

## Analisis keragaman genetik *Phytophthora palmivora* dari tanaman kakao di Indonesia menggunakan AFLP

*Genetic diversity analysis of Phytophthora palmivora from cocoa in Indonesia using AFLP*

Agus PURWANTARA<sup>1)</sup> & Abu Umayyah<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Jl. Taman Kencana No.1 Bogor 16151, Indonesia

<sup>2)</sup> Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya, Palembang

Diterima tgl 24 Agustus 2010/Disetujui tgl 29 Nopember 2010

### Abstract

*Phytophthora palmivora* is the causal agent of pod rot, stem canker, seedling and leaf blight and cherelle wilt of cacao (*Theobroma cacao*) in Indonesia. The genetic structure of the pathogen population across the country is unknown. In this study, a population of 20 cultures of *P. palmivora* isolated from cocoa at six major cocoa producing provinces namely Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan and Sulawesi Tenggara in Indonesia was evaluated for genotypic diversity using amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Ten primer combinations were used to evaluate all isolates, 68 out of 347 AFLP markers (19.6 %) produced were polymorphic. Results of the AFLP analyses showed that the *P. palmivora* population in Indonesia possessed high degree of similarity (96 %). AFLP banding patterns indicated that the isolates form two distinct groups, but with no genetic differentiation based on geography, types of cocoa or the part of the tree from which the isolates were obtained. These data suggest that frequent outbreaks of *Phytophthora pod rot* in various growing regions is probably resulted from changing of local climatic condition which is conducive for the disease epidemic rather than from different genetic structure or pathogenic populations of this pathogen, which would affect recommendations for disease management.

[Key words: *Theobroma cacao*, genetic diversity, pod rot, stem canker]

### Abstrak

*Phytophthora palmivora* adalah penyebab penyakit busuk buah, kanker batang, hawar bibit dan daun, dan layu pentil pada tanaman kakao (*Theobroma cacao*) di Indonesia. Struktur genetik dari populasi patogen di seluruh negeri belum diketahui. Pada kajian ini, 20 kultur *P. palmivora* yang diisolasi dari berbagai bagian tanaman kakao dari enam provinsi penghasil kakao di Indonesia, yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara diuji keragaman genetiknya menggunakan amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Sepuluh kombinasi primer digunakan untuk menguji semua isolat, 68 di antara 347 penanda AFLP (19,6 %) yang dihasilkan adalah polimorfik. Hasil analisis AFLP menunjukkan bahwa populasi *P. palmivora* di Indonesia mempunyai tingkat kekerabatan yang tinggi (96 %). Pola pita AFLP menunjukkan bahwa kedua puluh isolat membentuk dua kelompok, tetapi tidak ada perbedaan

berdasar letak geografis, tipe kakao atau bagian tanaman kakao asal isolat diperoleh. Data ini menunjukkan bahwa ledakan penyakit busuk buah *Phytophthora* yang sering terjadi di berbagai daerah diduga lebih diakibatkan oleh perubahan kondisi iklim setempat yang memicu terjadinya epidemi daripada karena perbedaan genetik atau patogenisitas dari populasi patogen, sehingga hasil ini dapat melengkapi saran-saran dalam pengelolaan penyakit.

[Kata kunci: *Theobroma cacao*, keragaman genetik, busuk buah, kanker batang]

### Pendahuluan

Busuk buah (*pod rot*) yang disebabkan oleh *Phytophthora* spp. adalah penyakit yang terpenting dalam budidaya kakao di Indonesia, bahkan di kebanyakan negara penghasil kakao dunia (Semangun, 2000; MacMahon & Purwantara, 2004). Kehilangan hasil rata-rata di dunia sekitar 10 %, meskipun dapat mencapai 90 % di daerah basah (Drenth & Sendall, 2004; McMahon & Purwantara, 2004). Kehilangan hasil sampai 50% dilaporkan terjadi di beberapa perkebunan kakao di Jawa (Wardojo, 1992). Patogen dapat menyerang semua bagian tanaman (Drenth & Guest, 2004). Kehilangan hasil terjadi secara langsung melalui busuk buah, sedangkan penurunan produksi dan kematian tanaman terjadi melalui kanker batang dan cabang (Abraham *et al.*, 2000; Blaha & Eskes, 2000; Chowdappa, 2000). Jaringan muda seperti bibit, tunas air, daun flush dan buah muda mengalami kematian secara cepat (Chowdappa & Rohini, 2000). Delapan spesies *Phytophthora* telah berhasil diisolasi dari kakao (MacMahon & Purwantara, 2004), dengan dua spesies yaitu *P. palmivora* yang mempunyai distribusi paling luas di dunia (Bong *et al.*, 2000; Iwano *et al.*, 2000; Lee & Lum, 2004; Portales, 2004; Sangchote *et al.*, 2004; Thanh *et al.*, 2004) dan *P. megakarya* yang distribusinya terbatas di Afrika Barat (Akrofi & Opoku, 2000; Appiah *et al.*, 2003). Hasil survai menunjukkan bahwa sampai saat ini hanya isolat *P. palmivora* yang secara konsisten ditemukan di Indonesia (Purwantara, 1987; 2003; Sri-Sukanto, 1985; 2008; Umayah & Purwantara, 2006; Rubiyono *et al.*, 2008).

