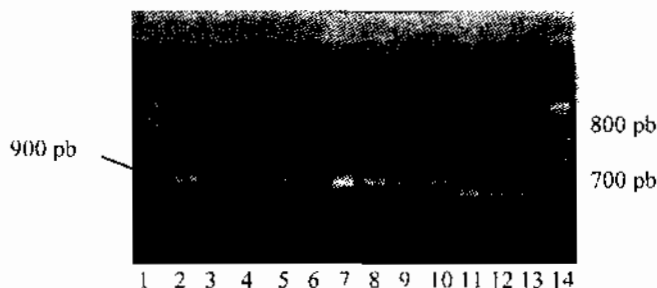
Gambar 1 memperlihatkan bahwa pasangan primer ITS4/ITS5 dapat mengamplifikasi daerah ITS rDNA semua isolat sampel. Hal ini disebabkan pasangan primer tersebut adalah primer umum yang dirancang untuk mengamplifikasi sebagian sub unit kecil 18S, keseluruhan daerah ITS1 dan ITS2 serta 5.8S, dan sebagian sub unit besar 28S rDNA berbagai jenis cendawan (White *et al.*, 1990).

Ukuran fragmen DNA hasil amplifikasi pasangan primer ITS4/ITS5 pada isolat *P. palmivora*, *P. capsici* dari lada dan *P. capsici* E.901 dari terong nampaknya sama dengan yang diperkirakan sekitar 900 bp. Akan tetapi berdasarkan penelitian Ristaino *et al.* (1998) bahwa ukuran fragmen hasil amplifikasi dengan primer ITS4/ITS5 pada *P. palmivora* diperkirakan sekitar 950 bp sedangkan *P. capsici* berukuran sekitar 900 bp. Pada penelitian yang dilakukan di Indonesia terhadap isolat *Phytophthora* dari kakao menunjukkan bahwa amplifikasi dengan primer ITS4/ITS5 menghasilkan pita tunggal berukuran sekitar 900 bp (Darmono & Purwantara 2001; Umayah 2004). Berdasarkan ciri morfologi dan molekuler yang ditunjukkan disimpulkan bahwa beberapa isolat *Phytophthora* yang diisolasi dari buah yang terserang dan dari kanker batang pada perkebunan kakao di Indonesia adalah *P. palmivora* (Butl.) (Umayah, 2004).

Tabel 1. Perbedaan sekuen rDNA beberapa spesies *Phytophthora* dari GenBank untuk analisis primer forward disesuaikan dengan Clustal-W.

Table 1. Ribosomal DNA (rDNA) sequence variation in *Phytophthora* species determined from GenBank for the analyses of forward primer based on Clustal-W.

No	Species <i>Phytophthora</i> <i>Phytophthora species</i>	Sekuen basa <i>Base sequence</i>
1.	<i>P. parasitica</i> 684915	AAT AGT TGG GGG TCT TAT TT
2.	<i>P. nicotianae</i> 467087	AAT AGT TGG GGG TCT TAT TT
3.	<i>P. cactorum</i> 552099	AAT AGT TGG GGG TCT TGT CT
4.	<i>P. arecae</i> 266781	CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC
5.	<i>P. palmivora</i> 517463	CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC
6.	<i>P. palmivora</i> 467089	CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC
7.	<i>P. megakarya</i> 467096	TTT AGT TGG GGG TCT TTT TC
8.	<i>P. katsurae</i> 266771	AAT AGT TGG GGG CGA GTT TG
9.	<i>P. megasperma</i> 41380	TTA AAT TGG GAG CTT TCG TC
10.	<i>P. erythroseptica</i> 228082	TTA AAT TGG GGG CTT CCG TC
11.	<i>P. cinnamomi</i> 684914	ATT AGT TGG GGG CCT GCT CT
12.	<i>P. meadii</i> 251649	TTT AGT TGG GGG TGT TGC TT
13.	<i>P. colocasiae</i> 266786	TTT AGT TGG GGG TGT TGC TT
14.	<i>P. botryosa</i> 266784	TTT AGT TGG GGG TGT TGC TT
15.	<i>P. citrophthora</i> 467086	TTT AGT TGG GGG TGT TGC TT
16.	<i>P. capsici</i> 467084	TTT AGT TGG GGG TCT TGT AC
17.	<i>P. capsici</i> 208129	TTT AGT TGG GGG TCT TGT AC
18.	<i>P. boehmeriae</i> 204921	TTT AGT TGG GGA CTC CTC GT
19.	<i>P. haveae</i> 416484	AAT AGT TGG GGG CGA GTT TG



