

Buku Terjemahan



Panduan Praktis Deteksi dan Identifikasi Spesies *Phytophthora*

Versi 1.0

(Practical Guide for Detection and Identification of Phytophthora)



Penerjemah:
Muhammad Junaid
André Drenth & Barbara Sendall
CRC for Tropical Plant Protection
Brisbane Australia



Buku Terjemahan
**Panduan Praktis Deteksi
dan Identifikasi Jenis *Phytophthora***
versi 1.0

*(Practical Guide for Detection and
Identification of *Phytophthora*)*

Buku Terjemahan

**Panduan Praktis Deteksi dan
Identifikasi Jenis *Phytophthora***

versi 1.0

***(Practical Guide for Detection and
Identification of Phytophthora)***

André Drenth & Barbara Sendall

Penerjemah:

Muhammad Junaid

Penerbit



UPT Unhas Press

**Panduan Praktis Deteksi dan
Identifikasi Jenis *Phytophthora***
versi 1.0

*Practical Guide for Detection and
Identification of Phytophthora*

Penulis:

André Drenth & Barbara Sendall

Penerjemah:

Muhammad Junaid

Penerbit:

UPT Unhas Press

Keanggotaan:

IKAPI No.002/SSL/01 dan APPTI

Alamat Penerbit:

Gedung UPT Unhas Press
Kampus Unhas Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan Km.10
Telepon: 0411 – 8997706
HP/WA 082299555591
e-mail: unhaspress@gmail.com
Laman: unhaspress.unhas.ac.id
Makassar

ISBN:

Cetakan I, 2021

Hak Cipta © André Drenth & Barbara Sendall *All rights reserved*. Hak cipta dilindungi undang-undang.

Dilarang memperbanyak, mencetak dan menerbitkan sebagian atau seluruh isi buku ini dengan cara dan bentuk apapun tanpa seizin penulis dan penerbit.

Kata pengantar

Buku yang sedang anda baca adalah buku panduan yang disusun sebagai langkah awal untuk membantu mengenali dunia *Phytophthora*. Buku ini mungkin masih belum lengkap dan komprehensif, tetapi buku ini disusun untuk membantu pembaca untuk mengenal lebih dalam dasar-dasar identifikasi penyakit *Phytophthora*, memberikan petunjuk dalam persiapan media selektif, serta tips tentang isolasi dan pemeliharaan *in vitro* *Phytophthora*. Buku ini juga memberikan metode dan prosedur dasar dalam identifikasi berbagai spesies *Phytophthora* dengan menggunakan serangkaian karakter morfologi secara spesifik. Buku panduan ini disusun sebagai manual kerja dan pelatihan pada proyek PHT / 1996/193 “Survei keberadaan dan pentingnya *Phytophthora* di Asia Tenggara” yang didanai oleh Pusat Penelitian Pertanian Internasional Australia (ACIAR). Oleh sebab itu, buku ini terbatas hanya membahas delapan spesies *Phytophthora* yang paling umum ditemukan di Asia Tenggara.

Buku ini dapat dikatakan semacam buku panduan praktis untuk kegiatan di laboratorium. Buku ini tidak memberikan informasi terkait dengan penemuan baru atau pengendalian

dalam dunia mikologi. Buku ini diharapkan membantu pemahaman dasar mahasiswa dan peneliti bidang penyakit tanaman terkait pengetahuan spesies *Phytophthora*. Buku ditulis berdasarkan pengalaman kami yang menggeluti spesies *Phytophthora* dan menyadari betapa menariknya dunia *Phytophthora* ini. Untuk detail dan deskripsi lebih dalam mengenai semua spesies *Phytophthora* dan biologinya kami merekomendasikan anda untuk mengacu pada buku “*Phytophthora diseases worldwide*” yang ditulis oleh Donald Erwin dan Olaf Ribeiro (1996). Buku tersebut berisi deskripsi semua spesies *Phytophthora* dan sebagian besar informasi mengenai penyakit tanaman yang disebabkan oleh *Phytophthora*.

Buku panduan spesies *Phytophthora* ini adalah draft pertama dan apabila ada kekurangan maka itu adalah tanggung jawab dari penulis. Oleh sebab itu, kami sangat mengapresiasi jika ada komentar dan masukan untuk pengembangan buku ini ke depan dan tips untuk didistribusikan kepada para penggiat *Phytophthora*.

André Drenth and Barbara Sendall

Brisbane, June 2001

CRC for Tropical Plant Protection

Indooroopilly Research Centre

Plant Pathology Building

80 Meiers Road

Indooroopilly QLD 4068

Australia

Email: a.drenth@uq.edu.au

♥ Copyright: No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, transmitted, in any form or any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the authors.

Kata pengantar

Buku yang anda sedang baca adalah buku hasil terjemahan kedalam bahasa Indonesia dari buku aslinya 'Practical guide for detection and identification of *Phytophthora*' dikarang oleh André Drenth dan Barbara Sendall.

Saya ingin berterima kasih setinggi-tingginya kepada André Drenth atas dukungan penerjemahan buku panduan ini kedalam bahasa Indonesia. Saya juga sekaligus ingin memohon maaf atas keterlambatan penyelesaian terjemahan buku ini, sebab seharusnya buku ini sudah diterbitkan awal tahun 2019 lalu sejak penulis mengirimkan draft aslinya ke penerjemah.

Terbilang unik karena awalnya buku terjemahan versi bahasa dimaksudkan hanya untuk kalangan terbatas yaitu mahasiswa bimbingan penelitian, pengalihbahasaan dari beberapa bagian buku saja guna membantu memahami secara cermat prosedur kerja fokus penelitian *Phytophthora* pada tanaman talas. Tetapi, keberuntungan berbicara lain.

Secara kebetulan penerjemah dan penulis buku ini bertemu di Makassar. Penulis buku ini adalah André Drenth yang terafiliasi dengan University of Queensland berkunjung ke Fakultas Pertanian

Universitas Hasanuddin tahun 2019 silam dengan maksud menelusuri penyakit layu pisang pada beberapa lokasi di Sulawesi Selatan.

Bermula dari komunikasi dengan kompatriot saya di Sydney Uni Australia, (kandidat) Doktor Gandja Rai yang sama-sama dibimbing oleh Prof. David Guest sedang menekuni *Phytophthora capsici* penyebab penyakit tanaman cabai di Nepal dimana keluarganya berada. Penerjemah meminta bantuannya untuk mengirimkan literatur *Phytophthora*. David Guest dan André Drenth adalah ilmuwan yang sama sama menggeluti bidang penyakit tanaman memiliki hubungan kedekatan.

Pendeknya, saya senang sekali dengan literatur yang dikirim (bentuk pdf) dan melihat penulis buku tersebut adalah Prof. André Drenth. Saya mencoba mengirimkan Email ke penulis dengan maksud menyampaikan jika telah memperoleh buku penuntun melalui kolega di Sydney Uni. Yang membuat lebih gembira lagi adalah penulis mengirimkan draft aslinya (format word), dengan maksud memudahkan dalam penerjemahan, dan mengijinkan buku ini diterjemahkan secara keseluruhan. Semoga buku ini dapat menambah koleksi Perpustakaan di University of Queensland Australia dan di Universitas Hasanuddin, Makassar.

Salah satu alasan utama menerjemahkan buku ini antara lain adalah buku ini sangat dibutuhkan oleh para mahasiswa, praktisi, peneliti bidang ilmu penyakit tumbuhan dimana keragaman jenis tanaman pertanian dan pohon tinggi, iklim basah dan lembab dan lahan pertanian, perkebunan dan kehutanan membentang luas di Indonesia adalah 'surga' tempat bagi spesies *Phytophthora*. Laporan kehilangan hasil dan kerusakan tanaman pertanian, perkebunan dan kehutanan secara signifikan terjadi terus menerus. Seperti yang telah dijelaskan oleh penulis dalam buku ini, spesies *Phytophthora*

memiliki kisaran inang yang sangat luas, tidak hanya menyerang jenis tanaman-tanaman dalam satu famili tetapi juga menyerang jenis tanaman berbeda famili. Karena dilengkapi secara alami sistem reproduksi seksual dan aseksual, *Phytophthora* mampu menghasilkan generasi baru yang super cepat dan melimpah mempengaruhi secara genetik tingkat kemampuan menimbulkan gejala penyakit (virulensi) yang sangat tinggi. Meskipun tanaman tahan awalnya, secara terus menerus ditanam secara monokultur, ketahanan tanaman runtuh. Patogen dari golongan *Phytophthora* ini memiliki spora aktif (yang tidak banyak dimiliki oleh patogen lain) yang dilengkapi dengan sedikitnya sepasang kaki gerak yang digunakan untuk mencapai jaringan perakaran tanaman. Sisanya, spora yang tidak aktif dipencarkan dengan bantuan angin dan juga hewan pembawa lainnya seperti serangga semut dan kumbang dan jenis siput. Maka sangat wajar jika infeksi tanaman inang menimbulkan kerusakan dan kerugian yang sangat berarti.

Kerugian yang ditimbulkan oleh spesies *Phytophthora* penyebab penyakit pada komoditas kakao di dunia, spesies patogen yang dikenal sebagai *pantropical* patogen tidak dapat diragukan lagi. Dari sekian banyak penyebab penyakit kakao seperti spesies patogen Ascomycetes dan Basidiomycetes, spesies *Phytophthora* menempati urutan tertinggi dengan tingkat kehilangan hasil mencapai 700.000 ton yang dilaporkan tahun 2012 dan akan terus berlanjut. Belum termasuk komoditas lainnya seperti komoditas kentang yang diinfeksi oleh *P. infestans* yang memiliki hubungan sejarah kelam, penyebab kelaparan di Eropa Abad XIX silam.

Sejalan dengan tujuan penulisan buku ini, penyebarluasan pengetahuan dunia *Phytophthora* untuk kegiatan penelitian dan pengendalian penyakit tanaman menjadi sangat penting. Buku dengan versi bahasa ini akan sangat membantu mempercepat

pemahaman kepada mahasiswa, peneliti dan praktisi pertanian lainnya di Indonesia khususnya.

Penerjemah,
Muhammad Junaid

Program Study Agroteknologi
Departemen Hama & Penyakit Tanaman,
Fakultas Pertanian, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan KM 10 Tamalanrea, 90245. Makassar,
South Sulawesi Indonesia
muhammad.junaid@agri.unhas.ac.id

Daftar isi

Kata pengantar Penulis ___ v

Kata pengantar Penerjemah ___ vii

1. Pengantar genera Phytophthora ___ 1
 - 1.1. GENUS PHYTOPHTHORA ___ 1
 - 1.2. EVOLUSI KEKERABATAN ___ 2
 - 1.3. BIOLOGI ___ 3
 - 1.3.1. Siklus hidup ___ 3
 - 1.3.2. Kisaran inang ___ 4
 - 1.3.3. Sistem reproduksi seksual ___ 5
 - 1.4. SISTEMATIKA PHYTOPHTHORA ___ 6
 - 1.5. PATOGENISITAS PHYTOPHTHORA ___ 7
 - 1.5.1. Gejala busuk akar ___ 9
 - 1.5.2. Gejala busuk pangkal batang ___ 9
 - 1.5.3. Gejala kanker batang ___ 10
 - 1.5.4. Gejala bercak batang ___ 10
 - 1.5.5. Gejala busuk bongkol atau tunas ___ 11
 - 1.5.6. Gejala hawar daun ___ 11
 - 1.5.7. Busuk buah ___ 12
 - 1.5.8. Busuk umbi talas (taro) dan kentang ___ 13

2. Media tumbuh dan penambahan antibiotik untuk isolasi Phytophthora dari jaringan tanaman sakit dan tanah ___ 15
 - 2.1. MEDIA DASAR UNTUK ISOLASI DARI JARINGAN TANAMAN SAKIT ___ 16
 - Media jus V8 ___16
 - Media jus V8 agar untuk pertumbuhan dan pemeliharaan biakan Phytophthora ___ 17
 - Media larutan jus V8 agar – Isolasi Phytophthora dari jaringan tanaman sakit ___17
 - Media tepung jagung agar atau Cornmeal agar (CMA) ___ 17
 - 2.2. MEDIA SELEKTIF UNTUK ISOLASI PHYTOPHTHORA DARI TANAMAN SAKIT ___ 18
 - Media 3-P (Eckert dan Tsao 1960, 1962) ___ 19
 - Media P₁₀VP (Tsao dan Ocana 1969) ___ 20
 - P₁₀ARP Medium (Kannwischer and Mitchell 1978) ___ 21
 - Media P₅ARP (Jeffers and Martin 1986; Papavizas et al. 1981) ___ 21
 - Media Hymexazol yang dimodifikasi (Masago et al. 1977) ___22

3. Deteksi dan isolasi Phytophthora dari jaringan sakit dan dari tanah ___25
 - 3.1. SELEKSI SAMPEL UNTUK ISOLASI PHYTOPHTHORA ___26
 - 3.2. ISOLASI PHYTOPHTHORA DARI JARINGAN TANAMAN SAKIT ___26
 - 3.2.1. Persiapan dan sterilisasi permukaan jaringan sakit ___28
 - 3.2.2 Isolasi Phytophthora dari tanaman sakit melalui umpan buah kakao (metode Chee dan Foong, 1968) ___30