Beberapa cara telah dilakukan untuk menekan intensitas penyakit ini, namun pihak petani dan pekebun masih merasakan sulitnya mengendalikan penyakit ini. 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.

Berbagai metode analisis telah digunakan untuk mempelajari keragaman populasi *Phytophthora* spp., di antaranya adalah *Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)* (Goodwin *et al.*, 1992), analisis sekuen (Schena *et al.*, 2006), *single nucleotide polymorphisms (SNPs)* (Kroon *et al.*, 2004; Bilodeau *et al.*, 2007), *Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)* (Cooke *et al.*, 1996; Abu-El Samen *et al.*, 2003), *Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)* (Ivors *et al.*, 2004; Bowers *et al.*, 2007), *microsatellites* (Dobrowolski *et al.*, 2003; Lees *et al.*, 2006), dan *mitochondrial haplotypes* (Gavino & Fry, 2002; Martin, 2008). Analisis keragaman genetik *P. palmivora* memerlukan penanda genetik yang handal dan informatif. RAPD dan AFLP merupakan penanda dominan yang hanya menunjukkan ada/tidak ada suatu alel pada *Phytophthora* yang bersifat diploid. Kedua penanda ini banyak digunakan karena mampu menapis seluruh genom atau beberapa lokus genetik dalam satu assay. AFLP lebih reproduksibel dibandingkan dengan RAPD (Vos *et al.*, 1995) Protokol AFLP dapat dikembangkan dengan cepat dengan memilih kombinasi primer selektif yang tepat untuk menapis lokus genetik yang banyak.

Analisis keragaman genetik menggunakan penanda genetik RAPD pada isolat-isolat *P. palmivora* asal tanaman kakao dari Sumatera Utara dan Jawa Barat memperlihatkan tingkat kesamaan genetik yang tinggi berkisar 70-90 %, sedangkan isolat asal tanaman kelapa, vanili dan lada memperlihatkan kesamaan genetik yang rendah dengan isolat asal kakao yaitu di bawah 50% (Hendrawati, 1997). Namun, belum ada analisis keragaman genetik yang menggunakan isolat dari seluruh Indonesia, termasuk dari Sulawesi yang merupakan sentra produksi kakao rakyat di Indonesia. Tujuan penelitian ini adalah melakukan analisis tingkat keragaman dan kekerabatan antar isolat *P. palmivora* asal beberapa lokasi tanaman kakao di enam provinsi di Indonesia menggunakan teknik AFLP.

### Bahan dan Metode

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikroba dan Bioproses serta Laboratorium Biologi Molekuler

dan Immunologi, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia di Bogor.

#### Isolat patogen

Patogen diisolasi dari sampel buah atau batang kakao sakit atau tanah di sekitar tanaman kakao sakit dengan metode yang telah dijelaskan sebelumnya (Umayah & Purwantara, 2006). Sebanyak 20 isolat berhasil diisolasi dan dikumpulkan dari enam provinsi sentra produksi kakao di Indonesia, yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Tengah, Sulawesi Selatan dan Sulawesi Tenggara (Tabel 1).

#### Isolasi DNA

Isolat *P. palmivora* ditumbuhkan pada medium *Potato Dextrose Broth (PDB)* dalam tabung Erlenmeyer 100 mL, di atas *shaker* dengan kecepatan 125 rpm pada suhu ruang selama tujuh hari. Miselia disaring menggunakan saringan teh steril, dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline (PBS)* sebanyak tiga kali, dan digunakan untuk ekstraksi DNA. Ekstraksi DNA patogen dilakukan menurut metode Orozco-Castillo *et al.* (1994) yang dimodifikasi khususnya penambahan *Poly Vinyl Poly Pyrrolidone (PVPP)* pada waktu penggerusan dalam lumpang porselin dan  $\beta$ -merkaptotanol ke dalam bufer ekstraksi. Setelah dilakukan pengujian kualitas dan penentuan kuantitasnya, larutan DNA digunakan untuk amplifikasi dengan PCR atau disimpan pada suhu -20°C.

#### AFLP

Metode AFLP yang digunakan adalah metode Vos *et al.* (1995) dengan beberapa modifikasi seperti dijelaskan berikut. Untuk digesti DNA genom, 5  $\mu$ L (250 ng) DNA contoh ditambah dengan 1  $\mu$ L *EcoRI/MseI*, 2,5  $\mu$ L bufer reaksi lima kali, dan 4  $\mu$ L air destilata sehingga total volume menjadi 12,5  $\mu$ L. Bahan dicampur sampai homogen dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama dua jam. Selanjutnya campuran tersebut diinkubasikan pada suhu 70°C selama 15 menit untuk menginaktifkan enzim restriksi. Pada reaksi ligasi adaptor, ke dalam setiap tabung reaksi. DNA genom yang telah didigesti di atas ditambah 12  $\mu$ L larutan ligasi adaptor dan 0,5  $\mu$ L T4 DNA ligase. Komponen tersebut dicampurkan secara perlahan pada suhu ruang, disentrifus selama 30 detik dan diinkubasikan pada suhu 20°C selama dua jam. Setelah itu dilakukan pengenceran empat kali dengan bufer TE dan disimpan pada suhu -20°C.

