

IDENTIFIKASI KEBERADAAN PATOGEN *Phytophthora* sp. MENJADI LANGKAH AWAL SELEKSI POHON ALPUKAT SEBAGAI SUMBER ENTRIS DI DESA CAKARUDDU SULAWESI SELATAN

*Identification of *Phytophthora* sp. Pathogen as the First Step in Selecting Avocado Trees as a Source of Scion in Cakaruddu Village South Sulawesi*

Riski Indradewi^{1*}, Suhaeni², dan Andi Safitri Sacita³

^{1,2,3}) Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Cokroaminoto Palopo

^{1*)}indradewiriski@gmail.com

ABSTRAK

Alpukat merupakan tanaman penghasil buah yang dapat diperbanyak secara aseksual melalui sambung pucuk dengan memanfaatkan entris dari pohon induk asalnya untuk memperoleh keseragaman populasi sehingga dibutuhkan entris yang bebas patogen. Seleksi pohon induk melalui identifikasi memungkinkan untuk menghasilkan sumber entris yang bebas dari patogen seperti *Phytophthora* sp. Patogen tersebut merupakan penyebab penyakit pada tanaman alpukat yang serangannya dapat menyebabkan kematian pada tanaman. Tujuan dari penelitian ini yaitu memperoleh metode untuk seleksi awal pada pohon alpukat yang bebas dari patogen *Phytophthora* sp. Metode pada penelitian ini yaitu isolasi mikroorganisme dari pohon alpukat, seleksi isolat secara mikroskopis dan dilanjutkan dengan identifikasi tingkat molekuler menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4. Sampel contoh yang digunakan pada penelitian ini yaitu sebanyak 10% dari populasi alpukat yang ada pada satu perkebunan. Hasil pada penelitian ini yaitu telah diperoleh isolat dari lima pohon alpukat yang digunakan sebagai sampel contoh. Isolat yang diperoleh memiliki kriteria yang menyerupai dengan *Phytophthora* sp. Berdasarkan spora yang dimiliki dan identifikasi lebih lanjut terhadap wilayah *internal transcribed spacer* (ITS) dari isolat tersebut, menunjukkan bahwa isolat yang diperoleh adalah *Phanerochaete* sp. bukan *Phytophthora* sp. Identifikasi suatu patogen seperti *Phytophthora* sp. pada pohon alpukat perlu dilakukan hingga tingkat molekuler untuk mendapatkan bahan tanam bebas penyakit.

Kata kunci: alpukat, entris, identifikasi molekuler, ITS, *Phytophthora* sp.

ABSTRACT

Avocado are fruit-producing plants that can be propagated asexually through shoot grafting by utilizing entries from the original parent tree to obtain population uniformity so that pathogen-free scions are needed. Selection of parent trees through identification makes it possible to produce scions sources that are free from pathogens such as *Phytophthora* sp. This pathogen is the cause of disease in avocado plants, whose attack can cause death of the plant. The aim of this research is to obtain a method for initial selection of avocado trees that are free from the pathogen *Phytophthora* sp. The method in this research is the isolation of microorganisms from avocado trees, microscopic selection of isolates and continued with molecular level identification using ITS 1 and ITS 4 primers. The samples used in this research were 10% of the avocado population on one plantation. The results of this research were that isolates were obtained from five avocado trees which were used as sample samples. The isolate obtained had criteria similar to *Phytophthora* sp. based on the spores possessed and further identification of the internal transcribed spacer (ITS) region of the isolate, it showed that the isolate obtained was *Phanerochaete* sp. not *Phytophthora* sp. Identification of a pathogen such as *Phytophthora* sp. on avocado trees needs to be done at the molecular level to obtain disease-free planting material.

Keywords: Avocado, scion, molecular identification, ITS, *Phytophthora* sp.

PENDAHULUAN

Alpukat merupakan tanaman perkebunan yang memiliki nilai ekonomi karena manfaatnya (Araujo, *et al.*, 2018; Abubakar *et al.*, 2017). Perbanyak

tanaman ini dapat dilakukan secara aseksual melalui sambung pucuk, dengan cara penggabungan dua bagian tanaman sehingga membentuk satu kesatuan yang utuh setelah terjadi regenerasi pada jaringan yang terluka.