- 3.3. ISOLASI PHYTOPHTHORA DARI TANAH ___ 30
 - 3.3.1. Deteksi dan isolasi Phytophthora melalui umpan dari tanah ___ 32
- 3.4. PEMELIHARAAN BIAKAN ___ 33
- 3.5. UMPAN PHYTOPHTHORA DARI TANAH DENGAN PENGAPUNGAN TOGE ___ 36
- 3.7. PEMELIHARAAN DAN PENYIMPANAN PHYTOPHTHORA ___ 38
 - 3.7.1. Media biakan ___ 38
 - 3.7.2. Pemeliharaan dengan air steril untuk menyimpan lama biakan ___ 39
 - 3.7.3. Pemeliharaan dengan nitrogen cair untuk menyimpan lama biakan ___ 40
 - 3.7.4. Petunjuk penyimpanan dengan nitrogen cair ___ 40
- 4. Identifikasi spesies Phytophthora ___ 43
 - 4.1. BIAKAN ___ 45
 - 4.2. KARAKTER MORFOLOGI ___ 46
 - 4.3. KANTUNG SPORA ___ 46
 - 4.4. SPORA ISTIRAHAT DAN PEMBENGGKAKAN HIFA ___ 50
 - 4.5. STRUKTUR SEKSUAL ___ 51
 - 4.6. PERBEDAAN ANTARA PYTHIUM DAN PHYTOPHTHORA ___ 52
 - 4.7. DAFTAR ISTILAH-ISTILAH ___ 53
 - Phytophthora cinnamomi ___ 55
 - Phytophthora citrophthora ___ 55
 - Phytophthora colocasiae ___ 55
 - Species ___ 57
 - Species ___ 57
 - 4.8. MEDIA BIAKAN ___ 59
 - 4.8.1. Agar wortel ___ 59
 - 4.8.2. Agar kaldu kacang Lima ___ 59

- 4.8.3. Agar ekstrak kacang ___59
- 4.8.4. Larutan garam Chen dan Zentmyer (1970)___60

- 5. Uji inokulasi Phytophthora ke jaringan tanaman___ 61
 - 5.1. INOKULASI KANTUNG SPORA KE JARINGAN DAUN
ATAU BUAH___63
 - 5.2. PENYISIPAN MISELIUM KEDALAM BATANG BIBIT___64
 - 5.3. INOKULASI KEDALAM POHON DEWASA___64
 - 5.4. INOKULASI KE TANAH___65

- 6. Daftar Pustaka___67

Pengantar genus *Phytophthora*

1.1. Genus *Phytophthora*

Phytophthora de Bary 1887 termasuk patogen kosmopolitan dari genus Oomycetes yang bersifat obligat dan mempunyai sekitar 60 spesies tanaman inang (Erwin dan Ribeiro 1996). Spesies *Phytophthora* memiliki kisaran inang yang luas, menginfeksi berbagai jenis tanaman, serta tercatat sebagai penyebab penyakit tanaman yang paling merusak di dunia, sebagai contoh, *P. infestans* yang telah menyebabkan kegagalan panen kentang berdampak pada kelaparan di Eropa abad XIX (Bourke 1964). Penyakit yang disebabkan oleh *Phytophthora* telah dipelajari dengan baik di berbagai negara beriklim sedang. Sedangkan pada negara-negara beriklim tropis basah, penyakit tanaman yang disebabkan oleh *Phytophthora* menyebabkan kerugian yang sangat signifikan pada tanaman buah-buahan seperti busuk akar, busuk pangkal batang, kanker batang, hawar daun dan busuk buah. Sebagai contoh bahwa satu spesies *P. palmivora* mampu menyebabkan kerusakan parah

pada berbagai jenis tanaman inang, misalnya busuk buah, busuk akar dan kanker batang pada tanaman kakao; busuk buah dan busuk akar pepaya; busuk akar dan hawar pepaya; busuk kuncup kelapa sawit; bercak bergaris hitam tanaman karet; busuk buah dan kanker batang tanaman durian.

1.2. Evolusi kekerabatan

Phytophthora digolongkan kedalam Ordo Peronosporales, Kelas Oomycetes pada Kerajaan Chromista (Hawksworth *et al.* 1995; van de Peer *et al.* 1996). Lebih detail disajikan pada Tabel 1.1. Kelas Oomycetes sendiri mencakup empat ordo; dua diantaranya adalah Saprolegniales dan Peronosporales yang dikenal luas berperan sebagai patogen penting tanaman. Dua ordo lainnya yang mencakup organisme tergolong kedalam kelompok kecil yang umumnya menyerupai jamur air. Pada Peronosporales, famili Pythiaceae memiliki sejumlah genera yang terkenal antara lain *Phytophthora* dan *Pythium*. Genus *Phytophthora* dan *Pythium* sendiri lebih dari 120 spesies (van der Plaats-Niterink 1981).

Table 1.1. Klasifikasi Oomycetes menurut Hawksworth *et al.* (1995).

Kingdom	Kelas	Ordo	Famili	Genus
Straminopila	Oomycetes	Lagenidiales		
(sebelumnya Chromista)		Leptomitales		
		Saprolegniales	Saprolegniaceae	<i>Achlya</i>
		Peronosporales	Pythiaceae	<i>Pythium</i>
				<i>Phytophthora</i>
			Peronosporaceae	<i>Bremia</i>
				<i>Peronospora</i>
			Albuginaceae	<i>Albugo</i>

1.3. Biologi

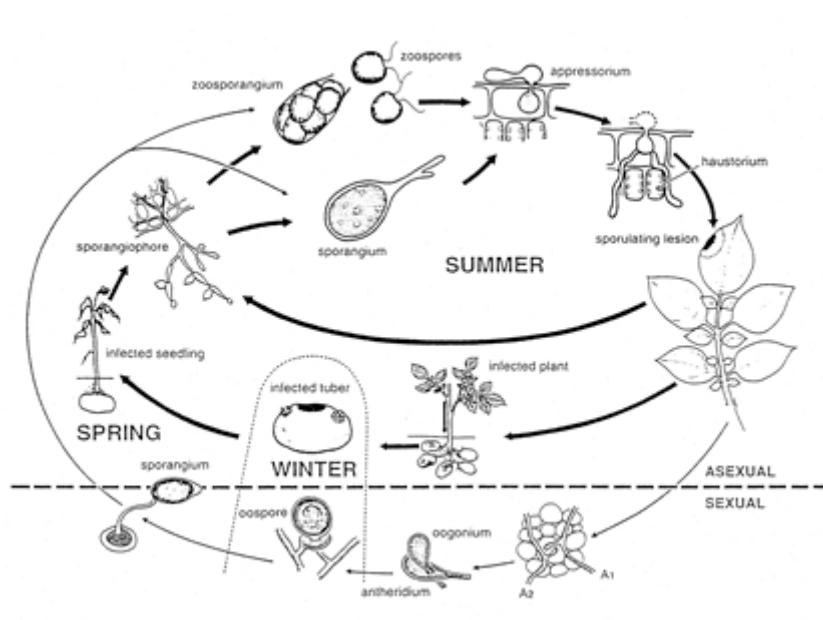
Genus Oomycetes memiliki banyak persamaan ciri ekologi dan sejarah kehidupan dengan cendawan sejati. Akan tetapi, genus Oomycetes dan kelompok cendawan sejati kemudian dibedakan ke dalam genus Basidiomycetes dan Ascomycetes berdasarkan karakter genetik dan mekanisme reproduksinya (Erwin dan Ribeiro 1996). Sebelumnya genus Oomycetes ditempatkan kedalam kerajaan Chromista (Cavalier-Smith 1986) karena didukung oleh sebagian besar karakteristiknya, termasuk variasi dalam jalur metabolisme (Elliott 1983; Hendrix 1970; Wang dan Bartnicki-Garcia 1973), memiliki kandungan dinding sel yang tersusun dari polimer-polimer beta-glukan lebih besar daripada kitin (Bartnicki-Garcia dan Wang 1983), menghasilkan *heterokont* spora aktif (Desjardins *et al.* 1969), dan sebagian besar siklus hidupnya berada pada tahap diploid (Erwin dan Ribeiro 1996).

1.3.1. Siklus hidup

Satu siklus hidup *Phytophthora* dapat melibatkan tiga spora aseksual dan spora seksual yang terbentuk (Gambar 1.1). Miselium vegetatif diploid menghasilkan kantung spora (sporangia) aseksual yang dapat berkecambah secara langsung, atau berdiferensiasi menghasilkan 8-32 spora aktif (zoospora) yang masing-masing melewati siklus pemencaran dan pembelahan sebelum perkecambahan. Beberapa spesies, seperti *P. cinnamomi*, klamidospora aseksual juga dihasilkan dari miselium. Sementara oospora dihasilkan dari reproduksi seksual. Semua tipe spora berpotensi infeksi, dan klamidospora dan oospora juga berfungsi sebagai struktur istirahat dan pertahanan saat musim dingin.

Seluruh spesies *Phytophthora* bersifat patogen tular tanah yang memiliki fase istirahat seperti pada spesies *P. sojae* dan *P.*

palmivora. *P. sojae* berpencah melalui tanah dan melepaskan spora aktif (zoospora) dari jaringan tanaman yang diinfeksi. *P. palmivora* dapat terpencah melalui udara di atmosfer khususnya kantung spora yang terpisah dari tangkainya (*caducous*).



Gambar 1.1. Siklus hidup *Phytophthora infestans*.
 Dipublikasi kembali oleh Drenth (1994)

1.3.2. Kisaran inang

Tingkat spesifitas inang spesies *Phytophthora* sangat beragam. *P. fragariae* var. *rubi* misalnya hanya menginfeksi satu jenis tanaman inang (Kennedy dan Duncan 1995), sedangkan *P. cinnamomi* mampu menyerang lebih dari 1000 spesies tanaman inang yang berbeda (Erwin dan Ribeiro 1996), dan spesies lainnya menempati rangkaian antara keduanya. Kisaran inang yang luas menyebabkan spesies *Phytophthora* cenderung menyerang inangnya dengan

menghasilkan enzim yang mempengaruhi mekanisme resistensi tanaman inang secara kimiawi dan mekanis yang tidak spesifik (Brasier 1983), sedangkan beberapa spesies lainnya diketahui memiliki gen-gen virulensi yang berinteraksi secara spesifik dalam sistem *gene for gene* dengan gen resistensi inangnya (Ulasan dalam Thompson dan Burdon 1992).

1.3.3. Sistem reproduksi seksual

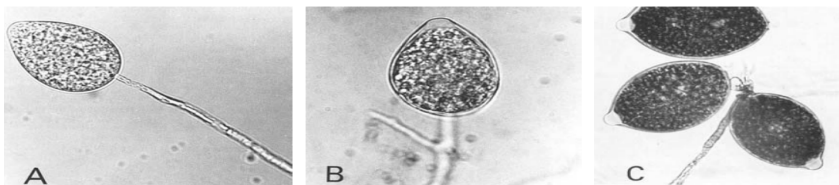
Seluruh spesies *Phytophthora* berpotensi menghasilkan reproduksi seksual ganda yaitu struktur organ seksual jantan dan betina, atau kantung gamet (*gametangia*) (Galindo dan Gallegly 1960). Namun, hanya sekitar setengah dari spesies *Phytophthora* adalah kawin dengan spesies yang sama (*homothallic*) dan mampu menghasilkan oospora (spora seksual) dengan cepat dan melimpah pada satu media biakan. Sebagian spesiesnya bisa melakukan kawin silang (*heterothallic*), dan menghasilkan kantung gamet sebagai respon terhadap rangsangan kimia dari tipe reproduksi aseksualnya (Brasier 1992; Ko 1978).

Sistem perkawinan silang yang melibatkan tipe seksual A1 dan A2 berlaku secara universal pada seluruh genus *Phytophthora*. Spesies dari tipe reproduksi aseksual dari spesies yang berbeda sering mampu merangsang pembentukan kantung gamet secara timbal balik (Ko 1978, Yu *et al.* 1981). Reproduksi seksual spesies *Phytophthora* dapat menentukan kemampuannya untuk melakukan persilangan dengan spesies lainnya: kawin sesama spesies memungkinkan terjadinya persilangan sesama spesies, sedangkan proses perkawinan silang mendorong munculnya persilangan berbeda spesies. Tetapi, baik spesies kawin dengan tipe sesama maupun beda spesies, keduanya memiliki bermacam-macam cara reproduksi. Spesies yang dikenal kawin sejenis baru-baru ini telah

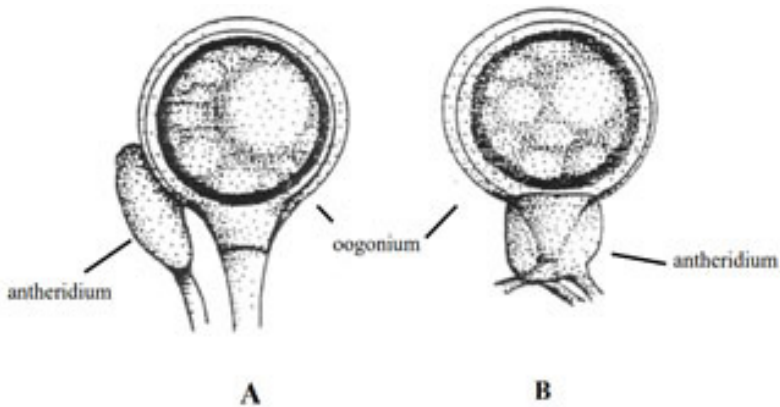
mengalami persilangan dengan spesies lain secara *in vitro* (Whisson *et al.*1994), sedangkan spesies kawin silang telah dihasilkan persilangan sesama spesies pada tingkat yang relatif rendah (Goodwin 1997, Judelson 1997).

1.4. Sistematika *Phytophthora*

Genus *Phytophthora* dikenal memiliki taksonomi yang kompleks (Brasier 1983). Salah satu penyebabnya adalah banyak karakteristik yang bisa berubah-ubah, beberapa karena dipengaruhi oleh lingkungan, adanya tumpang tindih antar spesies, dan dasar penyusun genetiknya yang belum diketahui. Meskipun demikian, sejak tinjauan utama genus dilakukan oleh Waterhouse (1963), karakteristik morfologi tetap menjadi dasar ukuran untuk identifikasi spesies dan taksonomi (Newhook 1978; Stamps *et al.* 1990). Klasifikasi spesies oleh Waterhouse terutama didasarkan pada tonjolan kantung spora (*papillation*) (Gambar 1.2) dan beragam bentuk (*caducity*) kantung spora (sporangia), tempelan organ sel jantan (Gambar 1.3), dan sistem reproduksi seksual. Berdasarkan analisis tersebut, genera *Phytophthora* dibagi menjadi enam kelompok utama (Tabel 1.2). Pengelompokkan ini bertujuan untuk identifikasi spesies bukan ditujukan untuk klasifikasi secara alami (Waterhouse 1963).