Reaksi preamplifikasi dilakukan dengan cara mencampur 1  $\mu$ L hasil ligasi adaptor yang telah diencerkan dengan 20  $\mu$ L pre-amp primer mix, 2,5  $\mu$ L PCR bufer 10 kali tanpa  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ L *Taq* DNA polimerase, dan 1,5  $\mu$ L  $MgCl_2$ , kemudian melakukan

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

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

PCR sebanyak 20 siklus pada: suhu 94°C (30'), 56°C (60'), 72°C (60'), dan simpan pada suhu -20°C, menggunakan mesin PCR Thermolyne Amplitron®. Untuk reaksi amplifikasi selektif, hasil preamplifikasi diencerkan sebanyak 50 kali dengan bufer TE, kemudian sebanyak 5 µL direaksikan dengan campuran 0,5 µL primer *EcoRI* dan 4,5 µL primer *MSeI*, 1,2 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,15 µL Taq DNA polimerase, 2 µL PCR bufer 10 kali dan 6,65 µL air destilata sehingga total volume menjadi 20 µL. Komponen tersebut dicampur dengan hati-hati dan direaksikan dengan mesin PCR Thermolyne Amplitron® yang diprogram seperti Tabel 2.

Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis pada gel poliakrilamida 6 % (0,1 % amonium persulfat (APS) dan TEMED) ukuran 13 x 11 cm. Pre-elektroforesis (pemanasan) dilakukan selama 20 menit (15 W) supaya suhu permukaan gel kira-kira 50°C. Hasil amplifikasi PCR dicampur dengan 20 µL loading bufer dan 19 µL H<sub>2</sub>O, kemudian didenaturasi pada suhu 95°C selama tiga menit dan segera didinginkan di dalam es. Contoh sebanyak 10 µL dimasukkan pada setiap sumur dan dielektroforesis selama ± 40 menit (12 W). Gel poliakrilamida kemudian diwarnai dengan larutan perak nitrat di atas shaker selama 30 menit, dicuci

dengan dH<sub>2</sub>O bebas ion selama 10 detik, kemudian ditambah larutan developer (4-10°C) dan dibiarkan sampai fragmen-fragmen dapat dilihat sesuai dengan yang diinginkan. Selanjutnya larutan fiksasi/stop dituangkan dan dibiarkan selama lima menit. Gel dicuci dengan dH<sub>2</sub>O selama dua menit, kemudian dilapis dengan *cellophane membrane backing* (BIORAD), dan dibiarkan selama lebih kurang dua hari sampai kering.

#### Analisis data

Pita-pita DNA diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai 1 jika ada pita dan 0 jika tidak ada pita. Data biner yang diperoleh dari AFLP tersebut selanjutnya digunakan dalam analisis keragaman genetik, dengan menggunakan program komputer *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS)* versi 2.0 (Rohlf, 1989). Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut dilakukan analisis pengelompokan (*Cluster analysis*) menggunakan metoda *Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA)* dan *Principal Component Analysis (PCA)*. Hasil *cluster analysis* tersebut berupa dendrogram kesamaan genetik dan gambar tiga dimensi yang menunjukkan hubungan kesamaan antar isolat.

### Hasil dan Pembahasan

#### Seleksi Pasangan Primer AFLP Untuk *P. palmivora*

Seleksi primer untuk *P. palmivora* didasarkan pada pasangan primer yang direkomendasikan untuk *Arabidopsis* menurut protokol analisis AFLP™ sistem II GibcoBRL menggunakan isolat JB-B1-CIO. Sebanyak 26 pasangan primer diseleksi untuk digunakan dalam analisis isolat-isolat *P. palmivora* (Tabel 3). Sebanyak 10 pasangan primer yang memberikan resolusi yang bagus dan jumlah pita-pita yang banyak, tajam dan jelas, yaitu E-AC/M-CAA; E-AC/M-CAC; E-AC/M-CAT; E-AC/M-CTC; E-AC/M-CTG; E-AG/M-CAG; E-AG/M-CTC; E-AG/M-CTG; E-AG/M-CTT; E-AT/M-CAC digunakan untuk analisis selanjutnya (Gambar 1).