Perbanyakan secara aseksual menjadi alternatif dalam perbanyakan tanaman alpukat dalam upaya menghasilkan bibit yang identik dengan tetuanya. Teknik perbanyakan ini menjadi primadona dikalangan penyedia bibit tanaman alpukat karena mudah dan murah untuk dilakukan serta memungkinkan untuk memperoleh keseragaman populasi bibit alpukat dalam jumlah banyak (Tripathi dan Karunakaran, 2019; Simon dan Elsa, 2013).

Perbanyakan secara aseksual melalui sambung pucuk berpotensi membawa patogen dari tetua yang digunakan sebagai sumber entris. Penyakit pada tanaman alpukat yang berpotensi menular dari pohon induknya yaitu penyakit busuk akar dan kanker batang yang disebabkan oleh patogen *Phytophthora* sp. (Pardon, *et al.*, 2018; Gonzalez, *et al.*, 2019). Keberadaan *Phytophthora* sp. pada tanaman mencapai tingkat jaringan tanaman sehingga pohon atau ranting yang terlihat sehat secara morfologi memiliki potensi membawa patogen (Hernandes, *et al.*, 2023).

Seleksi pohon alpukat untuk dijadikan sebagai sumber entris, pada umumnya dilakukan melalui pemilihan pohon alpukat yang terlihat sehat secara morfologi. Cara ini memiliki kelemahan karena tidak bisa mengidentifikasi adanya spora cendawan

penyebab penyakit pada tanaman. Untuk itu, perlu adanya metode seleksi awal terhadap pohon alpukat yang akan digunakan sebagai sumber entris melalui identifikasi (Girano, 2019; Hernandez, *et al.*, 2023).

Identifikasi patogen *Phytophthora* sp. telah banyak dilakukan pada tanaman buah, dan masih sangat terbatas untuk tanaman alpukat khususnya di perkebunan alpukat yang berada di Desa Cakaruddu, Kabupaten Luwu Utara, Provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia. Identifikasi keberadaan patogen *Phytophthora* sp. yang akan dilakukan pada penelitian ini yaitu secara mikrokopis dan molekuler. Identifikasi hingga tingkat molekuler perlu dilakukan karena sporangium *Phytophthora* sp. memiliki kemiripan dengan *Phanerochaete* sp. Alternatif dari kondisi tersebut yakni dengan melakukan identifikasi hingga tingkat molekuler (Susanti, *et al.*, 2015; Wanjiku, *et al.*, 2020).

Identifikasi patogen pada tanaman alpukat dengan pendekatan molekuler memungkinkan untuk mendeteksi keberadaan *Phytophthora* sp. secara tepat dengan mengamati wilayah *internal transcribed spacer* (ITS) patogen *Phytophthora* sp. Identifikasi dengan pendekatan ini dilakukan melalui teknik *Polimerase Chain Reaction* (PCR) untuk

melipat gandakan suatu fragmen DNA tertentu dengan menggunakan primer yang dirancang khusus untuk amplifikasi daerah ITS patogen target. Primer merupakan fragmen DNA yang terdiri atas beberapa urutan pasang basa. Sekuen ini digunakan untuk mengawali suatu sintesis rantai DNA. Untuk itu, Sekuen nukleotida yang digunakan harus sesuai dengan bagian dari DNA yang akan digandakan (Mulyatni, dkk., 2011; Indradewi, dkk., 2020; Scanu *et al.*, 2021).

Pendekatan pemecahan masalah yang akan dilakukan pada penelitian ini yakni dengan cara melakukan identifikasi isolat yang berasal dari pohon alpukat secara mikroskopis dan molekuler sehingga diperoleh pohon alpukat bebas dari patogen *Phytophthora* sp. Kelebihan dari rangkaian deteksi dengan cara ini yakni bisa membedakan suatu organisme secara spesifik. Tujuan dari penelitian ini yakni untuk memperoleh metode seleksi awal pada pohon alpukat yang bebas dari patogen *Phytophthora* sp.

METODOLOGI PENELITIAN

Tempat dan Waktu

Pengambilan sampel entris dilakukan di Desa Cakaruddu, Kab. Luwu, Sulawesi Selatan. Dilanjutkan dengan pengamatan di Laboratorium Terpadu Fakultas Pertanian

Universitas Cokroaminoto Palopo yang dilaksanakan pada bulan Juli - November 2023.