Gambar 1.2 (a) tanpa tonjolan, (b) tonjolan sedikit and (c) tonjolan pada kantung spora. Dokumentasi: Erwin dan Ribeiro 1996.



Gambar 1.3. Sel jantan (antheridium) menempel di sisi samping dinding kantung sel betina (oogonium) – (a) *paragynous*, (b) sel jantan menempel di sisi bawah sel betina (*amphigynous*). Diilustrasikan oleh Erwin dan Ribeiro 1996.

Tabel 1.2. Klasifikasi *Phytophthora* kedalam 6 grup oleh Waterhouse (1963).

Group	Kantung spora	Tipe penempelan sel jantan	Contoh spesies
I	Ada tonjolan	Samping sel betina	<i>P. cactorum</i> , <i>P. clandestine</i>
II	Ada tonjolan	Di bawah sel betina	<i>P. capsici</i> , <i>P. palmivora</i>
III	Tonjolan sedikit	Samping sel betina	<i>P. inflata</i> , <i>P. multivesiculata</i>
IV	Tonjolan sedikit	Di bawah sel betina	<i>P. infestans</i> , <i>P. ilicis</i>
V	Tidak ada tonjolan	Samping sel betina	<i>P. megasperma</i> , <i>P. sojae</i>
VI	Tidak ada tonjolan	Dibawah sel betina	<i>P. cinnamomi</i> , <i>P. drechleri</i>

1.5. Patogenisitas *Phytophthora*

Hampir sebagian besar spesies dari genus *Phytophthora* berperan sebagai patogen tanaman. Pertanyaan menarik selanjutnya adalah mengapa individu-individu dalam spesies *Phytophthora* tersebut dapat berperan sebagai patogen tanaman yang efektif. Faktor-faktor tersebut antara lain:

- a) Kemampuannya untuk menghasilkan beragam jenis spora seperti kantung spora dan spora aktif untuk kelangsungan hidup jangka pendek dan penyebarannya, dan spora istirahat dan

- spora dihasilkan secara seksual (oospora) untuk kelangsungan hidup yang lebih lama lagi.
- b) Pembentukan sporanya yang cepat pada jaringan inang yang diinfeksi seperti pada daun biasanya terbentuk spora antara 3-5 hari setelah infeksi. Hasilnya adalah terjadi peningkatan inokulum secara multi siklik yang dapat menyebabkan epidemi saat kondisi lingkungan sesuai.
 - c) Kemampuan spora aktif *Phytophthora* yang tertarik pada tudung akar (eksudat akar) melalui rangsangan kimia (kemotaksis positif) ditambah dengan mobilitas spora yang tinggi dengan berenang ke tudung akar yang sedang tumbuh aktif, lalu membelah dan menginfeksi jaringan akar muda yang rentan.
 - d) Kemampuannya untuk bertahan hidup di dalam atau di luar jaringan inang sebagai spora seksual (oospora) atau spora istirahat (klamidiospora) untuk jangka waktu yang lama. Spora seksual tersebut juga diketahui mampu bertahan hidup melalui sistem pencernaan hewan siput.
 - e) Produksi kantung sporanya (sporangia), terbawa angin dan dapat terbang mengikuti arus angin hingga menginfeksi lahan sekitarnya. Kantung spora ini dapat secara langsung menginfeksi jaringan inang. Spora terkandung dalam kantung spora (sporangiospora) yang sama ini juga memiliki kemampuan untuk menghasilkan spora aktif mencapai 32 unit spora pada kondisi lembab dan dingin yang menyebabkan banyaknya infeksi dari satu sporangium. Namun, spora aktif (zoospora) tersebut hanya mampu menyebar dengan jarak dekat karena mudah mengalami kekeringan.
 - f) Spesies *Phytophthora* memiliki Kerajaan Chromista sehingga aliran biokimianya berbeda dengan cendawan. Oleh sebab itu aplikasi fungisida tidak efektif mengendalikan *Phytophthora*.

- g) Spesies *Phytophthora* mampu tumbuh subur di bawah kondisi lembab dan basah, membuatnya sulit dikendalikan dengan fungisida saat kondisi tersebut.

Phytophthora sebagai patogen tanaman mampu menyebabkan banyak jenis gejala dan penyakit dengan kisaran inang yang luas. Berikut ini, gejala-gejala penyakit yang umum ditemukan antara lain adalah;

1.5.1. Gejala busuk akar

Secara umum bibit atau masih 'seumur jagung' pada banyak jenis tanaman sangat rentan terhadap busuk akar dan layu kecambah disebabkan oleh *Phytophthora*. Permulaan gejala tampak seperti layu dan menguning. Gejala umum dari busuk akar seperti tanaman tampak seperti gejala cekaman air, klorosis, dan sering terhambat dalam pertumbuhannya. Jaringan akar yang terserang bersifat lunak, berair dan berubah warna menjadi coklat tua yang sebelumnya berwarna agak putih krem pada akar sehat. Gejala pembusukan akar menyebabkan kurangnya akar sekunder dan tersier yang tumbuh dan kurangnya ujung akar yang sehat.

1.5.2. Gejala busuk pangkal batang

Penyakit pangkal batang sering ditemukan pada topsoil. Infeksi berpindah ke atas jaringan tanaman antara ujung batang dan akar sebelum perubahan warna pada bagian batang bawah muncul. Gejala di atas tanah tampak seperti layu, penurunan jumlah serasah daun, dan cabang-cabangnya mengalami mati pucuk. Jaringan kulit batang dan korteks yang mengalami pembengkakan diikuti dengan retakan yang mudah terpisah dari jaringan lainnya.

1.5.3. Gejala kanker batang

Jika menginfeksi batang pohon, spesies *Phytophthora* menyebabkan gejala kanker. Berbagai penamaan penyakit kanker tergantung pada inangnya antara lain kanker batang bergaris pada pohon kayu manis kanker batok durian atau kanker cabang. Gejala awal ditandai munculnya bercak basah pada permukaan kulit ranting yang lokasinya tepat di dekat ranting ujung bawah. Perubahan warna kulit dan eksudasi coklat kemerahan, memunculkan resin yang sering disertai dengan matinya jaringan (nekrosis). Pada kulit yang terkelupas, jaringan kortikal dan kayu tampak kusam dan berubah warna dari krim menjadi coklat kemerahan. Bercak pada jaringan berkayu tidak beraturan tetapi bentuknya mudah dikenali. Jika bercak berkembang, aliran air dan nutrisi melalui jaringan pembuluh terhambat dan mengakibatkan kelayuan. Awalnya bercak muncul pada setiap sisi batang, kemudian meluas dan lama kelamaan seluruh jaringan akan mengering.

1.5.4. Gejala bercak batang

Beberapa spesies *Phytophthora* menyerang daun dan batang seperti *P. infestans* pada kentang dan tomat, *P. sojae* pada kedelai, dan *P. nicotianae* pada tembakau. Diantara jaringan tanaman, batang muda paling rentan dari infeksi. Perkembangan selanjutnya adalah bercak menjadi kering, coklat tua atau hitam berkembang pada jaringan kortikal pangkal batang yang bersentuhan dengan permukaan tanah. Bercak kemudian meluas dari pangkal batang ke atas dan menutupi setengah dari batang seperti pada penyakit bercak hitam pada batang tembakau. Perkembangan bercak yang meluas pada sisi batang menyebabkan kelayuan dan kematian cabang dan daun utama.

1.5.5. Gejala busuk bongkol atau tunas

Busuk bongkol atau tunas (*bud rot*) atau disebut juga busuk jantung menjadi masalah serius pada banyak jenis tanaman palem-paleman. Penyakit ini disebabkan oleh *P. palmivora*. Gejala busuk bongkol muncul selama berbulan-bulan yang memungkinkan adanya infeksi baru dan penyebaran *Phytophthora*. Gejala awal yang muncul tampak seperti pelunturan warna (*discoloration*) pada beberapa daun dan daun muda. Daun yang baru muncul dapat terinfeksi sejak masih berbentuk bongkol (daun menyerupai tombak). Sejak terinfeksi pada bongkol, daun-daun yang baru tumbuh sudah mengalami kerusakan sehingga daun yang masih berbentuk tombak mudah terpisah karena bongkolnya membusuk yang ditandai dengan adanya miselium putih yang tampak pada pangkal daun. Daun menguning dan kemudian coklat, dan akan gugur yang akhirnya hanya menyisakan kematian pelepah. Patogen-patogen sekunder menginfeksi dan masuk ke dalam jaringan menyebabkan inang mengeluarkan cairan bau busuk. Jaringan pada pangkal bongkol kemudian mengalami pelunturan warna dari coklat kemerah-merahan menjadi coklat. Mengisolasi *Phytophthora* dari infeksi lanjutan pada tunas relatif sulit karena bongkol telah mengalami pelapukan. Inang yang mulai memunculkan tepi tunas relatif terbebas dari infeksi patogen-patogen sekunder sehingga bisa digunakan.

1.5.6. Gejala hawar daun

Sejumlah spesies *Phytophthora* menyebabkan gejala hawar daun misalnya pada penyakit hawar daun kentang dan tomat (*P. infestans*), penyakit hawar daun durian, kakao, karet dan macadamia yang disebabkan oleh *P. palmivora*, penyakit hawar daun talas disebabkan oleh *P. colocasiae*. Gejala hawar awalnya terlihat

bercak kecil-kecil pada daun dan lama lama bercak tersebut berkembang dan menutup hampir seluruh permukaan daun mulai 3 - 5 hari. Perkembangan gejala hawar daun mulanya hanya menunjukkan gejala berair dan kemudian berkembang menjadi nekrosis (bercak coklat kehitam-hitaman) beberapa hari kemudian. Bercak ini dikelilingi oleh halo seperti hijau terang melingkar. Spora yang muncul di tepi bercak tampak seperti putih halus khususnya pada sisi bawah daun. Spora berwarna putih halus yang dihasilkan juga bisa digunakan sebagai pembeda antara spesies *Phytophthora* penyebab penyakit hawar daun lainnya. Spora terkandung dalam kantung spora (*sporangiospora*) sering dihasilkan dalam jumlah banyak antara 1 sampai 4 tabung-tabung atau kantung kantung spora yang muncul melalui stomata pada sisi bawah daun. Sejumlah kantung kantung spora tersebut kemudian dapat terbawa oleh angin meskipun kondisi yang relatif kering atau kantung-kantung spora ini juga bisa langsung berkembang menjadi spora aktif (*zoospora*) yang dilengkapi dengan kaki-kaki gerak atau flagela pada kondisi basah dan lembab. Zoospora ini mulai berkecambah, menginfeksi dan membentuk bercak baru pada daun atau jaringan tanaman lain dan kemudian berpencar-pencar ke daun yang berdekatan.

1.5.7. Busuk buah

Gejala busuk buah yang disebabkan oleh *Phytophthora* biasanya diawali dengan kemunculan gejala berair pada jaringan yang terinfeksi dengan warna coklat pucat yang muncul 3-5 hari setelah infeksi, tergantung pada ketahanan dan kerentanan inang. Bercak berkembang secara cepat menutupi seluruh permukaan buah. Miselium yang dihasilkan berwarna putih atau abu abu saat kondisi kelembaban tinggi di tepi bercak. Seringkali infeksi buah tidak gugur sampai buah mengalami mumifikasi pada tangkai atau

batang pohon. Selain infeksi permukaan buah, infeksi ke dalam biji buah juga dapat terjadi seperti pada buah pepaya menunjukkan miselium berkembang pada biji yang masih di dalam buah dan dapat dilihat setelah buah dibelah terbuka.

1.5.8. Busuk umbi talas (taro) dan kentang

Salah satu bagian tanaman kentang dan talas yang rentan dari infeksi *Phytophthora* adalah umbi. Pada tanaman kentang, umbinya terinfeksi oleh spora aktif (zoospore) *P. infestans*. Spora aktif ini terbawa oleh air hujan dari daun sakit turun ke umbi. Infeksi umbi ditandai dengan adanya bercak berwarna coklat berubah menjadi ungu tampak pada kulit kentang. Jika umbinya dipotong, tampak jelas busuk kering coklat kemerah-merahan tepat di bawah lapisan kulitnya. Jika umbi terinfeksi berat, umbi tidak dapat dipanen. Sulit dideteksi jika umbi masih terinfeksi ringan. Gejala dapat dideteksi pada batang baru muncul akibat infeksi dini pada umbi yang ditanam dan hal ini bisa memicu epidemi penyakit pada musim tanam berikutnya. Kejadian penyakit ini memungkinkan dilakukan prediksi seberapa sering penyakit hawar daun kentang terjadi. Kentang juga diinfeksi oleh *P. erythroseptica* penyebab penyakit busuk merah muda. Umbi yang terinfeksi memiliki penampilan coklat kusam dan mengeluarkan lendir jika umbi ditekan dan jika umbi dibelah, terjadi perubahan warna merah muda pudar setelah terpapar udara. 30 menit kemudian seluruh permukaan lapisan umbi berubah menjadi merah muda cerah. Jika umbi talas terinfeksi, permukaan umbi tetap mengeras dan kasar yang merupakan ciri khas dari busuk kering *Phytophthora*. Keseluruhan permukaan umbi membusuk selama satu minggu.