#### Analisis Keragaman Isolat *P. palmivora* dengan Teknik AFLP

Analisis keragaman isolat *P. palmivora* dengan teknik AFLP menggunakan 10 pasangan primer menghasilkan 347 pita. Jumlah pita paling banyak dihasil-

kan oleh pasangan primer E-AC/M-CAT yaitu sebanyak 54 pita yang terdiri dari 33 pita polimorfik dan 21 pita monomorfik, sedangkan yang paling sedikit adalah pasangan primer E-AC/M-CTC yang menghasilkan 31 pita terdiri dari 8 pita polimorfik dan 23 pita monomorfik (Tabel 4). Persentase pita yang polimorfik sebesar 19,6% dari jumlah pita keseluruhan. Selanjutnya jumlah pita setelah diubah ke dalam bentuk data biner dipakai dalam analisis menggunakan program komputer *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS)* versi 2.0. Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut dilakukan analisis pengelompokan (*Cluster analysis*) menggunakan metoda *Unweighted Pair Group Method Average (UPGMA)*. Hasil *cluster analysis* tersebut berupa dendrogram kesamaan genetik yang menunjukkan hubungan kesamaan antar isolat (Gambar 3). Gambar 3 memperlihatkan bahwa secara keseluruhan 20 isolat *P. palmivora* yang berasal dari tanaman kakao yang ada di enam provinsi berturut-turut yaitu Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara mempunyai tingkat kesamaan genetik yang tinggi mulai dari 96 % sampai 100 %.

Tabel 2. Profil program PCR untuk reaksi amplifikasi selektif (Gibco BRL-Life Technologies)

Table 2. PCR program profiles for selective amplification reaction (GibcoBRL-Life Technologies)

| File | Suhu (°C) | Waktu (detik) Time (sec.) | Suhu (°C) | Waktu (detik) Time (sec.) | Suhu (°C) | Waktu (detik) Time (sec.) | No. Siklus Number of cycles | Terkait ke Related to | Tipe Type |
|------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------|
| 1    | 94        | 60                        | 65        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 2                     | Step      |
| 2    | 94        | 60                        | 64        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 3                     | Step      |
| 3    | 94        | 60                        | 63        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 4                     | Step      |
| 4    | 94        | 60                        | 62        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 5                     | Step      |
| 5    | 94        | 60                        | 61        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 6                     | Step      |
| 6    | 94        | 60                        | 60        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 7                     | Step      |
| 7    | 94        | 60                        | 59        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 8                     | Step      |
| 8    | 94        | 60                        | 58        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 9                     | Step      |
| 9    | 94        | 60                        | 57        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 10                    | Step      |
| 10   | 94        | 60                        | 56        | 60                        | 72        | 90                        | 1                           | 11                    | Step      |
| 11   | 94        | 30                        | 56        | 30                        | 72        | 60                        | 23                          |                       | Step      |

Tabel 3. Seleksi pasangan primer AFLP untuk *Phytophthora palmivora*

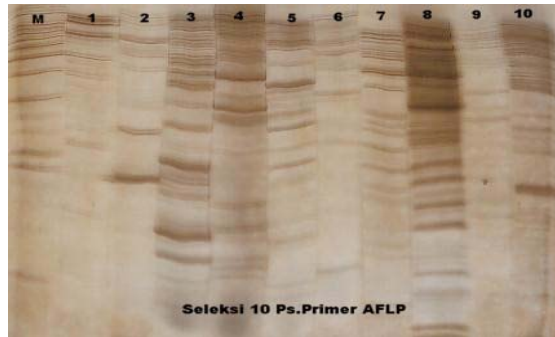
Table 3. Selection of AFLP primers for *Phytophthora palmivora*

| Primer | M-CAA | M-CAC | M-CAG | M-CAT | M-CTA | M-CTC | M-CTG | M-CTT |
|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| E-AA   | td    | td    | -     | td    | -     | td    | td    | td    |
| E-AC   | √     | √     | -     | √     | -     | √     | √     | -     |
| E-AG   | -     | -     | √     | -     | -     | √     | √     | √     |
| E-AT   | td    | √     | td    | td    | td    | td    | td    | td    |
| E-TA   | td    | td    | td    | -     | td    | -     | -     | td    |
| E-TG   | td    | td    | -     | -     | td    | -     | -     | td    |

(√) Pasangan primer yang digunakan (*primers used*); (td) tidak dilakukan (*not done*); (-) tidak direkomendasikan (*not recommended*).

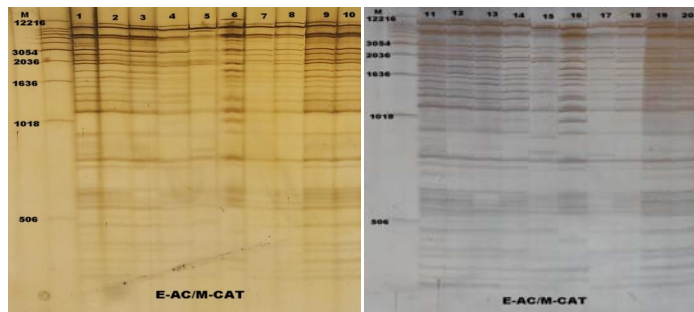
Tabel 4. Primer yang digunakan untuk analisis AFLP serta jumlah pita polimorfik dan monomorfik  
 Table 4. Primers used for AFLP analysis and number of polymorphic and monomorphic bands