Bahan dan Alat

Penelitian ini menggunakan bahan berupa entris dari pohon alpukat, media PDA, antibiotik, Alkohol 70%, aquades, *metilen blue*, DNA Genome hasil isolasi, kit DNA extraction, kit Amplification PCR, Primer ITS 1 dan Primer ITS 4. Analisis kualitas dan kuantitas produk hasil PCR menggunakan agarose 1%. Alat yang digunakan yaitu Cawan petri, Objeck glass, kaca preparasi, Mikroskop Cahaya, Mesin PCR (Thermocycler gradient TC 5000, USA), Sentrifugasi (Hettich Mikro 200R, Germany), dan DNA Elektroforesis (Mupid), serta beberapa software pendukung lainnya.

Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Metode pengumpulan informasi dilakukan dengan cara observasi langsung dan melakukan studi pustaka untuk menarik kesimpulan.

Prosedur Penelitian

Sampel berupa ujung tangkai muda dari pohon alpukat dipotong menggunakan gunting dan dimasukkan kedalam wadah sampel yang telah melalui proses sterilisasi dan selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Sampel yang telah bebas dari daun, dicuci bersih menggunakan aquades steril. Sampel dipotong menggunakan pisau steril. Sampel berukuran 2 cm disterilkan menggunakan alkohol 70% selama 30 detik. Selanjutnya sampel diinokulasi pada media PDA yang telah mengandung antibiotik dan diinkubasi selama 7 hari. Selanjutnya dilakukan seleksi isolat dengan mengamati alat reproduksi dari patogen dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan pewarnaan *metilen blue*.

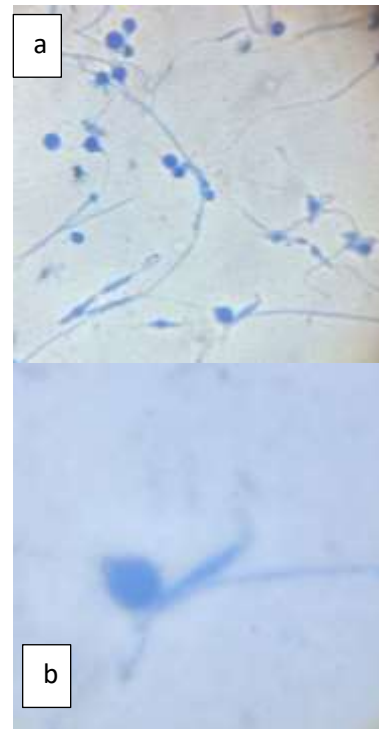
Isolat yang dipilih untuk identifikasi lebih lanjut yakni isolat yang memiliki kriteria secara mikroskopis mirip dengan patogen target. Selanjutnya isolat target, diremajakan dan dinkubasi selama 7 hari untuk selanjutnya dilakukan isolasi DNA genome dengan mengikuti prosedur dari kit yang digunakan.

Gen target diamplifikasi menggunakan primer ITS1 dan ITS4, dengan tahapan yaitu pra amplifikasi 3 menit pada suhu 95 °C, denaturasi 15 detik suhu 95 °C, penempelan primer 30 detik suhu 52 °C, tahap sintesis 1 menit pada suhu 72 °C, tahap pasca amplifikasi 2 menit pada suhu 72 °C. Reaksi PCR yang dilakukan pada penelitian ini yaitu sebanyak 35 siklus. Produk PCR selanjutnya di elektroforesis menggunakan agarose 1% dan sekuensing. Data hasil

penelitian di analisis menggunakan software Bioedit dan *tools balst* yang ada di NCBI serta software pendukung lainnya untuk membuat pohon *phylogeny*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah berhasil memperoleh isolat dari lima pohon alpukat yang dijadikan sebagai contoh sampel. Isolat tersebut telah berhasil identifikasi pada tingkat mikroskopisnya (Gambar 1a dan 1b).