Media tumbuh dan penambahan antibiotik untuk isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit dan tanah

Berbeda dengan cendawan sejati, isolasi Oomycetes memerlukan keterampilan khusus. Sebagian besar spesies *Phytophthora* tumbuh relatif lambat pada media *in vitro* dibandingkan dengan cendawan dan bakteri saprofit lainnya. Selain itu, bakteri kontaminan menjadi faktor penghambat pertumbuhan *Phytophthora* melalui mekanisme kompetisi, produksi antibiotik, dan parasit secara langsung. Penambahan antibiotik pada media isolasi diharapkan dapat menekan pertumbuhan bakteri kontaminan. Selain itu, karena adanya kompetisi nutrisi dengan cendawan lain,

pemilihan media rendah nutrisi untuk menumbuhkan *Phytophthora* spp. sangat dianjurkan. Langkah ini dapat mengurangi atau menekan tingkat pertumbuhan cendawan kontaminan dan memungkinkan koloni *Phytophthora* tumbuh dengan baik. Media agar tepung jagung buatan (diproduksi oleh Difco) adalah media dasar yang paling sering digunakan untuk kegiatan isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman yang terinfeksi. Namun, media dasar lain yang dibutuhkan meliputi: agar air, atau 2% agar jus atau 4% (v/v) V8. Penggunaan antibiotik yang cocok dan efektif untuk menekan pertumbuhan bakteri kontaminan antara lain ampisilin, penisilin, rifampisin, dan vankomisin yang dapat dikombinasikan secara bersama-sama atau digunakan secara tunggal. Antibiotik yang sesuai dengan aktivitas antifungi termasuk nistatin dan pimaricin. Nistatin biasanya lebih murah dan banyak tersedia di toko-toko farmasi terdekat daripada pimaricin.

2.1. Media dasar untuk isolasi dari jaringan tanaman sakit

Media jus V8

Dua kaleng jus V8 (volume 665 ml per kemasan) dikocok rata terlebih dahulu sebelum dituangkan ke dalam tabung reaksi ukuran 2 liter. Sebanyak 10 g kalsium karbonat ditambahkan ke dalam larutan jus dan diaduk selama 20 menit untuk meratakan keasamannya. Pengenceran media tersebut akan dijelaskan lebih lanjut pada deskripsi di bawah ini. Sisa larutan jus V8 dapat disimpan pada suhu -20 °C. Apabila akan digunakan kembali, larutan jus yang membeku tersebut harus dicairkan secara sempurna terlebih dahulu.

Media jus V8 agar untuk pertumbuhan dan pemeliharaan biakan *Phytophthora*

Jus V8 yang telah diencerkan, kemudian diencerkan hingga mencapai konsentrasi akhir 20% (v/v):

100 ml CaCl₂ larutan jus V8

400 ml air suling atau air yang sudah deionisasi

7,5 g tepung agar

Larutan tersebut diautoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit, kemudian didinginkan hingga mencapai suhu 55-60 °C sebelum dituangkan ke dalam cawan petri. Media yang telah dituang kemudian dikeringkan di laminar *air flow* selama 30-40 menit. Cawan petri ditutup dan direkatkan dengan *plastic wrap* sebelum disimpan ke dalam kulkas (bukan suhu beku). Hindari terbentuknya uap air yang dapat menempel pada tutup cawan petri.

Media larutan jus V8 agar – Isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit

Larutan Jus V8 dapat diencerkan menjadi 2% sampai 4% (v/v) sebagai larutan stok. Larutan stok tersebut diautoklaf terlebih dahulu sebelum ditambahkan antibiotik seperti yang dijelaskan pada sub-bab 2.2.

Media agar tepung jagung atau *Cornmeal agar (CMA)*

Media CMA sangat cocok untuk mengisolasi *Phytophthora* dari jaringan sakit karena media ini tidak kaya nutrisi. Begitu media mencapai suhu 50-55 °C, segera tambahkan antibiotik seperti yang telah dijelaskan di sub-bab 2.2. Media CMA bisa dibuat sendiri (jika media CMA instan tidak tersedia) sebagai berikut:

Metode 1

Tepung jagung (polenta) dicampur dengan air suling atau air deionisasi (60 g / liter), lalu diautoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dan setelah itu disaring. Larutan ini kemudian ditambahkan dengan 15 g agar, diaduk rata, kemudian diautoklaf dengan suhu dan waktu seperti sebelumnya.

Metode 2

Sebanyak 200 g jagung direbus didalam 200 ml air suling atau deionisasi selama 1 jam sambil diaduk beberapa kali. Larutan tersebut disaring menggunakan saringan tipis. Sebanyak 1 liter filtrat kemudian ditambahkan 15 g agar dan diautoklaf seperti metode sebelumnya.

Media agar air

Sebanyak 15 g agar dicampur dengan 1 liter air suling atau deionisasi. Larutan tersebut diautoklaf dan ditambahkan dengan antibiotik (seperti pada sub-bab 2.2) saat suhu media agar berkisar antara 50-55 °C.

2.2. Media selektif untuk isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit

Media selektif untuk isolasi *Phytophthora* adalah berbasis agar tepung jagung (*cornmeal*) yang dijual di pasaran. Media dasar dapat berupa larutan jus V8, tepung CMA, dan larutan agar. Campuran media dasar tersebut ditambahkan antibiotik sesuai formulasi yang ditetapkan sebagai larutan stok. Sebagian besar larutan stok antibiotik memerlukan penapis steril (0,22-0,45 mikrometer) pada saat ditambahkan ke dalam media steril (media yang telah diautoklaf) pada suhu 50-55 °C. Larutan stok dengan antibiotik

disimpan pada suhu 4 °C atau -20 °C (beku). Tabel 2.8 menampilkan penggunaan antibiotik secara umum, sifat dan persiapannya, dan beberapa alternatif lainnya.

Cawan petri yang digunakan untuk media selektif harus dipastikan bahwa tutupnya bebas uap air untuk mencegah pertumbuhan dan penyebaran bakteri kontaminan. Oleh sebab itu, tutup cawan petri harus dibuka setengah setelah penuangan dan disimpan di meja laminar *air flow* selama 20-30 menit. Setelah media selektif memadat dan terbebas dari uap air, cawan petri ditutup dan dimasukkan ke dalam pembungkus plastik sebelum disimpan di dalam kulkas. Cawan petri hendaknya disimpan pada posisi terbalik (tutup berada di sisi bawah). Sebagai catatan, Pimaricin dan Nystatin peka terhadap cahaya sehingga penyimpanan untuk media selektif sebaiknya tidak menggunakan lampu. Media yang mengandung antifungi sebaiknya dibungkus dengan kertas timah (*aluminium foil*) atau plastik hitam dan disimpan di kulkas. Idealnya, media selektif yang mengandung antibiotik dibuat ketika akan digunakan. Media selektif dapat disimpan di kulkas selama 2-4 minggu dan sebaiknya diganti jika lebih dari sebulan di penyimpanan.

Media 3-P (Eckert dan Tsao 1960, 1962)

Sebanyak 17 g agar tepung jagung (Difco) ditambahkan ke dalam 1 liter air suling atau air deionisasi. Larutan tersebut dicampur rata dan dipanaskan ke dalam autoklaf suhu 121 °C selama 20 menit sebelum didinginkan ke dalam *waterbath* hingga 50-55 °C. Menambahkan antibiotik dengan konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$ atau $\mu\text{g/l}$ (ppm)): Pimaricin (100), Penicillin (50), dan Polymixin B (50). Komposisi larutan stok dan antibiotik yang diperlukan beserta jumlah yang harus ditambahkan ke dalam media dijelaskan pada

Tabel 2.1. Media 3-P yang sudah dituang ke dalam cawan petri dibungkus dengan kertas timah atau plastik hitam karena Pimaricin peka terhadap cahaya. Untuk selanjutnya media 3-P sebaiknya disimpan kedalam kulkas suhu 4 °C.

Tabel 2.1 Media 3-P

Jenis antibiotik	Larutan stok (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Pimaricin	25	4	100
Penicillin	50	1	50
Polymyxin B	50	1	50

Catatan: Media 3-P ini hanya cocok untuk isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman yang baru terinfeksi, bukan jaringan tua atau jaringan lapuk dan atau tanah terinfestasi spora. Hal ini dikarenakan perkecambahan spora di media dapat terhambat oleh Pimaricin. Konsentrasi Pimaricin yang lebih cocok untuk isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman tua atau dari tanah adalah 5-10 ppm (Tabel 2.2).

Tabel 2.2 Media 3-P dengan 10 µg/ml Pimaricin

Jenis antibiotik	Larutan Stock (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Pimaricin	25	0.4	10
Penicillin	50	1	50
Polymyxin B	50	1	50

Media P₁₀VP (Tsao dan Ocana 1969)

Sama seperti prosedur sebelumnya, campuran larutan agar tepung jagung dipanaskan ke dalam autoklaf dan kemudian didinginkan kedalam penampung air dengan suhu terkontrol (*waterbath*) hingga mencapai suhu 50-55 °C. Menambahkan antibiotik kedalam media dengan volume (µg/ml): Pimaricin (10), Vancomycin (200), dan Pentachloronitrobenzene (PCNB; 100). Media P₁₀VP ini sesuai untuk isolasi *Phytophthora* dari tanah dan

jaringan tanaman yang terinfeksi (Tabel 2.3). Hymexazol (lihat bawah) juga dapat ditambahkan kedalam konsentrasi akhir 25-50 µg/ml.

Tabel 2.3 Media P₁₀VP

Jenis antibiotik	Larutan stok (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Pimaricin	25	0.4	10
Vancomycin	100	2	200
PCNB	Tidak larut	bubuk 100 mg	100

P₁₀ ARP Medium (Kannwischer and Mitchell 1978)

Campuran agar tepung jagung seperti sebelumnya diautoklaf, didinginkan hingga mencapai suhu 50-55 °C dan kemudian menambahkan antibiotik dengan perbandingan volume (µg/ml): Pimaricin (10), Ampicillin (250), Rifampicin (10), dan Pentachloronitrobenzene (PCNB; 100) (seperti Tabel 2.4). Hymexazol juga dapat ditambahkan ke dalam media dengan konsentrasi akhir 25-50 µg/ml.

Tabel 2.4 Media P₁₀ARP

Jenis antibiotik	Larutan stok (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Pimaricin	25	0.4	10
Ampicillin	100	2.5	250
Rifampicin	10	1	10
PCNB	Tidak larut	Bubuk 100 mg	100

Media P₅ARP (Jeffers and Martin 1986; Papavizas et al. 1981)

Seperti halnya metode di atas, penggunaan Pimaricin dikurangi menjadi 5 µg/ml media (seperti pada Tabel 2.5). Hymexazol (lihat di bawah) bisa dicampurkan ke dalam larutan dengan konsentrasi akhir 25-50 µg/ml.

Tabel 2.5 Media P₅ARP

Jenis antibiotik	Larutan stok (mg/ml)	Volume anti- biotic per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Pimaricin	25	0.2	5
Ampicillin	100	2.5	250
Rifampicin	10	1	10
PCNB	Tidak larut	Bubuk 100 mg	100

Catatan: media P₁₀ARP dan P₅ARP adalah media tumbuh alternatif untuk isolasi kebanyakan spesies *Phytophthora*

Media Hymexazol yang dimodifikasi (Masago *et al.* 1977)

Hymexazol (Tachigaren) adalah fungisida yang mampu menekan sebagian besar *Pythium* spp. kecuali pada *P. irregulare* dan *P. vexans*. Pertumbuhan beberapa spesies *Phytophthora* yang dapat dihambat dengan bahan aktif ini antara lain *P. cinnamomi*, *P. citrophthora* dan *P. palmivora*.

Satu liter media dasar diautoklaf lalu didinginkan hingga mencapai suhu 50-55 °C dengan perbandingan konsentrasi (µg/ml) sebagai berikut: Benomil (10), Pentakloronitrobenzena (PCNB; 25), Nistatin (25), Ampisilin (500), Rifampisin (10) dan Hymexazol (25-50) (lihat Tabel 2.6 dan 2.7).

Hymexazol juga bisa ditambahkan kedalam media selektif lainnya dengan konsentrasi akhir 25-50 µg/ml. Pembuatan larutan stok dapat dilakukan seperti langkah-langkah yang telah dijelaskan sebelumnya pada Tabel 2.8. Sebanyak 0,5 ml larutan stok ditambahkan ke dalam 1 liter media selektif untuk menghasilkan konsentrasi larutan akhir 25 µg/ml, atau menambahkan 1,0 ml kedalam 1 liter media selektif untuk menghasilkan konsentrasi akhir 50 µg/ml.