| No. | Pasangan primer<br>Primers | Jumlah pita polimorfik<br>No. of polymorphic<br>bands | Jumlah pita monomorfik<br>No. of monomorphic<br>bands | Persentase pita polimorfik<br>Percentage of polymorphic<br>bands |
|-----|----------------------------|---|---|--|
| 1   | E-AC/M-CAT                 | 33  | 21  | 61   |
| 2   | E-AC/M-CTC                 | 8   | 23  | 25   |
| 3   | E-AC/M-CTG                 | 3   | 34  | 8  |
| 4   | E-AG/M-CTG                 | 4   | 28  | 12   |
| 5   | E-AG/M-CAG                 | 4   | 24  | 14   |
| 6   | E-AG/M-CTC                 | 4   | 25  | 13   |
| 7   | E-AC/M-CAA                 | 2   | 30  | 6  |
| 8   | E-AC/M-CAC                 | 6   | 32  | 15   |
| 9   | E-AG/M-CTT                 | 2   | 30  | 6  |
| 10  | E-AT/M-CAC                 | 2   | 32  | 5  |
|     | Jumlah Total               | 68  | 279   | 19   |



Gambar 1. Profil DNA isolat *Phytophthora palmivora* hasil amplifikasi dengan 10 pasang primer AFLP yang memberikan resolusi yang bagus. (1) E-AC/M-CAT; (2) E-AC/M-CTC, (3) E-AC/M-CTG, (4) E-AG/M-CTG, (5) E-AG/M-CAG, (6) E-AG/M-CTC, (7) E-AC/M-CAA, (8) E-AC/M-CAC, (9) E-AG/M-CTT, (10) E-AT/M-CAC, (M) marker

Figure 1. DNA profiles of *Phytophthora palmivora* isolates amplified using 10 AFLP primers with good resolution. (1) E-AC/M-CAT; (2) E-AC/M-CTC, (3) E-AC/M-CTG, (4) E-AG/M-CTG, (5) E-AG/M-CAG, (6) E-AG/M-CTC, (7) E-AC/M-CAA, (8) E-AC/M-CAC, (9) E-AG/M-CTT, (10) E-AT/M-CAC, (M) marker.



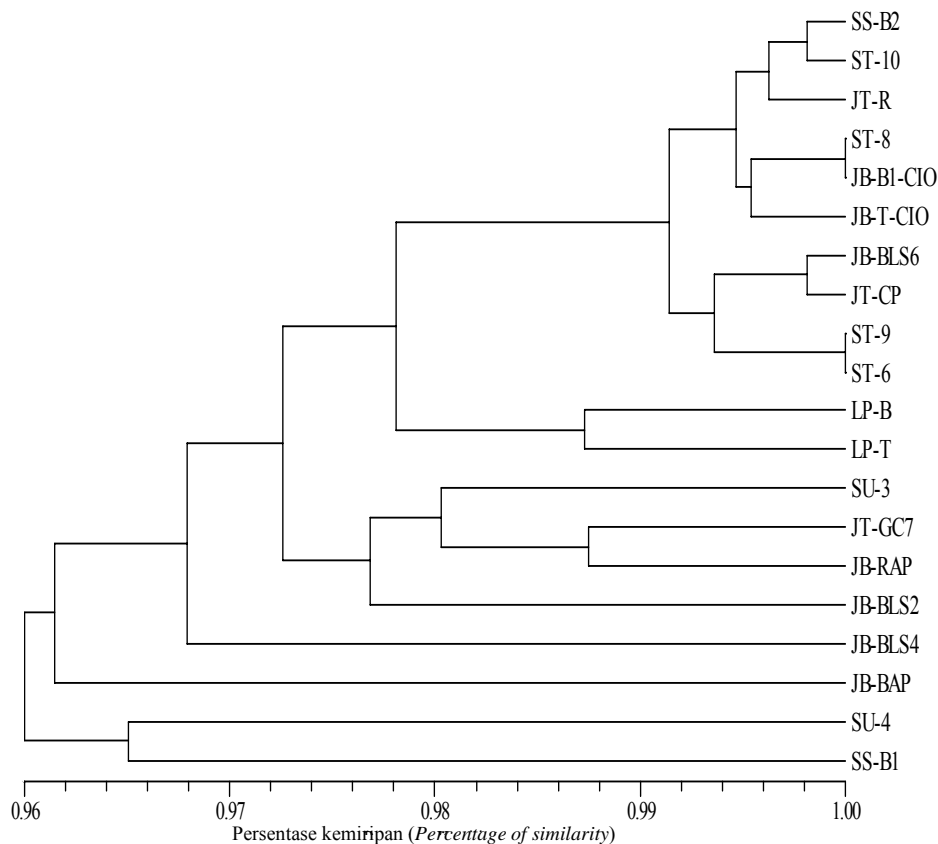
Gambar 2. Analisis AFLP DNA isolat *Phytophthora palmivora* dengan pasangan primer E-AC/M-CAT, (M=marker, 1-20=nomer isolat). Pita berukuran antara 100-600 pb. Semua pita yang tampak jelas digunakan untuk skoring dalam analisis.

Figure 2. AFLP analysis of DNA of *Phytophthora palmivora* isolates using primer E-AC/M-CAT (M=marker, 1-20= isolate number). Bands range in size from 100 to 600 bp. All clearly reproducible bands were scored for analysis.