Gambar 1. Amplifikasi dengan PCR pada rDNA menggunakan pasangan primer ITS4/ITS5. Lajur 1 & 14: marker 1 Kb plus DNA ladder; lajur 2 – 13 berturut-turut adalah: *P. palmivora* P; *P. palmivora* RCP; *P. palmivora* BAC; *P. palmivora* BDC1; *P. palmivora* BDC2; *P. capsici* dari lada 1; *P. capsici* dari lada 2; *P. capsici* E.901 dari terong 1; *P. capsici* E.901 dari terong 2; *T. harzianum* DT038; *T. pseudokoningii* DT039 dan *G. lucidum*.

Figure 1. PCR amplification of rDNA region using primer pair ITS4/ITS5. Lanes 1 & 14: 1 kb marker plus DNA ladder; Lanes 2 – 13 are: *P. palmivora* P; *P. palmivora* RCP; *P. palmivora* BAC; *P. palmivora* BDC1; *P. palmivora* BDC2; *P. capsici* from pepper 1; *P. capsici* from pepper 2; *P. capsici* E.901 from egg plant 1; *P. capsici* E.901 from egg plant 2; *T. harzianum* DT038; *T. pseudokoningii* DT039 and *G. lucidum* respectively.

Tabel 2. Perbedaan sekuen rDNA beberapa spesies *Phytophthora* dari GenBank untuk analisis primer reverse disesuaikan dengan Clustal-W.

Table 2. Ribosomal DNA (rDNA) sequence variation in *Phytophthora* species determined from GenBank for the analyses of reverse primer based on Clustal-W.

No	Spesies <i>Phytophthora</i> <i>Phytophthora species</i>	Sekuen basa <i>Base sequence</i>
1.	<i>P. parasitica</i> 684915	GCG TGA TGG ACT GGT GAAC
2.	<i>P. nicotianae</i> 467087	GCG TGA TGG ACT GGT GAAC
3.	<i>P. cactorum</i> 552099	GCG TGA TGG ACC GGT GAAC
4.	<i>P. arecae</i> 266781	GGT GGT ATG ATT GGT GAAC
5.	<i>P. palmivora</i> 517463	GGT GGT ATG ATT GGT GAAC
6.	<i>P. palmivora</i> 467089	GGT GGT ATG ATT GGT GAAC
7.	<i>P. megakarya</i> 467096	GCG GTA TGA AGT AGT GAAC
8.	<i>P. katsurae</i> 266771	GCG GTA ATG GCT GGT GTAC
9.	<i>P. megasperma</i> 41380	GTA GTA TGG ACT GGT GAAC
10.	<i>P. erythrosetica</i> 228082	GCT GGA TGG ACT GGT GAAC
11.	<i>P. cinnamomi</i> 684914	GCG GTA CGG ATC GGT GAAC
12.	<i>P. meadii</i> 251649	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC
13.	<i>P. colocasiae</i> 266786	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC
14.	<i>P. botryosa</i> 266784	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC
15.	<i>P. capsici</i> 467084	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC
16.	<i>P. capsici</i> 208129	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC
17.	<i>P. citrophthora</i> 467086	GCG TGA TGG GCT GGT GAAC