Tabel 2.6 Media Hymexazol

Jenis antibiotik	Larutan Stok (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Benomyl	Tidak larut	Bubuk 10 mg	10
PCNB	Tidak larut	Bubuk 25 mg	25
Nystatin	100	0.25	25
Ampicillin	100	5	500
Rifampicin	10	1	10
Hymexazol	50	0.5	25

Tabel 2.7 Media Hymexazol

Jenis antibiotik	Larutan stok (mg/ml)	Volume antibiotik (ml) per 1 liter media	Konsentrasi akhir (µg/ml)
Benomyl	Tidak larut	Bubuk 5 mg	5
PCNB	Tidak larut	Bubuk 25 mg	25
Nystatin	100	0.25	25
Ampicillin	100	5	500
Rifampicin	10	1	10
Hymexazol	50	1	50

Tabel 2.8 Antibiotik umum, kandungan, persiapan dan alternatif lain

Jenis antibiotik	Activitas	Target mikroba	Persiapan larutan stok ¹	Larutan stok (mg/ml)	Kisaran penggunaan (µg/ml)	Keterangan	Alternatif
Ampicillin	Antibakteri	Bakteri gram positif	Encerkan 1 g tepung kedalam 10 ml air suling. Saring dan sterilkan	100	250-500		Pencillin G
Benomyl	Antifungi	Sebagian besar dari golongan cendawan kecuali: Zygomycetes dan Oomycetes	Benomyl relatif mudah larut dalam air. Tambahkan tepung kedalam media sebelum diautoklaf. Aduk media saat peneuangan dan pastikan larutan tercampur rata	-	10-25	Tidak menekan banyak cendawan lain	
Hymexazol (also called HMI or Tachigaren)	Antifungi	Sebagian besar dari golongan <i>Pythium</i> spp.	Larutkan ½ g tepung kedalam 10 mL air suling. Saring dan sterilkan	50	25-50	Menghambat beberapa jenis <i>Phytophthora</i> spp.	
Nystatin (Mycostatin)	Antifungi	Sebagian besar dari golongan cendawan kecuali Peronosporales	Larutan ½ g tepung kedalam 5 mL air suling dan saring dan sterilkan	100	10-100	Tidak aktif menghambat beberapa <i>Moritzella</i> spp. Tidak seaktif Pimaricin; bereaksi pada konsentrasi tinggi	Pimaricin
Pencillin G	Antibakteri	Bakteri gram positif dan bakteri gram negatif berbentuk bulat; bakteri gram positif berbentuk batang	Larutan ½ g tepung kedalam 10 mL air suling dan saring dan sterilkan	50	50-100	Tidak aktif menghambat Gram - ve bacilli	penambahan dengan polymixin B sebanyak 50-100 µg/ml
Pentachloronitrobenzene (PCNB)	Antifungi	Spektrum anti fungi terbatas	PCNB tidak larut dalam air. Karena PCNB stabil pada kondisi panas, tepung dapat dicampurkan ke dalam media sebelum diautoklaf	-	10-100	Tidak menekan banyak jamur lain	
Pimaricin	Antifungi	Sebagian besar berasal dari golongan cendawan kecuali: Pythiaceae	Tidak larut dalam air. Mencampurkan 250 mg tepung kedalam 10 ml air suling steril. Jangan difilter dan sterilkan.	25	2-100 Sering digunakan 5-10 µg/ml	Tidak aktif menghambat beberapa <i>Moritzella</i> spp. Dosisnya harus dibatasi kurang dari 10 µg/ml	Nystatin
Polymyxin B	Anti bakteri	Bakteri gram positif	Larutan ½ g tepung kedalam 10 mL air suling dan saring dan sterilkan	50	20-50		
Rifampicin	Antibakteri	Bakteri gram positif dan sedikit dari bakteri gram negatif	Larutan 100 mg tepung kedalam 10 mL air suling dan saring dan sterilkan	10	10		Pencillin G dan polymixin B
Vancomycin	Anti bakteri	Bakteri gram positif; sedikit dari bakteri gram negatif	Larutan 1 g tepung kedalam 10 mL air suling dan saring dan sterilkan	100	100-200	Sangat mahal	Pencillin G dan polymixin B

¹ Perlu diperhatikan berapa liter media yang dibunuhakan sebelum membuat larutan stok karena antibiotik relatif mahal. Sehingga perlu dikurangi atau dinaikkan volume larutan stok yang dibuat.....

3

Deteksi dan isolasi *Phytophthora* dari jaringan sakit dan dari tanah

Spesies *Phytophthora* diperkirakan menyebabkan 90% busuk pangkal batang pohon. Akan tetapi, kurangnya pengetahuan tentang cara isolasi *Phytophthora* menyebabkan hasil deteksi negatif, sehingga patogen lain seperti *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, dan nematoda sering dianggap sebagai penyebab busuk akar dan pangkal batang (Tsao 1990). Berbeda dengan spesies *Pythium* dan *Fusarium* yang umumnya berasosiasi dengan tanaman dan tanah, spesies *Phytophthora* berasosiasi dengan jaringan tanaman sakit yang tampaknya menjadi agen tunggal penyebab penyakit. Hal ini dikarenakan sebagian besar spesies *Phytophthora* menyerang jaringan aktif atau luka baru pada jaringan. *Phytophthora* adalah patogen utama yang aktif menginfeksi inang, tetapi jika inang telah

terserang oleh spesies patogen lain *Phytophthora* tidak menyerang lagi jaringan tersebut. Deteksi dan atau isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit relatif mudah dan berhasil jika jaringan tersebut masih segar dan tanda-tanda infeksi masih baru. Isolasi *Phytophthora* dari jaringan mati relatif sulit karena sebagian besar spesies *Phytophthora* kurang mampu sebagai saprofit dan produksi miselium menurun begitu jaringan inang mati. Selain itu, produksi spora istirahat (klamidospora) dan spora seksual (oospora) lambat berkecambah dan muncul dari jaringan yang sudah mengering. Isolasi *Phytophthora* secara langsung dari tanah relatif sulit, tetapi penggunaan teknik umpan meningkatkan frekuensi keberhasilan mengisolasi *Phytophthora* dari tanah yang terinfestasi.

3.1. Seleksi sampel untuk isolasi *Phytophthora*

Apabila *Phytophthora* tidak ditemukan dari sampel yang diambil dari lapangan kemungkinan karena sampel tidak mengandung *Phytophthora*. Kemungkinan lain adalah penanganan dan penyimpanan sampel yang kurang tepat. Sebaiknya isolasi *Phytophthora* dilakukan dengan teknik umpan beberapa kali untuk memastikan bahwa *Phytophthora* benar benar tidak ada di tanah. Oleh sebab itu, untuk memperoleh hasil maksimal, sampel tanah dan tanaman sakit diambil dari lokasi yang benar benar terinfestasi dengan penanganan sampel yang tepat.

3.2. Isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit

Spesies *Phytophthora* menyerang jaringan tanaman sehat seperti jaringan akar. Oleh sebab itu, patogen dapat ditemukan meskipun belum menunjukkan gejala. Spesies *Phytophthora* relatif sulit diisolasi dari jaringan yang sudah mati karena telah didominasi oleh patogen-patogen sekunder. Pendeknya, kegiatan isolasi

Phytophthora pada jaringan mati sulit dilakukan. Teknik umpan dan isolasi adalah teknik terbaik melalui pengambilan sampel yang berada disekitar tanaman atau pengambilan tanah di dekat tanaman mati.

Keberhasilan isolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman sakit ditentukan oleh pemilihan secara cermat jaringan yang baru terinfeksi sehingga cara terbaik untuk mendapatkan patogen yaitu mengambil jaringan tanaman dari pinggir bercak yang masih aktif. Jaringan daun dan batang yang dipilih untuk isolasi idealnya sisi bagian yang sakit dan bagian yang sehat. Setelah jaringan dilakukan sterilisasi permukaan, segera dipindahkan ke media selektif yang sesuai, dan diamati secara teratur untuk memastikan kemunculan pertumbuhan hifa yang lambat dan tak berseptas.

Spesies *Pythium* spp. hampir selalu dijumpai pada akar, tajuk dan pangkal batang tanaman yang sakit dan sehat sehingga *Pythium* juga berperan sebagai kontaminan. Ada tiga cara menghindari kontaminasi *Pythium* pada media isolasi antara lain yaitu:

1. Karena pertumbuhan *Pythium* hanya terbatas pada akar atau sekitar pangkal batang sakit (membusuk), dianjurkan untuk memilih jaringan tanaman lain,
2. Karena pertumbuhan *Pythium* hanya terbatas pada jaringan korteks terluar dari akar, sterilisasi permukaan akar biasanya mampu untuk membunuh *Pythium* atau alternatif lainnya adalah dengan memilih pusat akar,
3. Penggunaan Hymexazol akan menghambat sebagian besar *Pythium* kecuali untuk *P. irregulare* dan *P. vexans*. Tetapi perlu diwaspadai bahwa bahan aktif ini mampu menghambat perkembangan beberapa jenis *Phytophthora* spp., seperti

P. cinnamomi, *P. citrophthora* dan *P. palmivora*. Jika jenis *Phytophthora* diperkirakan ada di dalam sampel jaringan tanaman target, maka penggunaan media selektif dengan atau tanpa hymexazol dilakukan secara hati-hati.

3.2.1. Persiapan dan sterilisasi permukaan jaringan sakit

Phytophthora yang diperkirakan menginfeksi jaringan akar, batang, daun dan batang, direndam atau diapungkan dengan air bersih atau air baku atau air suling dengan ketinggian air rendah. Jaringan tersebut dibiarkan selama 24-48 jam dalam keadaan terang pada suhu 18-25°C. Kemudian jaringan tanaman tersebut diamati untuk memastikan terbentuknya kantung spora. Apabila kantung spora telah dihasilkan pada jaringan tanaman, jaringan tanaman yang terinfeksi tersebut dipotong ukuran kecil lalu dilakukan sterilisasi permukaan sebelum dipindahkan dan ditumbuhkan kedalam media selektif.

Buah dapat diisolasi secara mudah dengan memisahkan atau memotong kecil kecil bagian terluarnya dan potongan tersebut dipindahkan ke dalam media selektif. Isolasi jaringan daun cukup dengan dibersihkan permukaannya dan dilakukan sterilisasi permukaan dan segera disimpan kedalam media selektif. Sterilisasi permukaan jaringan daun dan batang dengan cara mencelupkannya kedalam etanol 70% selama 30-60 detik dan dikeringkan diatas kertas saring steril sebelum dipindahkan kedalam media selektif. Apabila jaringan tanaman yang masih basah dipindahkan ke dalam media dapat menyebabkan bakteri kontaminan tumbuh dengan cepat dan menekan pertumbuhan *Phytophthora*. Jaringan batang yang tebal (lebar 0,5-1 cm) dapat dicelupkan kedalam etanol 70% selama 10-30 detik, dan jaringan tersebut dikeringkan cepat beberapa detik

dengan menggunakan api (etanol/spiritus). Jaringan yang dipotong kedua sisinya yang bergejala diambil dan dipindahkan ke dalam media selektif.

Akar yang sakit memerlukan waktu penyiapan lebih lama. Tempatkan akar dalam gelas piala dan bilas dengan air mengalir beberapa jam. Proses ini menghilangkan bakteri dan dapat merangsang pembentukan sporangia. Setelah pembilasan selesai, potong akar ukuran kecil kecil terutama akar yang menunjukkan bercak, lalu potongan akar tersebut dilakukan sterilisasi sebelum dikeringkan di atas kertas saring steril. Pindahkan dan tanam potongan akar tersebut ke dalam media selektif. Salah satu metode sterilisasi permukaan jaringan akar dapat dipilih dari dua metode di bawah ini:

- Celupkan jaringan akar kedalam etanol 70% (v/v) selama satu menit, cuci akar tersebut selama 10-20 detik ke dalam air suling steril dan keringkan pada kertas saring steril. Potong akar menjadi 0,5 cm panjangnya sebelum dipindahkan dan ditanam ke dalam media selektif.
- Celupkan jaringan akar kedalam larutan clorox yang sudah diencerkan dengan perbandingan 1 : 10 (*sodium hypochlorite* 0,5% v/v konsentrasi akhir) selama 30 detik. Bilas akar dengan air steril dan keringkan pada kertas saring steril. Potong akar menjadi 0,5 cm panjangnya sebelum dipindahkan dan ditanam kedalam media selektif.
- Sterilisasi permukaan dengan etanol relatif lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri kontaminan dalam media dan membantu pertumbuhan sebagian besar jenis *Phytophthora*. Potongan akar yang dikeringkan dengan kertas steril lalu dipindahkan kedalam media dengan menancapkan

atau membenamkan sepertiga bagian sisi akar di permukaan agar. Jaringan akar yang ditanamkan ke permukaan agar bertujuan untuk terjadinya kontak antara bakteri kontaminan dan antibiotik. Terhambatnya bakteri akibat antibiotik membantu memudahkan *Phytophthora* tumbuh dengan cepat di dalam media agar. Pada bab 2 dari buku ini dijelaskan berbagai jenis media dan antibiotik untuk mengisolasi *Phytophthora* dari jaringan tanaman dan tanah.

3.3.2 Isolasi *Phytophthora* dari tanaman sakit melalui umpan buah kakao (metode Chee dan Foong, 1968)

Phytophthora dapat juga diisolasi dari jaringan tanaman sakit melalui teknik umpan. Teknik ini bermanfaat karena (i) teknik ini bisa dilakukan sebagai langkah awal isolasi dari lapangan dan (ii) tidak memerlukan lagi sterilisasi permukaan jaringan umpan:

1. Lubangi buah kakao muda dan sehat dengan diameter 8 mm dan ampasnya dibuang.
2. Masukkan irisan jaringan sakit (1 cm lebar x 2 cm panjang) ke dalam lubang tersebut dan dorong pelan-pelan sampai sejajar dengan permukaan kulit buah. Boleh juga dengan cara buah diiris tipis posisi miring lalu potongan jaringan sakit disisipkan seukuran dengan hasil irisan pada buah.
3. Balut lubang gorokan atau irisan buah dengan plastik elastis dan simpan buah tersebut kedalam suhu kamar. Sebetulnya satu buah kakao bisa sampai 6 lubang gorokan atau irisan.
4. Setelah 4-5 hari inokulasi, perubahan warna coklat akan muncul pada permukaan buah disekitar bekas lubang atau bekas irisan yang mengindikasikan keberadaan *Phytophthora*. Jika ternyata bekas luka lubang Gorokan atau irisan mengalami pembusukan

lunak menandakan terkontaminasi oleh cendawan saprofit. Mengambil sebagian sisi jaringan sehat dan sebagiannya lagi jaringan sakit terluar di sekitar bercak kemudian dilakukan sterilisasi permukaan. Apabila mengambil jaringan buah bagian dalam, maka tidak memerlukan sterilisasi permukaan.