Dengan kata lain 20 isolat *P. palmivora* tersebut mempunyai tingkat kekerabatan yang dekat atau sangat dekat, meskipun letak geografisnya berjauhan. Sebagai contoh isolat ST-8 (asal Sultra) mempunyai kesamaan genetik 96 % dengan isolat SS-B1 (asal Sulsel), dan isolat ST-8 (asal Sultra) mempunyai kesamaan genetik 100 % (identik) dengan isolat JB-B1-CIO (asal Jabar). Demikian pula tidak terjadi pengelompokan yang jelas berdasar tipe kakao asal isolat diambil, isolat dari Jawa Timur yang diisolasi dari kakao tipe mulia (*fine flavour cocoa*) berada pada kelompok yang sama dengan isolat lain yang diisolasi dari kakao tipe lindak (*bulk cocoa*) dari provinsi yang lain. Juga, tidak terjadi pengelompokan isolat berdasar bagian tanaman asal isolat diambil. Isolat yang diperoleh dari buah, batang atau diisolasi dari tanah mengelompok dengan pola yang tidak jelas. Hal yang menarik untuk dicatat adalah

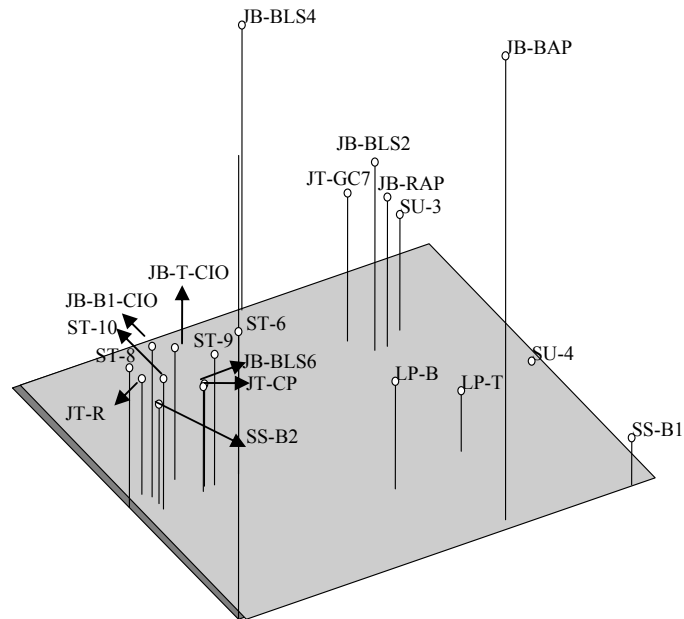
bahwa isolat ST-8 dari Suwalesi Tenggara ternyata identik dengan isolat JB-B1-CIO yang berasal dari Jawa Barat, tetapi sebaliknya isolat JB-BLS2 dan JB-BLS4 yang berasal dari satu pohon berada pada kelompok yang berbeda dengan kekerabatan 97 %. Hasil ini menunjukkan bahwa tidak terjadi perbedaan genetik berdasarkan letak geografis, tipe kakao atau bagian tanaman kakao asal isolat.

Hasil analisis komponen utama dalam bentuk tiga dimensi (Gambar 4) menunjukkan bahwa isolat dapat dibagi menjadi dua kelompok besar, kelompok pertama terdiri atas isolat SS-B2, ST-10, JT-R, ST-8, JB-B1-CIO, JB-T-CIO, JB-BLS6, JT-CP, ST-9 dan ST-6; kelompok kedua terdiri dari isolat LP-B, LP-T, SU-3, JT-GC7, JB-RAP, JB-BLS2, JB-BLS4, JB-BAP, SU-4 dan SS-B1. Tiga komponen utama pertama dapat menerangkan 53,42 % total keragaman yang diamati.



Gambar 3. Dendrogram kesamaan genetik 20 isolat *Phytophthora palmivora* hasil analisis UPGMA (NTSYS-pc 2.0, F.J. Rohlf, Exeter Software, NY, USA) menggunakan 10 pasang primer AFLP. Detail isolat dapat dilihat di dalam teks.

Figure 3. Dendrogram of 20 *Phytophthora palmivora* isolates created using UPGMA analysis (NTSYS-pc 2.0, F.J.Rohlf, Exeter software, NY, USA) using 10 AFLP primers. See text for details of the isolates.



Gambar 4. Gambar multidimensi non-metrik 20 isolat *Phytophthora palmivora* hasil dari analisis komponen utama (NTSYS-pc 2.0, F.J. Rohlf, Exeter Software, NY, USA) menggunakan 10 pasang primer AFLP. Detail isolat dapat dilihat di dalam teks.

Figure 4. Non-metric multidimensional scaling of 20 *Phytophthora palmivora* isolates created using PCA analysis (NTSYS-pc 2.0, F.J. Rohlf, Exeter Software, NY, USA) using 10 AFLP primers. See text for details of the isolates.