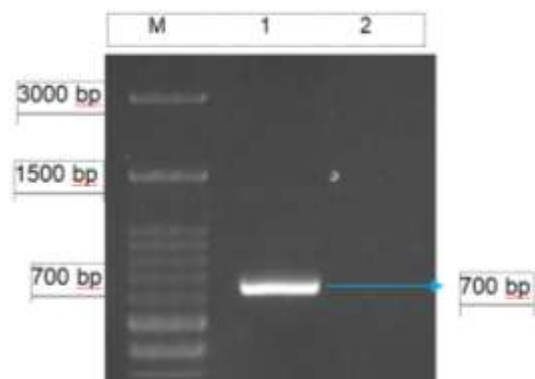
Gambar 1. Sporangia dan klamidospora pada pembesaran 40x (a) dan 100x (b)

Berdasarkan hasil identifikasi pada tingkat mikroskopis isolat menggunakan mikroskop diperoleh sporangium dan kamidiospora yang menyerupai alat reproduksi patogen *Phytophthora* sp. (Scanu, 2021; Umayah & Perwantara, 2006).

Sporangia *Phytophthora* sp. pada umumnya yaitu berbentuk ovoid, dan beberapa bentuk lain, mempunyai papilla yang jelas (Stamps *et al.*, 1990). Isolat yang memiliki ciri *Phytophthora* sp. berasal dari pohon alpukat sampel pertama, kedua dan ketiga. Pohon alpukat keempat dan kelima tidak menunjukkan adanya spora target. Selain itu, hasil penelitian lainnya menunjukkan adanya kemiripan sporangium dan klamidospora dari isolate yang diperoleh pada penelitian ini dengan *Phanerochaete* sp. (Susanti, *et al.*, 2015).

Isolat yang mempunyai kriteria *Phytophthora* sp. selanjutnya diidentifikasi hingga tingkat molekulernya dengan mengamati wilayah ITS Isolat. Wilayah tersebut pada penelitian ini diamplifikasi dengan menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4. Adapun hasil amplifikasi yang diperoleh yakni berupa produk PCR yang memiliki ukuran pita mencapai 700 bp (Gambar 2). Hasil tersebut menunjukkan bahwa daerah ITS dari isolat telah berhasil diperoleh dan dilanjutkan untuk di sekuensing. Hasil sekuensing selanjutnya dianalisis dan diblast untuk melihat perbandingan suatu sekuen nukleotida yang dimiliki dengan nukleotida yang ada di data Base. Berdasarkan hasil blastn diperoleh *percentage identity* sebesar 99,84% pada *Phanerochaete* Sp. Nilai ini,

mengambarkan suatu persentase yang menunjukkan seberapa sesuai antara sekuen DNA yang telah ada pada data base dengan sekuen yang dimasukkan dalam hal ini adalah sekuen yang diperoleh dari hasil penelitian ini. Berdasarkan hasil blastn menunjukkan bahwa isolate tersebut merupakan *Phanerochaete* Sp. Untuk sampel mikroorganisme, jika menggunakan marka molekuler, dapat dikatakan identikal (similar) pada level spesies jika nilai “*percentage identity*” nya diatas 97.5%, dan pada level genus jika nilai “*percentage identity*” nya diatas 95% (Stackebrandt and Goebel, 1994; Indradewi dkk., 2022).