5. Letakkan potongan tersebut kedalam media selektif atau media agar ekstrak tanah (lihat sub-bab 4.3 - tambahkan 15 g agar / liter ekstrak tanah sebelum diautoklaf).

Metode ini sudah berhasil mengisolasi *P. nicotianae* dan juga bisa disesuaikan untuk mengisolasi *Phytophthora* dari tanah (lihat sub-bab 3.6).

3.3. Isolasi *Phytophthora* dari tanah

Cara terbaik untuk melakukan pengambilan sampel tanah untuk *Phytophthora* adalah sebagai berikut: jika memungkinkan, sampel harus diambil dari tanah yang lembab, dekat dengan akar yang sehat setidaknya 5 cm di bawah permukaan tanah. Permukaan tanah sering kering dan terkena suhu tinggi dari matahari, menjadikannya tempat yang kurang kondusif bagi *Phytophthora*. Sampel tanah seringkali paling baik diambil selama atau segera setelah cuaca basah, yang biasanya meningkatkan *Phytophthora* aktivitas. Pengambilan sampel seringkali paling baik di bawah tepi kanopi tanaman / pohon karena pertumbuhan akar lebih kuat daripada bagian yang berbatasan langsung dengan batang.

Sampel tanah yang diambil harus ditangani dengan hati-hati sebab dapat menyebabkan kering jika terpapar suhu tinggi (45 °C) sehingga kehilangan viabilitasnya. Oleh sebab itu, saat pengambilan sampel tanah dianjurkan untuk menggunakan AC kendaraan atau kotak pendingin dianjurkan. Tempatkan sampel

tanah di dalam kantung plastik dan untuk mencegah kekeringan, sampel dimasukkan ke dalam kulkas. Hindari penyimpanan tanah pada suhu beku karena *Phytophthora*. atau kontak langsung dengan es. Alternatif penyimpanan dapat dilakukan dengan menambahkan beberapa balok es yang dibungkus dengan kertas koran lalu disimpan ke dalam kulkas. Untuk penyimpanan sementara cukup dengan menempatkan sampel pada kisaran suhu pada 10-15 °C dan pastikan sampel tanah lembab (jika mulai mengering cukup menambahkan air). Hasil maksimal dapat diperoleh jika sampel tanah ditangani dengan cepat selama beberapa hari dan dapat disimpan kemudian selama beberapa bulan. Sampel tanah yang mengering selama penyimpanan, dapat dilembabkan kembali selama 1-7 hari sebelum isolasi dilakukan. Hal ini bisa merangsang produksi kantung spora dan perkecambahan spora istirahatnya atau oosporanya.

3.3.1. Deteksi dan isolasi *Phytophthora* melalui umpan dari tanah

Beberapa bagian tanaman dapat digunakan sebagai umpan selektif pada jenis *Phytophthora* target seperti buah, biji-bijian, polong biji, bibit, kotiledon, daun, daun muda berbentuk cakram/strip daun, dan kelopak. Tiga hal penting pada teknik umpan ini antara lain:

1. Masukkan tanah terinfestasi atau jaringan tanaman sakit ke dalam lubang gorokan yang dibuat pada permukaan kulit buah muda apel, kakao, pir, atau semangka. Untuk lebih rinci, isolasi *Phytophthora* dari tanah menggunakan buah kakao muda dapat dilihat pada sub-bab 3.6.
2. Tanam benih, bibit atau stek (sudah berakar) di lahan lalu dilakukan penyiraman dengan volume air yang banyak untuk memicu infeksi.

3. Apungkan atau benamkan sebagian sisi umpan (dari berbagai jenis umpan) ke dalam air atau tanah lembab. Metode ini banyak digunakan untuk mengisolasi *Phytophthora* spp. Jaringan tanaman sakit dapat dibenamkan/dicampurkan tanah untuk memaksimalkan keberhasilan deteksi.

Pemilihan jenis umpan tergantung pada jenis *Phytophthora* yang diduga sebagai penyebab penyakit dan tanaman inangnya. Berbagai teknik umpan disajikan pada Tabel 3.1. Untuk lebih detail, teknik umpan dengan pengapungan taoge atau buah kakao disajikan pada sub-bab 3.5 dan 3.6.

Teknik umpan dengan cara pembedaman bagian sisi umpan ke tanah atau pengapungan umpan di tanah perlu memperhatikan dengan ketinggian air dengan rasio air / tanah (4: 1 atau lebih). Jenis air yang baik untuk melarutkan tanah dan mengapungkan umpan adalah air suling, air diionisasi atau air baku bebas dari ion klorida atau tembaga. Hindari penggunaan air PDAM atau air minum kemasan. Pengenceran tanah juga dapat melarutkan zat penghambat pertumbuhan *Phytophthora* yang terkandung di dalam tanah sehingga dapat meningkatkan pembentukan kantung spora dan spora aktif. Isolasi dari jaringan umpan yang terinfeksi harus berasal dari jaringan sehat di sekeliling bercak. Pada kasus daun muda seperti daun masih berbentuk cakram/strip daun atau kelopak daun, seluruh jaringannya dapat ditempatkan ke dalam media isolasi. Untuk lebih lengkapnya dapat dilihat sub-bab 3.2.1

3.4. Pemeliharaan biakan

Sebagian besar spesies *Phytophthora* memiliki pertumbuhan optimal antara 15-25 °C sehingga pemeliharaan biakan *Phytophthora* harus berada dalam kisaran suhu tersebut. Suhu

yang sedikit lebih dingin yang cenderung mendukung *Phytophthora* dan memperlambat pertumbuhan bakteri. Biakan harus dipelihara dalam ruangan gelap, apabila menggunakan antibiotik yang sensitive terhadap cahaya, cawan petri tempat biakan sebaiknya dibungkus dengan plastik hitam atau kertas *aluminium foil*. Simpan biakan *Phytophthora* pada tempat penyimpanan yang terpisah dari biakan lainnya sebab rentan terkontaminasi oleh cendawan dan tungau. Idealnya, isolasi *Phytophthora* dari jaringan sakit dan dari tanah dilakukan di laboratorium yang bebas dari penyimpanan biakan lain. Hal yang perlu dipahami bahwa propagul *Phytophthora* akan mengalami dormansi dan lambat berkecambah jika bersumber dari tanah atau dari jaringan tanaman tua yang terinfeksi. Oleh karena itu, dibutuhkan 2-20 hari sebelum koloni miselium muncul di dalam isolasi biakan.

Tabel 3.1 Teknik-teknik umpan untuk isolasi *Phytophthora* dari tanah

Jenis	B a h a n umpan	Cara kerja	Pustaka
<i>P. cinnamomi</i>	Apel atau pir	Melubangi buah, isi dengan tanah yang lembab lalu simpan dengan wadah tertutup dengan suhu 15-27 °C selama 5-10 hari. Ambil spesimen dari tepi area bercak sekitar lubang gorokan. Cara ini baik untuk banyak jenis <i>Phytophthora</i> spp.	(Campbell 1949)
	Irisan-irisan apel	Rendam irisan irisan apel kedalam 200 ml air suling yang berisi 25 g tanah yang ditambahkan. Pelihara antara 4-10 hari.	(Gerrettson-Cornell 1974)
	Buah alpukat	Benamkan separuh buah kedalam tanah yang tergenang dan lalu simpan pada suhu 20-27°C selama 2-4 hari.	(Zentmyer <i>et al.</i> 1960)
	Bibit alpukat	Menanam bibit di tanah basah dan pelihara pada suhu 21-27°C selama 2-3 hari	(Zentmyer 1980)
	Daun alpukat	Apungkan daun diatas permukaan air yang sebelumnya ditambahkan tanah selama 4 hari	(Pegg 1977)

<i>P. citrophthora</i>	Apel, jeruk lemon dan jeruk manis	Sisipkan tanah atau jarring jeruk kedalam buah seperti metode Campbell (1949) untuk isolasi <i>P. cinnamomi</i> . Atau buah jeruk lemon atau jeruk orange diletakkan diatas permukaan tanah selama 4 hari atau lebih	(Klotz and DeWolfe 1958)
	Buah jeruk lemon	Benamkan separuh sisi buah kedalam 150 ml air yang telah ditambahkan sebelumnya tanah 25 cc. Pelihara pada suhu 25°C selama 6 hari	(Tsao 1960)
	Toge yang berkecambah	Lihat Dance <i>et al.</i> (1975) untuk isolasi <i>P. cryptogea</i>	
<i>P. heveae</i>	Buah apel, buah terong, buah kakao	Tidak dijelaskan lebih rinci teknik isolasinya tetapi umpan yang disisipkan kedalam buah apel seperti metode Campbell (1949), atau umpan bisa disisipkan separuh sisinya kedalam tanah tergenang seperti pada metode Zentmyer <i>et al.</i> (1960) untuk isolasi <i>P. cinnamomi</i> .	(Lee and Varghese 1974)
<i>P. nicotianae</i>	Buah apel, jeruk lemon, atau buah jeruk orange	lihat metode Klotz and DeWolfe (1958) untuk isolasi <i>P. citrophthora</i>	
	Daun jeruk	Apungkan daun ukuran kecil kedalam air ketinggian 1-2 cm diatas tanah 100 cc dan lalu pelihara pada suhu 22-28 °C selama 3-4 hari	(Grimm and Alexander 1973)
	Buah kakao	Sisipkan tanah atau jaringan sakit tanaman karet kedalam buah muda seperti pada metode apel Campbell (1949). Pelihara pada suhu 26-30 °C selama 4-5 hari	(Chee and Foong 1968)
	Buah jeruk lemon	Lihat metode Tsao (1960) untuk isolasi <i>P. citrophthora</i>	
	Daun tembakau	Rendam ujung tangkai daun kedalam air yang sudah ditambahkan tanah sebelumnya seperti pada metode Tsao (1960) untuk isolasi <i>P. citrophthora</i>	(Jenkins 1962)

3.5. Umpan *Phytophthora* dari tanah dengan pengapungan toge

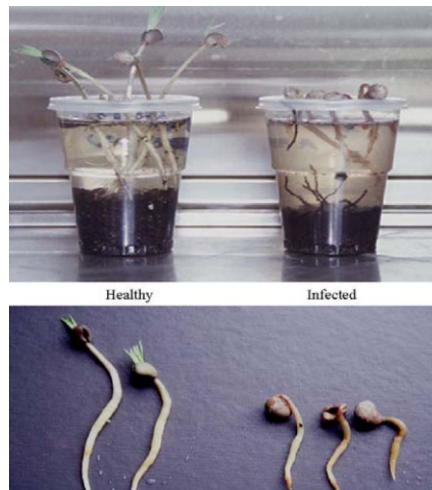
Metode umpan *Phytophthora* merupakan modifikasi dari Pratt dan Heather (1972). Sebagai alternatif, biji kedelai dapat dijadikan sebagai bahan taoge untuk teknik pengumpanan terapung.

Alat dan bahan yang diperlukan dengan metode pengapungan taoge ini antara lain;

- Gelas plastik (225-250 ml) dengan tutup untuk setiap sampel
 - taoge
 - *Vermiculite*
 - Air suling steril dan tidak steril
1. Sterilisasi permukaan biji kedelai dalam alkohol 70% selama 2 menit, bilas dengan air suling steril kemudian biji direndam selama 1 jam dalam air suling steril. Sebanyak 4 sampai 5 biji dimasukkan ke dalam gelas plastik tergantung daya perkecambahan biji tersebut.
 2. Pra perkecambahan taoge dilakukan dalam vermiculite steril yang disimpan pada suhu kamar. Air suling steril diberikan dengan meneteskan ke permukaan biji. Perkecambahan taoge yang baik untuk umpan sepanjang 2-3 cm atau pertumbuhan selama 2 - 3 hari.
 3. Penutup gelas plastik dilubangi sebanyak 5 titik dengan masing-masing diameter 5 mm.
 4. Saat taoge sudah berkecambah sempurna, gelas plastik dimasukkan lapisan tanah setinggi 3 cm dari dasar gelas lalu menambahkan air suling hingga mencapai 1 cm dari penutup dan gelas plastik ditutup yang sudah dilubangi sebelumnya. Pra kecambah taoge diletakkan di atas penutup gelas tersebut dengan membenamkan batang toge melalui lubang penutup kedalam air (Gambar 3.1). Untuk

memperoleh hasil maksimal, volume air suling dalam gelas 5-10 kali lebih banyak dari volume tanah.

5. Pengamatan umpan pengapungan taoge dilakukan setelah 2 - 7 hari. bercak coklat yang muncul pada tunas taoge dilakukan sterilisasi permukaan dan ditumbuhkan ke dalam media selektif. Munculnya busuk lunak pada taoge dapat diasosiasikan dengan busuk *Phytophthora*.



Gambar 3.1. Metode umpan taoge yang diapungkan. *Phytophthora* bisa dipancing keluar dari tanah yang larut dalam air suling dengan pengapungan taoge

3.6. Umpan *Phytophthora* dari tanah menggunakan buah kakao (Metode Chee dan Foong 1968)

Metode umpan *Phytophthora* dengan buah kakao khusus digunakan untuk mengisolasi jenis *P. palmivora* dan *P. meadii* dari tanah.

1. Buah kakao muda dipotong dengan diameter 2 cm pada jaringan buah yang masih berwarna hijau (masih mentah) hingga menyakan lubang pada permukaan buah.