Hasil penelitian sebelumnya menggunakan penanda genetik RAPD, isolat-isolat *P. palmivora* asal tanaman kakao dari Sumatera Utara dan Jawa Barat memperlihatkan tingkat kesamaan genetik yang tinggi berkisar 70-90%, sedangkan isolat asal tanaman kelapa, vanili dan lada memperlihatkan kesamaan genetik yang rendah dengan isolat asal kakao yaitu di bawah 50 % (Hendrawati, 1997). Selanjutnya dengan menggunakan isolat yang lebih banyak Umayah *et al.* (2007) melaporkan bahwa kesamaan genetik *P. palmivora* adalah 86 %. Dengan demikian penelitian ini memperkuat hasil penelitian sebelumnya bahwa *P. palmivora* asal kakao di Indonesia menunjukkan kesamaan genetik yang tinggi dan berkerabat sangat dekat. Implikasi dari hasil penelitian ini adalah bahwa kekhawatiran akan terbentuknya ras-ras fisiologi yang lebih ganas pada suatu lokasi saat ini menjadi relatif kecil. Oleh karena itu, keparahan penyakit yang terjadi lebih disebabkan oleh kondisi lingkungan yang kondusif untuk perkembangan penyakit terutama curah hujan yang tinggi dan kondisi kebun yang gelap dan lembab. Selain itu, cara kultur teknik yang diterapkan oleh petani dan pekebun di kebun kakao meliputi pemangkasan pada tanaman kakao dan pelindung,

pemetikan buah-buah yang sakit dan membenamkannya ke dalam tanah, pemupukan yang berimbang, penggunaan mulsa, penggunaan varietas atau klon kakao yang tahan dapat menekan perkembangan penyakit busuk buah pada tanaman kakao.

### Kesimpulan

Isolat-isolat *P. palmivora* yang diisolasi dari tanaman kakao yang berasal dari provinsi Sumatera Utara, Lampung, Jawa Barat, Jawa Timur, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Tenggara mempunyai tingkat kesamaan genetik yang tinggi dan kekerabatan yang dekat berkisar dari 96 % sampai 100 %.

### Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof Dr Ir Meity S. Sinaga, MSc., Prof Dr Ir Sarsidi Sastrosumarjo, dan Prof Dr Ir Sintje M. Sumaraw atas saran-saran yang diberikan selama melaksanakan penelitian dan kepada Dr. Nurhaimi-Haris atas bantuan yang diberikan selama menggunakan fasilitas Laboratorium Biologi Molekuler, Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan, Bogor.

### Daftar Pustaka

- Abraham K, NR Vikraman, VK Mallika & S Prasankumariamamma (2000). Status of research on cocoa diseases in Kerala Agricultural University. In: *Proc National Seminar on Cocoa Development in India: Problems and Prospects*. Trichur, India. p. 84-92.
- Abu-El Samen FM, GA Secor & NC Gudmestad (2003). Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. *Plant Pathol* 52, 314-325.
- Akrofi AY & IY Opoku (2000). Managing *Phytophthora megakarya* pod rot disease: the Ghana experience. In: Bong CL, CH Lee & FS Shari (Eds.). *Proc INCOPEd 3rd Int Seminar 2000*. Kinabalu, Malaysia. p. 78-83.
- Appiah AA, J Flood, PD Bridge & SA Archer (2003). Inter- and intraspecific morphometric variation and characterization of *Phytophthora* isolates from cocoa. *Plant Pathol* 52, 168-180.
- Bilodeau GJ, CA Lévesque, AWAM de Cock, SC Brière & RC Hamelin (2007). Differentiation of European and North American genotypes of *Phytophthora ramorum* by real time polymerase chain reaction primer extension. *Can J Plant Pathol* 29, 408-420
- Blaha G & AB Eskes (2000). Field evaluation of *Phytophthora* pod rot and stem canker incidence In: Eskes AB, JMM Engels & RA Lass (Eds.). *Working Procedures For Cocoa Germplasm Evaluation And Selection*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy p. 118-119.
- Bong CL, TC Chong, KL Lim & GT Lim (2000). Integrated crop management of cocoa clonal plantings for higher productivity and efficiency of crop protection in Sabah, Malaysia. In: Bong CL, CH Lee & FS Shari (Eds.). *Proc INCOPEd 3rd Int Seminar 2000*. Kinabalu, Malaysia. p. 123-142.
- Bowers JH, FN Martin, PW Tooley & ED Luz (2007). Genetic and morphological diversity of temperate and tropical isolates of *Phytophthora capsici*. *Phytopathol* 97, 492-503
- Chowdappa P & I Rohini (2000). Status of research on integrated management of cocoa diseases in India. In: Bong CL, CH Lee & FS Shari (Eds.). *Proc INCOPEd 3rd Int Seminar 2000*. Kinabalu, Malaysia. p. 84-102
- Chowdappa P (2000). An assessment of pathological research at Central Plantation Crops Research Institute and current research priorities. In: *Proc National Seminar on Cocoa Development in India: Problems and Prospects*. Trichur, India. p. 93-108.
- 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.
- Dobrowolski MP, IC Tommerup, BL Shearer & PA O'Brien (2003). Three Clonal Lineages of *Phytophthora cinnamomi* in Australia Revealed by Microsatellites. *Phytopathol* 93, 695-704
- Drenth A & B Sendall (2004). Economic impact of *Phytophthora* diseases in Southeast Asia. In : Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 10-28.
- Drenth A & DI Guest (2004). *Phytophthora* in the tropics. In : Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 30-41.
- Gavino PD & WE Fry (2002). Diversity in and evidence for selection on the mitochondrial genome of *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 94, 781-793
- Goodwin SB, A Drenth & WE Fry (1992). Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr Genetics* 22, 107-115
- Hendrawati (1997). Analisis DNA *Phytophthora* spp. penyebab penyakit busuk pada buah kakao (*Theobroma cacao* L.) dengan teknik RAPD. [Skripsi]. Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Pakuan Bogor
- Ivors KL, KJ Hayden, PAM Bonants, DM Rizzo & M Garbelotto (2004). AFLP and phylogenetic analyses of North American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Mycol Res* 108, 378-392
- Iworo AD, TN Sreenivasan, DR Butler, JM Thevenin, V Mooleedhar, F Bekele, O Sounigo, P Umaharan & AB Eskes (2000). Strategy for germplasm enhancement at Cocoa Research Unit, Trinidad. In: Eskes AB, JMM Engels & RA Lass (Eds.). *Working Procedures For Cocoa Germplasm Evaluation And Selection*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. p. 22-28.
- Kroon LP, EC Verstappen, LF Kox, WG Flier & PJ Bonants (2004). A rapid diagnostic test to distinguish between American and European populations of *Phytophthora ramorum*. *Phytopathol* 94, 613-620
- Lee BS & KY Lum (2004). *Phytophthora* diseases in Malaysia. In: Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 60-69.
- Lees AK, R Wattier, DS Shaw, L Sullivan, NA Williams, DEL Cooke (2006). Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathol* 55, 311-319
- MacMahon P & A Purwantara (2004). *Phytophthora* on cocoa. In: Drenth A & DI Guest (eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia p. 104-115.