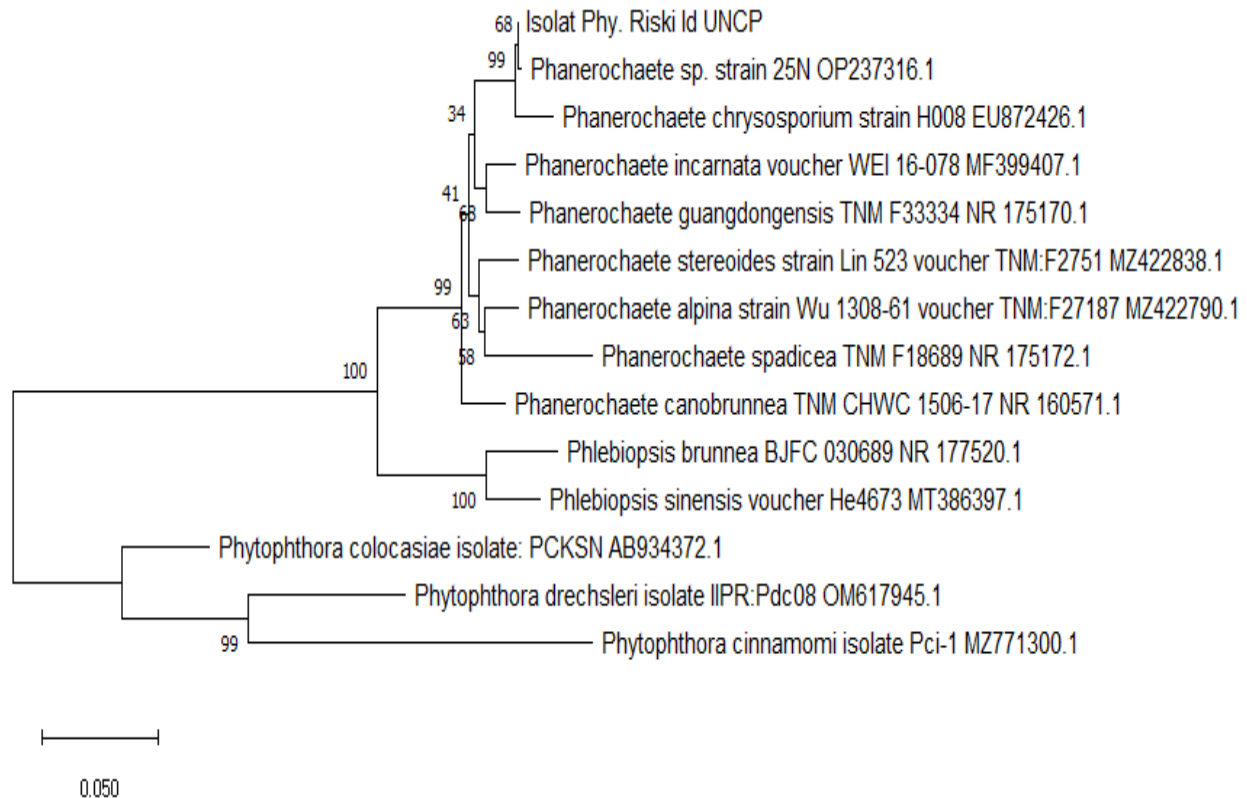


Gambar 2. Hasil amplifikasi ITS-DNA. penanda DNA 1 kb (M), produk PCR dari isolat pohon alpukat (1), kontrol negatif (2).

Sekuen nukleotida yang diperoleh dari hasil penelitian ini selanjutnya digunakan untuk konstruksi pohon filogenetik menggunakan software MEGA (Gambar 3). Berdasarkan pohon filogenik yang

dihasilkan, menunjukkan bahwa isolate yang diperoleh dari hasil penelitian ini berkerabat dekat dengan *Phanerochaete* dan bahkan cenderung sebagai spesies yang sama. Hal

ini, berdasarkan nilai jarak genetik antara dua organisme yang semakin sedikit sehingga semakin dekat hubungan kekerabatan keduanya (Tallei *et al.*, 2016).



Gambar 3. Konstruksi pohon filogenetik

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yakni tidak ditemukan adanya patogen *Phytophthora* sp. pada pohon alpukat yang menjadi sampel contoh. Adapun metode seleksi awal yang dapat dilakukan yakni dengan mengamati morfologi dan wilayah ITS dari isolat.

Saran

Seleksi pohon alpukat perlu dilakukan hingga tingkat molekuler untuk mendapatkan bahan tanam bebas penyakit khususnya yang disebabkan oleh mikroorganisme.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Kemenristekdikti yang telah memberikan dana penelitian melalui Hibah

Penelitian Dosen Pemula untuk anggaran tahun 2023.