2. Memasukkan tanah yang sudah dilembabkan kedalam lubang sisi buah kakao sampai penuh.
3. Menutup lubang pada sisi buah dengan kantung plastik dan menyimpan buah tersebut pada suhu ruang. Satu buah kakao dapat dilubangi sebanyak 6 sisi untuk diisi sampel tanah
4. Setelah 4-5 hari inokulasi sampel tanah kedalam buah, buah mengalami perubahan warna coklat disekitar lubang. Pembusukan buah secara cepat menandakan adanya infeksi *Phytophthora*, tetapi jika buah membusuk lunak menandakan infeksi oleh patogen sekunder atau saprofit. Untuk memastikan maka beberapa jaringan sehat di permukaan buah sekitar bercak pada lubang inokulasi diambil untuk diperiksa. Jika jaringan diambil dari dalam lubang gorokan, sterilisasi permukaan tidak diperlukan.
5. Potongan jaringan buah tersebut ditanam kedalam media selektif atau agar-agar ekstrak tanah (bagian 4.3) dengan menambahkan 15 g agar-agar per liter ekstrak tanah sebelum diautoklaf.

3.7. Pemeliharaan dan penyimpanan *Phytophthora*

3.7.1. Media biakan

Sebagian besar jenis *Phytophthora* dapat tumbuh baik pada berbagai media seperti media jus V8. Pemeliharaan *Phytophthora* sebaiknya berada pada suhu 15-25 °C di dalam inkubator tanpa cahaya. *Phytophthora* dalam media biakan harus diremajakan setiap dua hingga empat minggu sekali untuk mempertahankan vigornya. Untuk tujuan penyimpanan jangka panjang, penyimpanan kedalam air steril disarankan (seperti di bawah).

Patogenisitas biakan *Phytophthora* akan menurun setelah disimpan dalam waktu lama di dalam media pemeliharaan.

Tetapi patogenisitas biakan *Phytophthora* dapat dibangkitkan dengan menginfeksi ke tanaman inang. Alternatif lain adalah biakan disimpan kedalam nitrogen cair (seperti di bawah) untuk menghindari hilangnya atau berkurangnya patogenisitas dan agresivitas biakan *Phytophthora*.

3.7.2. Pemeliharaan dengan air steril untuk menyimpan lama biakan

Strain *Phytophthora* dipelihara sebagai koleksi biakan dengan dua alasan utama yaitu (i) memberikan gambaran informasi terkait strain *Phytophthora* untuk keperluan penelitian meliputi patogenisitas, virulensi, sistem reproduksi, dan sebagainya, serta (ii) sebagai sumber DNA untuk kajian keragaman genetik dan evolusi. Biakan *Phytophthora* dapat disimpan dengan dua cara yaitu kedalam air steril dan nitrogen cair.

Untuk penyimpanan biakan *Phytophthora* ke dalam media air steril, diperlukan langkah langkah antara lain memotong kecil kecil persegi 8-10 buah dari biakan yang masih tumbuh aktif, dan meletakkannya ke dalam botol gelas yang berisi air suling yang telah disterilkan sebelumnya. Penutup botol gelas dikencangkan selama penyimpanan dan botol gelas tersebut disimpan pada suhu ruang dalam ruang gelap. Sebagian besar dari jenis *Phytophthora* dapat disimpan dengan metode ini tetapi perlu diingat bahwa isolat akan kehilangan patogenisitas dan agresivitas selama penyimpanan dan tidak dapat digunakan lagi untuk penelitian setelah penyimpanan yang lama. Idealnya, biakan harus diremajakan setiap setahun atau dua tahun sekali. Beberapa jenis *Phytophthora* dapat dirangsang pembentukan spora jantan dan betinanya dalam satu indukan (homothallic species) dengan menambahkan biji kedelai atau

jagung terlebih dahulu ke dalam media pemeliharaan biakan sebelum penambahan air suling steril.

3.7.3. Pemeliharaan dengan nitrogen cair untuk menyimpan lama biakan

Pemeliharaan biakan pada tabung reaksi steril tahan tekanan yang disimpan ke dalam nitrogen cair suhu $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ adalah cara tepat untuk penyimpanan jangka lama sebagian besar *Phytophthora*. Dengan nitrogen cair, biakan dapat dipertahankan kemurnian struktur DNANYa tanpa adanya perubahan patogenisitas atau agresivitasnya. Keuntungan lain dari metode ini adalah lebih efektif dan efisien karena hanya memerlukan pasokan nitrogen cair saja. Pihak laboratorium dapat bekerjasama dengan perusahaan pemasok nitrogen cair setiap dua minggu sekali dengan biaya murah seperti di lab kami. Kelemahan dengan nitrogen cair adalah biaya pemasangan instalasi dan pemeliharaan fasilitas relatif mahal dibandingkan dengan penyimpanan dengan air steril. Kemudian, penyimpanan dengan nitrogen cair cocok untuk biakan skala besar dan laboratorium yang khusus memiliki akses murah pemasok nitrogen cair secara berkelanjutan.

3.7.4. Petunjuk penyimpanan dengan nitrogen cair

Sebelum disimpan ke dalam nitrogen cair, biakan terlebih dahulu disimpan ke dalam tabung reaksi steril tahan tekanan nitrogen cair untuk melindungi biakan pada proses pembekuan. Kami biasanya menggunakan campuran larutan 5% DMSO dan 5% gliserol sebagai pelindung biakan dalam proses penyimpanan (cryoprotectant). Salah satu kunci keberhasilan pemeliharaan *Phytophthora* dengan bahan pelindung biakan (*cryopreservation*) adalah perlambatan pembekuan yaitu penurunan suhu secara

perlahan-lahan 1 °C per menit hingga mencapai suhu -40 °C. Sebab jika penyimpanan dengan sistem pembekuan cepat dapat merusak membran sel yang berdampak buruk pada pertumbuhan biakan. Perlambatan pembekuan dapat dihasilkan dengan menggunakan instrumen khusus untuk pendingin terkontrol atau menempatkan tabung reaksi atau botol gelas tahan tekanan bersama dengan bahan pelindung biakan (cryoprotectant) kedalam kardus styrofoam. Kardus styrofoam disimpan semalam kedalam lemari beku suhu -70 °C. Lapisan kedap udara dari kardus styrofoam membantu perlambatan pendinginan hingga suhu mencapai -70 °C. Biakan yang disimpan didalam lemari beku suhu -70 °C dipindahkan kedalam tabung nitrogen cair. Sebaiknya biakan yang disimpan ke dalam nitrogen cair adalah biakan yang dipelihara pada media rendah nutrisi untuk memacu pembentukan spora. Potongan agar berbentuk cakram yang ditumbuhi oleh miselium dan spora dituang kedalam tabung reaksi atau botol gelas dan disimpan kedalam nitrogen cair. Jenis *P. infestans* dan *P. palmivora* mampu memproduksi spora yang cepat dan melimpah sehingga memerlukan tambahan wadah botol gelas. Kemudian tambahkan larutan pelindung biakan dengan konsentrasi rendah sehingga kepadatan spora dapat diencerkan. Kantung spora juga dapat dipanen dari jaringan tanaman lalu disimpan secara langsung ke dalam nitrogen cair. Tetapi, penting untuk dicatat bahwa kantung spora yang ada di dalam botol tersebut harus diinfeksi ulang ke jaringan tanaman setelah disimpan lama di dalam nitrogen cair. Peremajaan dilakukan karena kemungkinan gelas penyimpanan sudah terkontaminasi dengan bakteri.

Pencairan setelah penyimpanan adalah fase yang kritis dan tabung plastik (vial) atau botol gelas tahan tekanan dapat dikeluarkan dari silinder nitrogen cair untuk disimpan pada suhu

ruang. Biakan dalam botol tersebut didiamkan selama 10-20 menit dahulu sebelum mengambil satu potongan agar biakan untuk dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi media biakan baru. Kemudian dorong potongan agar tersebut untuk mengencerkan bahan pelindung penyimpanan (*cryoprotectant*). Atau, potongan agar tersebut bisa dikeringkan terlebih dahulu diatas kertas saring steril untuk menghilangkan kandungan bahan pelindungnya. Kertas saring akan meresapkan bahan tersebut keluar atau memisahkan dari biakan. Teknik ini akan memulihkan biakan yang relatif cepat tetapi kantung-kantung spora pada media agar sebagian juga akan hilang. Satu cawan petri berisi media bisa memuat sampai 3 potongan agar per tabung reaksi. Setelah tabung reaksi dipindahkan potongan agarnya kedalam cawan petri baru, tabung tersebut dibuang sehingga sangat penting untuk menggandakan biakan di penyimpanan untuk menghindari hal yang tidak diinginkan.

Beberapa teknik penyimpanan jenis *Phytophthora* lebih baik daripada dengan nitrogen cair. Metode *cryoprotectants* dan pembekuan baik digunakan sebagai penyimpanan untuk menghasilkan spora yang melimpah khususnya jenis *P. infestans* dan *P. palmivora*. Penyimpanan biakan dengan nitrogen cair kurang bagus untuk jenis *P. cinnamomi* karena selain pembentukan spora yang rendah, tingkat pemulihan dan perlambatan pemulihan biakan yang sangat rendah pula.

Identifikasi spesies *Phytophthora*

Banyak spesies *Phytophthora* dapat diidentifikasi dengan mudah. Akan tetapi, karena perbedaan morfologi diantara beberapa spesies sedikit dan beragam, klasifikasi pada tingkat spesies relative sulit dilakukan secara akurat. Identifikasi *Phytophthora* berdasarkan kunci taksonomi yang dikembangkan oleh Waterhouse (1963) dan Stamps *et al.* (1990) adalah pedoman utama untuk identifikasi jenis *Phytophthora*, meliputi: karakteristik morfologi kantung spora; morfologi struktur seksual jantan (antheridia) dan betina (oogonia) dan oospora-nya; ada tidaknya pembentukan spora istirahat (klamidiospora); dan morfologi hifa. Pada sub-bab 4.7. dijelaskan mengenai istilah-istilah yang digunakan untuk menggambarkan morfologi *Phytophthora*. Pada bagian ini, dijelaskan metodologi singkat identifikasi beberapa jenis *Phytophthora* yang umum ditemukan di daerah-daerah tropis dan metode ini menjadi rujukan utama untuk identifikasi awal jenis *Phytophthora*.

Banyak percobaan percobaan menunjukkan bahwa jenis *Phytophthora* yang diisolasi dari jaringan sakit atau tanah yang terinfestasi dapat dirinci lebih jauh berdasarkan inang, tempat dimana *Phytophthora* diisolasi. Tabel 4.1 memberikan informasi jenis *Phytophthora* yang ditemukan di Asia Tenggara beserta inangnya.

Tabel 4.1. Jenis *Phytophthora* umumnya ditemukan di Asia Tenggara

Jenis <i>Phytophthora</i>	Inang	Gejala penyakit yang ditimbulkan
<i>P. capsici</i>	Luas meliputi jenis cabai (<i>Capsicum</i>), lada hitam (<i>Piper nigrum</i>), kakao- <i>Theobroma cacao</i> , kacang <i>Macadamia</i> , karet (<i>Hevea</i>), pepaya- <i>Carica papaya</i>	Hawar daun dan busuk akar dan tunas cabai <i>Capsicum</i> Busuk buah dan akar cucurbits (melon, timun, labu) Hawar daun, Bunga dan polong kacang macadamia Busuk pangkal akar lada hitam
<i>P. cinnamomi</i>	Sangat luas (> 1000 species) meliputi alpukat (<i>Persea</i>), nanas dan kacang macadamia	Busuk akar nanas Hawar daun dan kanker tangkai/ cabang macadamia Busuk akar alpukat
<i>P. citrophthora</i>	Beberapa pohon buah-buahan, pohon karet, alpukat dan kakao	Busuk tunas, batang berlendir (gummosis), busuk akar disertai dengan keluar lendir dan busuk coklat pohon jeruk Layu kecamba bibit jeruk
<i>P. colocasiae</i>	Umumnya talas, umbi-umbian, gabi (<i>Colocasia esculenta</i>) juga ditemukan pada tanaman talas yam (<i>Alocasia</i> spp.), dan tanaman sirih-betel (<i>Piper betle</i>)	Hawar daun talas Hawar daun, busuk umbi dan kanker batang banyak jenis keladi

<i>P. heveae</i>	Karet. Alpukat, mangga, kakao dan kelapa (<i>Cocos nucifera</i>)	Busuk buah dan bercak bergaris pohon karet Busuk tunas dan gugur buah kelapa Kanker tangkai alpukat Busuk buah kakao
<i>P. infestans</i>	Inang utamanya adalah jenis Solanum	Hawar daun dan batang pada kentang dan tomat
<i>P. nicotianae</i>	Luas meliputi alpukat, lada hitam, tanaman sirih, kelapa, jeruk, macadamia, pepaya, nenas, karet, talas dan tembakau	Pembuluh batang hitam pada tembakau (Black shank) Busuk coklat, busuk pangkal batang, batang berlendir dan busuk akar pohon jeruk Busuk bongkol nenas Busuk pangkal batang dan hawar kacang macadamia
<i>P. palmivora</i>	Luas meliputi alpukat, lada hitam, tanaman sirih, kakao, jeruk, kelapa, macadamia, jenis palem-paleman, pepaya, nanas, karet, talas, dan tembakau	Buah hitam, kanker batang dan layu pucuk kakao Busuk akar dan buah pepaya Busuk bongkol dan gugur prematur buah kelapa dan palem-paleman Kanker batok kulit durian Bercak hitam bergaris, kanker batok, busuk buah muda, gugur daun abnormal dan hawar pucuk pohon karet Busuk pangkal akar lada hitam

4.1. Biakan

Biakan yang digunakan untuk identifikasi jenis *Phytophthora* sebaiknya berasal dari ujung hifanya, atau perkecambahan tunggal pada spora aktifnya, kantung sporanya atau spora seksualnya (oospora). Penting untuk dicatat bahwa sebagian besar jenis *Phytophthora* tidak menghasilkan spora dan membentuk propagul

dalam media selektif untuk tujuan identifikasi. Oleh sebab itu, pada jenis *Phytophthora* yang diamati, biakan harus dipelihara pada suhu optimum pada media alami seperti media jus V8 (lihat bagian 2.1), media agar wortel atau agar kacang Lima (lihat bagian 4.8.3). Untuk mengidentifikasi isolat *Phytophthora* ke tingkat spesiesnya, produksi struktur aseksual dan seksual sangat membantu dalam identifikasi tingkat spesies. Selain itu, karakteristik miselium, terbentuknya spora istirahat pada media biakan juga dapat membantu proses identifikasi. Teknik untuk menghasilkan struktur aseksual dan seksual disajikan pada bagian 4.3 - 4.5.