- Martin FN (2008). Mitochondrial haplotype determination in the oomycete plant pathogen *Phytophthora ramorum*. *Curr Genetics* 54, 23-34.
- Orozco-Castillo C, KJ Chalmers, R Waugh & W Powell (1994). Detection of genetic diversity and selective gene introgression in coffee using RAPD markers. *Theor Appl Genetics* 89, 934-938.
- Portales LA (2004). Phytophthora diseases in the Philippines. In: Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 90-93.
- Purwantara A (1987). Kajian penyebab penyakit *Phytophthora* pada kakao di Jawa. In: *Proc Indonesian Plant Pathology Society Conf 1987*. Surabaya. p. 283-290.
- Purwantara A (2003). Epidemiology and control of *Phytophthora* diseases of cocoa in Java, Indonesia. In: *8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology*, Christchurch, New Zealand, 2-7 February 2003. p. 353
- Rohlf FJ (1989). *NTSYS-pc 2.0. Exeter software*, NY, USA.
- Rubiyo, A Purwantara, Sri-Sukanto & Sudarsono (2008). Isolation of indigenous *Phytophthora palmivora* in Indonesia, their morphological and pathogenicity characterizations. *Pelita Perkebunan* 24, 37-49.
- Sangchote S, S Poonpolgul, R Sdoodee, M Kanjanameesathian, T Baothong & P Lumyong (2004). *Phytophthora* diseases in Thailand. In: Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 77-82.
- Schena L, JM Duncan & DEL Cooke (2006). Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop. *J Microbiol Meth* 67, 70-85.
- Semangun H (2000). *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan Di Indonesia*. Yogyakarta, Gadjah Mada University Press.
- Sri-Sukanto (1985). *Phytophthora palmivora* Butl. salah satu jamur penyebab penyakit pada tanaman kakao. *Menara Perkebunan* 53, 7-11.
- Sri-Sukanto (2008). Pengendalian penyakit. In : Wahyudi T, TR Panggabean & Pujiyanto (Ed.). *Panduan Lengkap Kakao. Managemen Agribisnis dari Hulu hingga Hilir*. Jakarta, Penebar Swadaya p 154-169.
- Thanh DVT, NV Vien & A Drenth (2004). *Phytophthora* diseases in Vietnam. In : Drenth A & DI Guest (Eds.). *Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia*. ACIAR, Canberra, Australia. p. 83-89.
- Umayah A & A Purwantara (2006). Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao. *Menara Perkebunan* 74, 76-86.
- Umayah A, MS Sinaga, S Sastrosumarjo, SM Sumaraw & A Purwantara (2007). Keragaman genetik isolat *Phytophthora palmivora* dari tanaman kakao di Indonesia. *Pelita Perkebunan* 23, 129-138.
- Vos P, R Hogers & M Bleeker (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23, 4407-4414.
- Wardojo S (1992). Major pests and diseases of cocoa in Indonesia In : Keane PJ & CAJ Putter (Eds.), *Cocoa Pest and Disease Management in Southeast Asia and Australasia*. FAO, Rome, Paper No. 112. p. 63-77.