DAFTAR PUSTAKA

- Girano, I.A., Rosa, D.R., Herrera, C.J.L. (2019). Identification, pathogenicity and distribution of the causal agents of dieback in avocado orchards in Spain. *Journal of Agricultural Research*. Vol 17(1).
Doi: <https://doi.org/10.5424/sjar/2019171-13561>.
- Gonzales, E. I.S., Soto, J.G.G., Saenz, E.O., Diez, A.G. Priego, A.F.B., Ascencio, S.O. (2019). Screening progenies of mexican race avocado genotypes for resistance to *Phytophthora cinnamomi* rands *JOURNAL HORTSCIENCE*. Vol. 54 (5) :809-813.
Doi:<https://doi.org/10.21273/HORTSCI13552-18>
- Hernandez, D., Perez, O.G., Perera, S. Carracedo, M.A.G., Siverio, F. (2023). Fungal pathogens associated with aerial symptoms of avocado (*Persea americana* Mill.) in Tenerife (Canary Islands, Spain) focused on species of the family Botryosphaeriaceae. *Journal Microorganisms*. Vol.11 (3): 585.
Doi:[10.3390/microorganisms11030585](https://doi.org/10.3390/microorganisms11030585).
- Inradewi, R., Saksono, B. dan Miftahudin. (2017). *Isolasi, Kloning, dan Eksresi Gen DPE dari Agrobacterium tumefaciens sebagai Gen Penyandi Enzim D-Psicose 3-Epimerase (DPEase)*. [Tesis].
<https://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/91476>.
- Inradewi R, Saksono B., Damayanti S. (2022). Teknik design primer untuk tujuan kloning gen dari *Agrobacterium tumefaciens*. *Perbal: Jurnal Pertanian Berkelanjutan*. Vol.10 (3): 2302-6944.
Doi: <https://doi.org/10.30605/perbal.v10i3.2090>.
- Mulyatni, A.S., Priyatmojo, A., Purwantara, A. (2016). Sekuen internal transcribed spacer (ITS) DNA ribosomal *oncobasidium theobromae* dan jamur sekerabat pembeding. Internal transcribed spacer (ITS) sequences of ribosomal DNA *Oncobasidium theobromae* and other related fungi as comparison. *Jurnal Menara Perkebunan*. Vol. 79 (1).
<https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v79i1.75>.
- Pardon, C.R., Siverio, F. Sierra, A.P., Rodrigue, A. (2018). Isolation and pathogenicity of *Phytophthora* species and *Phytophthora vexans* recovered from avocado orchards in the Canary Islands, including *Phytophthora niederhauserii* as a new pathogen of avocado. *Journal Phytopathologia Mediterranea*. Vol. 57 (1): 89–106.
DOI:10.14601/Phytopathol_Mediterr-22022.
- Scanu, B., Jung, T., Masigol, H., Linaldeddu, B.T., Jung, M.H., Brandano, A., Ghalamfarsa, R.M., Janousek, J., Riolo, M., Cacciola, S.O. (2021). *Phytophthora heterospora* sp. nov., a New Pseudoconidia-Producing Sister Species of *P. palmivora*. *Journal Fungi*. Vol. 7 (870). Doi:[10.3390/jof7100870](https://doi.org/10.3390/jof7100870).
- Simon A. and Elsa S. (2013). Effect of diagonal cut surface length on graft success and growth of *Mangifera indica*, *Persia americana*, and *Prunus persica*. *Journal Hort Technology*. 48(4):481–484. 2013.
DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.4.481>.
- Stackebrandt, E. and Goebel, B. (1994). Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 44, 846-849.
<http://dx.doi.org/10.1099/00207713-44-4-846>.
- Stamps, D.J., G.M. Waterhouse, F.J. Newhook, G.S. Hall. (1990). *Revised tabular key to the species of the Phytophthora*. CAB London, International Mycological Institute. Mycological Paper 162. 128 pp.

- Susanti, E., Suharjono, Ardyanti, T., Aulani. (2015). Phylogenetic analysis of *Phanerochaete chrysosporium* ITB isolate using internal transcribed spacer (ITS) sequence. *Journal of ChemTech Research*. Vol.8 (6): 654-658.
- Tallei, T.E., Rembet, R.E., Pelealu, J.J., Kolondam, B.J. (2016). Sequence variation and phylogenetic analysis of *Sansevieria trifasciata* (Asparagaceae). *Journal Bioscience Research*. Vol. 13 (1): 01-07.
- Tripathi PC, and Karunakaran G. (2019). Standardization of time and method of propagation in avocado. *Journal of Applied Horticulture*. Vol. 21 (1): 67-69.
- DOI:<https://doi.org/10.37855/jah.2019.v21i01.12>.
- Umayah, A., dan Purwantara, A. (2016). Identifikasi isolat *Phytophthora* asal kakao. Identification of isolates of *Phytophthora* from cocoa. *Jurnal Menara Perkebunan*. Vol. 74 (2). <https://doi.org/10.22302/iribb.jur.mp.v74i2.108>.
- Wanjiku EK, Waceke JW, Wanjala BW, Mbaka JN. (2020). Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in Kenya. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2020/4063697>.