Dari hasil amplifikasi daerah ITS rDNA dengan primer ITS4/ITS5 terlihat bahwa isolat *T. harzianum* DT038 dan *T. pseudokoningii* DT039 memiliki fragmen berukuran sekitar 800 bp sedangkan pada *G. lucidum* berukuran lebih pendek sekitar 700 bp (Gambar 1). Perbedaan ukuran fragmen antara *Phytophthora* spp., *Trichoderma* spp. dan *Ganoderma* sp. disebabkan oleh adanya variasi panjang pendeknya daerah ITS pada masing-masing rDNA cendawan. Daerah ITS sebagai daerah yang tingkat konservasinya rendah sedangkan daerah sub unit kecil 18S, 5.8S, sub unit besar 28S dan 5S diketahui sebagai daerah yang sangat konservatif pada rDNA yang mempunyai sekuen hampir pasti sama di antara organisme (Darmono, 2001; White *et al.*, 1990). Variasi yang signifikan dapat terjadi karena adanya delesi, insersi atau substitusi antara spesies dalam daerah ITS terutama pada ITS1, namun demikian beberapa daerah yang konservasinya tinggi

terdapat pula pada sekuen ITS1 dan ITS2 rDNA. Umumnya bagian ujung 5' dan 3' pada sekuen ITS1 dan ITS2 adalah daerah yang konservasinya tinggi pada semua spesies *Phytophthora* dengan variasi sangat sedikit terbatas hanya perubahan beberapa basa (Appiah *et al.*, 2004). Demikian pula daerah ITS dan *Intergenic Sequence* (IGS) pada unit pengulangan rDNA berkembang paling cepat dan memungkinkan terjadinya variasi di antara spesies dan populasi (White *et al.*, 1990).

Gambar 2 memperlihatkan bahwa pasangan primer DTF/Ilyas1R hanya mampu mengamplifikasi isolat *P. palmivora* dari kakao baik yang berasal dari busuk buah maupun kanker batang (lajur 2-9) berukuran sekitar 650 bp. Sesuai pula perhitungan jumlah basa di antara primer DTF/Ilyas1R pada sekuen rDNA berjumlah sekitar 640bp, berarti sama dengan perkiraan ukuran fragmen hasil elektroforesis (Gambar 2).



Gambar 2. Amplifikasi dengan PCR pada rDNA menggunakan pasangan primer DTF/Ilyas1R. Lajur 1-16 berturut-turut adalah: marker 1 Kb plus DNA ladder; *P. palmivora* P1; *P. palmivora* P2; *P. palmivora* BAC; *P. palmivora* BCC; *P. palmivora* BDC1; *P. palmivora* BDC2; *P. palmivora* RAP; *P. palmivora* RCP; *P. capsici* dari lada 1; *P. capsici* dari lada 2; *P. capsici* E.901 dari terong 1; *P. capsici* E.901 dari terong 2; *T. harzianum* DT038; *T. pseudokoningii* DT039 dan *G. lucidum*.

Figure 2. PCR amplification of rDNA region using primer pair DTF/Ilyas1R. Lanes 1-16 are: marker 1 Kb plus DNA ladder; *P. palmivora* P1; *P. palmivora* P2; *P. palmivora* BAC; *P. palmivora* BCC; *P. palmivora* BDC1; *P. palmivora* BDC2; *P. palmivora* RAP; *P. palmivora* RCP; *P. capsici* from pepper 1; *P. capsici* from pepper 2; *P. capsici* E.901 from egg plant 1; *P. capsici* E.901 from egg plant 2; *T. harzianum* DT038; *T. pseudokoningii* DT039 and *G. lucidum*, respectively.



Isolat *P. capsici*, *T. harzianum* DT038, *T. pseudokoningii* DT039 dan *G. lucidum* (lajur 10-16) tidak teramplifikasi. Primer DTF/IlyasIR dirancang untuk mengamplifikasi sebagian daerah ITS1 dan ITS2 serta keseluruhan sub unit 5.8S rDNA *P. palmivora*. Primer ini diturunkan dari sekuen yang tingkat perbedaan basanya tinggi antara isolat *P. palmivora* dengan sekuen *Phytophthora* lainnya yang diambil dari *GenBank*.

### Kesimpulan

Primer ITS4/ITS5 dapat mengamplifikasi semua isolat sampel dengan ukuran fragmen yang berbeda. Isolat *P. palmivora* dan *P. capsici* memiliki ukuran fragmen sama yang diperkirakan 900 bp. Sedangkan isolat *T. harzianum* DT038 dan *T. pseudokoningii* DT039 berukuran sekitar 800 bp. *G. lucidum* berukuran lebih pendek sekitar 700 bp. Hasil rancangan primer pada daerah ITS rDNA *P. palmivora* diperoleh pasangan primer *forward* (DTF) 5'-CTT AGT TGG GGG TCT CTT TC-3' dan *reverse* (IlyasIR) 5'-GTT CAC CAA TCA TAC CAC C-3'. Pasangan primer DTF/IlyasIR hanya mampu mengamplifikasi isolat *P. palmivora* yang berasal dari busuk buah maupun kanker batang kakao menghasilkan fragmen dengan ukuran panjang sekitar 650 bp. Dengan demikian pasangan primer DTF/IlyasIR dapat digunakan untuk mendeteksi *P. palmivora* pada kakao menggantikan primer umum yang dipakai selama ini.

### Daftar Pustaka

- Appiah, A.A., J. Flood, S.A. Archer & P.D. Bridge (2004). Molecular analysis of the major *Phytophthora* species on cocoa. *Plant Pathol.*, **53**, 209-219.
- Chowdappa, P., D. Brayford, J. Smith, J. Flood (2003). Molecular discrimination of *Phytophthora* isolat on cocoa and their relationship with coconut, black pepper and bell pepper isolates based on rDNA repeat and AFLP fingerprints. *Curr Sci.*, **84**(9), 1235-1238.
- Cooke, D.E.L., A. Drenth, J.M. Duncan, G. Wagels & C.M. Brasier (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genet. Biol.*, **30**, 17-32.
- Darmono, T.W. (2001). Development of molecular and serological technique for the detection of fungal pathogens in woody plants. In *Training Course on Early Detection of Woody Plant Diseases with Latent Infection*. Bogor, 20 February - 2 March 2001. Bogor: SEAMEO-BIOTROP.
- 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*. Bogor, Indonesia: Biotechnology Research Unit for Estate Crops.
- Edel, V. (1998). Polymerase chain reaction in mycology: an overview. In Bridge PD et al. (editor). *Applications of PCR in Mycology*. United Kingdom: CAB International. p. 1-20.
- Erwin, D.C. & O.K. Ribeiro (1996). *Phytophthora Disease Worldwide*. St. Paul, Minnesota, APS Press.
- Evan, H.C. & C. Priori (1987). Cocoa pod diseases. Causal agents and control. *Outlook on Agric.*, **16**, 35-41.
- Förster, H., M.P. Cummings & M.D. Coffey (2000). Phylogenetic relationship of *Phytophthora* species based on ribosomal ITS1 DNA sequence analysis with emphasis on waterhouse groups V and VI. *Mycol. Res.*, **104** (9), 1055-1061.
- Orosco-Castillo, C., K.J. Chalmers, R. Waugh & W. Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene in coffee using

- RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, **87**, 332-339.
- Pawirosoemardjo, S. & A. Purwantara (1992). Laju infeksi dan intensitas serangan *Phytophthora palmivora* pada buah kakao dan batang pada beberapa varietas kakao. *Menara Perkebunan*, **60** (2), 67-72.
- Ristaino, J.B., M. Madritch, C.L. Trout & G. Parra (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**(3), 948-954.
- Toruan-Mathius, N., T. Hutabarat & D. Suhendi (1997). The use of RAPD to evaluate genetic variability of hybrid parent in *Theobroma cacao* L. *Plants. Menara Perkebunan*, **65** (2), 53-63.
- Umayah, A. (2004). Analisis keragaman genetik *Phytophthora palmivora* penyebab busuk buah kakao di Indonesia. *Disertasi*. Bogor, Sekolah Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis MA, et al. (editor). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Application*. San Diego, Academic Press. p, 315-322.