4.2. Karakter morfologi

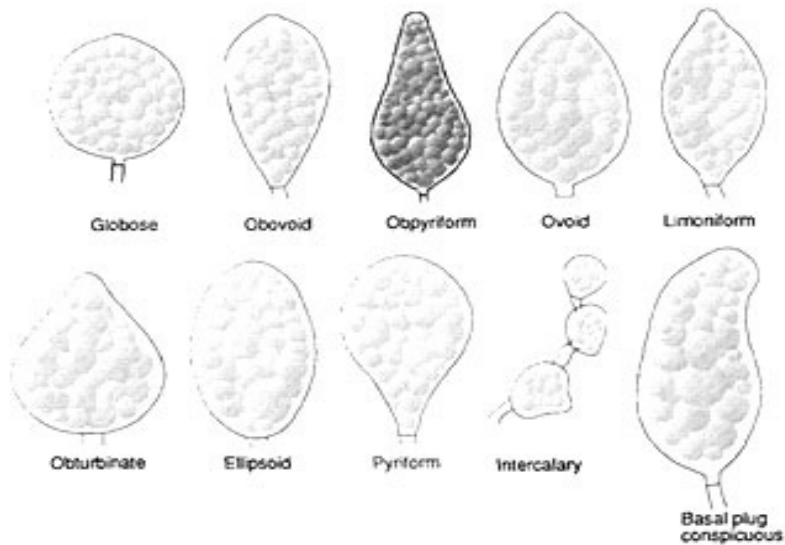
Ada beberapa sejumlah karakter morfologi yang menjadi dasar identifikasi jenis *Phytophthora* antara lain yaitu bentuk kantung spora, tonjolan, dan macam-macam pemisahan kantung spora dengan tangkainya (*caducity*); morfologi tangkai kantung spora; pembentukan spora istirahat (klamidiospora) dan pembengkakan hifa; sisipan spora jantan, dan pembentukan reproduksi seksual yang seragam atau beragam.

4.3. Kantung spora

Proses pembentukan spora pada media tumbuh untuk *Phytophthora* menjadi salah satu penanda identifikasi spesiesnya. Beberapa karakter penting yang perlu diamati antara lain adalah;

- ◆ Morfologi kantung spora (bentuk, ukuran, rasio panjang: lebar) (Gambar 4.1)
- ◆ Tonjolan (*Papillation*) pada kantung spora (Gambar 4.2)
- ◆ *Caducity* (retakan kantung spora saat matang)

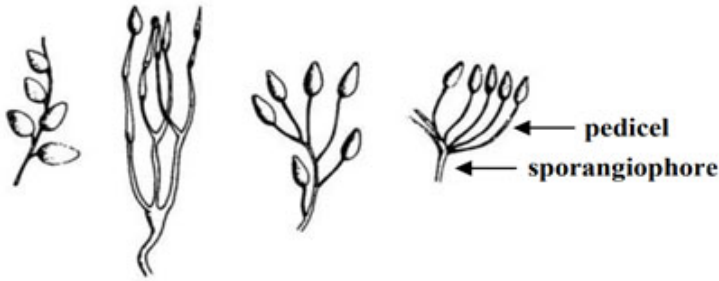
- ◆ Panjang tangkai pada kantung spora
- ◆ Perbanyak kantung spora (produksi kantung spora baru di dalam kantung spora yang telah berkecambah secara langsung)
- ◆ Percabangan tangkai tangkai kantung spora dimana kantung spora terbentuk (Gambar 4.3)



Gambar 4.1 Bentuk-bentuk kantung spora



Gambar 4.2. Jenis-jenis tonjolan di ujung kantung spora



Gambar 4.3. Morfologi tangkai kantung spora (sporangiofor). Kantung spora dengan tangkai pendek menempel tersusun selang seling keatas dalam satu cabang utama (simple Sympodium) (kiri). Kantung spora tersusun selang seling keatas dengan tangkai panjang menempel pada cabang utama (Compound sympodia) (tengah). Tangkai kantung spora panjang menempel secara berkelompok pada cabang utama (Umbellate sympodium) (kanan).

Tidak semua spesies *Phytophthora* dapat menghasilkan kantung kantung spora yang siap ditanam di permukaan media padat (agar). Ada beberapa jenis *Phytophthora* ditumbuhkan terlebih dahulu ke dalam air, larutan garam mineral, atau air ekstrak tanah untuk menghasilkan kantung-kantung spora. Selama pemeliharaan *Phytophthora*, penggunaan lampu sangat penting menentukan keberhasilan produksi kantung-kantung spora (Schmittenner dan Bhat 1994). Tabel 4.2 Panduan secara umum jenis *Phytophthora* yang dapat menghasilkan kantung pada media padat (agar).

Tabel 4.2. Produksi kantung spora pada media padat dan cair

Kantung spora yang dihasilkan pada media agar (padat)	Kantung spora yang dihasilkan pada media cair
<i>P. capsici</i>	<i>P. cambivora</i>
<i>P. heveae</i>	<i>P. cinnamomi</i>
<i>P. megakarya</i>	<i>P. citricola</i>
<i>P. nicotianae</i>	<i>P. cryptogea</i>
<i>P. palmivora</i>	<i>P. drechsleri</i>

4.3.1. Induksi kantung spora kedalam media cair

Air suling

Memotong 0,5 cm² agar dari tepi koloni miselium yang sebelumnya telah ditumbuhkan dengan media agar jus V8 atau media agar wortel. Koloni miselium yang baik yaitu berusia 2-4 hari. Koloni tersebut dipelihara kedalam air suling yang dangkal (atau air kolam atau air larutan garam atau air ekstrak Tanah) yang disimpan di cawan petri suhu antara 22-24 °C. Selama pemeliharaan koloni miselium, penggunaan lampu jenis *fluorescent* siang dan malam sangat dianjurkan. Beberapa spesies *Phytophthora* menghasilkan kantung-kantung spora minimal 12 jam setelah pemeliharaan dan umumnya 1-2 hari.

Air kolam

Beberapa spesies *Phytophthora* menghasilkan kantung-kantung spora saat potongan agar persegi dengan koloni miselium dipindahkan dari media agar kacang lima kedalam air kolam atau air mengalir. Pemeliharaan koloni miselium mengikuti metode air suling.

Perendaman dan pembilasan dengan air garam

Metode pembilasan dengan air garam bermanfaat untuk biakan *P. cinnamomi*.

1. Tumbuhkan koloni biakan pada agar kacang Lima (1,5%), dan pindahkan potongan agar biakan 0,5 cm persegi dari tepi koloni kedalam 25 ml media kaldu kacang Lima. Pemisahan koloni dari agar sangat dianjurkan sebelum koloni dipindahkan kedalam media cair baru tersebut.

2. Setelah 40-48 jam, media biakan cair dibuang dan digantikan dengan 25 ml media larutan Garam Chen-Zentmyer (lihat bagian 4.8).
3. Satu jam kemudian, biakan dipindahkan lagi kedalam media larutan garam baru
4. Ulangi sebanyak tiga kali.
5. Simpan pada ruangan terang setelah pembilasan akhir dengan larutan garam. Kantung spora akan berkembang setelah 5-10 jam.

Ekstrak Tanah

1. Campurkan 10 g tanah kedalam 1 liter air suling.
2. Saring menggunakan kertas saring.
3. Ekstrak tanah diautoklaf. Penggunaan autoklaf tidak dianjurkan apabila patogennya adalah *P. cinnamomi*.
4. Simpan potongan agar biakan seperti metode air suling.

4.4. Spora istirahat dan pembengkakan hifa

Klamidospora adalah spora berdinding tebal yang berfungsi sebagai spora istirahat. Spora istirahat ini dapat terbentuk dari pengapitan hifa (*intercalary*) atau hanya di ujung hifa saja (terminal). Terdapat perbedaan karakteristik pembengkakan hifa yang berdinding tebal dan dibatasi oleh sekat (septa). Tidak ada perbedaan morfologi antara keduanya, sehingga tidak dapat dijadikan sebagai pedoman identifikasi. Tetapi, secara khusus pembengkakan hifa dapat dijumpai pada *P. palmivora*, tetapi tidak pada *P. heveae* sehingga karakteristik hifa ini bisa membantu membedakan spesies antara keduanya. Spora istirahat umumnya diproduksi dengan mudah pada biakan agar dan biakan cair.

4.5. Struktur seksual

Produksi spora seksual, organ seksual jantan dan betina dan uji reproduksi pada perkawinan silang

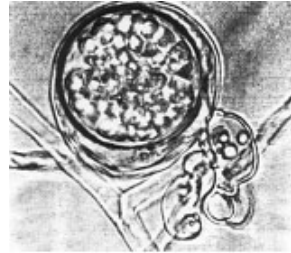
Sekitar setengah dari spesies *Phytophthora* adalah kawin dalam satu spesies. Oogonia, spora jantan dan betina dihasilkan dalam biakan tunggal. Selebihnya adalah kawin silang, dengan dua tipe kawin, A1 dan A2. *Phytophthora* dengan tipe kawin silang menghasilkan gamet betina dan gamet jantan jika hanya ada isolat berbeda tipe kawin yang berada dalam satu biakan sama. Untuk identifikasi di tingkat spesies, menentukan biakan yang berisi jenis *Phytophthora* yang tipe kawin spesies yang sama atau spesies yang berbeda (kawin silang), dan posisi jantan yang menempel di sisi bagian bawah tangkai oogonianya (amphigynous) atau disamping tangkai sebelah tangkai oogonianya (*paragynous*) (lihat Gambar 4.4). tipe kawin isolate yang diuji diperoleh dari biakan yang baik. Silakan menghubungi kami untuk informasi lebih lanjut tentang isolat uji dari spesies *Phytophthora* yang berbeda bisa diperoleh.

Sejumlah media biakan cocok untuk menguji tipe kawin jenis *Phytophthora* seperti media agar tepung jagung, agar wortel dan agar kacang Lima. Sebagian besar spesies *Phytophthora* menghasilkan spora seksual (oospora) dalam biakan tetapi beberapa diantaranya memerlukan media khusus yang mengandung zat aditif seperti sterol untuk merangsang pembentukan oospora. Secara umum yang terbaik adalah mulai dengan agar wortel yang bisa dihasilkan oospora pada sebagian besar spesies *Phytophthora*. Tempatkan 0,5 cm² potongan agar dengan isolat yang belum diketahui pada salah satu sisi cawan petri. Selanjutnya tempatkan juga potongan agar dari isolat uji A1 atau A2 yang diketahui berlawanan arah dengan

isolat sebelumnya. Simpan cawan petri di dalam ruang gelap pada suhu optimal. Setelah 7 sampai 14 hari, oospora terbentuk diantara dua koloni uji jika kedua isolat memiliki tipe kawin yang berbeda.



Bentuk spora seksual (oospora) muda dengan tempelan sel jantan dari sisi samping



Bentuk spora seksual dewasa dengan dengan tempelan sel jantan dari bawah

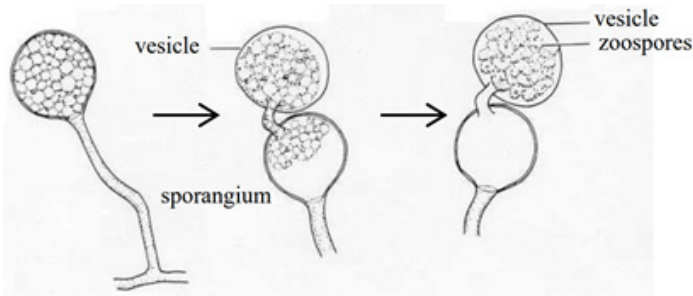
Gambar 4.4 Tempelan organ sel jantan pada sel betina

4.6. Perbedaan antara *Pythium* dan *Phytophthora*

Phytophthora dan *Pythium* termasuk kedalam Famili Pythiaceae sehingga kedua genus tersebut memiliki hubungan dekat. Perbedaan antara keduanya berdasarkan produksi spora aktif (zoospora), kantung spora dan organ seksual jantan.

1. Spora aktif. Spesies *Phytophthora* menghasilkan spora aktif di dalam kantung spora (sporangium) sedangkan spesies *Pythium*, spora aktif berkembang di dalam rongga (*vesicle*) yang terdapat pada kantung spora (Gambar 4.5). Hal yang paling mendasar membedakan antara *Pythium* dan *Phytophthora*. Oleh sebab itu, pada poin 2 dan 3 di bawah hanya sebagai informasi tambahan.
2. Kantung spora. Kantung spora pada *Phytophthora* selalu di ujung hifa dan biasanya berbentuk bulat telur (*ovoid*) atau bulat balon (*obpyriform*) sedangkan kantung spora yang dihasilkan oleh *Pythium* bentuknya bulat sempurna (*globulosa*), bentuk bersusun tiga (*lobate*), atau berbentuk serabut dan berselang seling.

3. Organ seksual jantan. Sel jantan (*antheridia*) pada *Pythium* adalah *paragynous* yang bisa menempel pada sisi samping mana saja dari sel betina (*oogonium*) sedangkan pada *Phytophthora*, sel jantan hanya menempel pada sisi bagian bawah dari sel betina. Selain itu, pada beberapa spesies *Pythium*, banyak sel jantan bisa menempel pada satu sel betina.



Gambar 4.5. Pembentukan rongga pada *Pythium*.

Sebuah rongga (*vesicle*: 'vesək(ə)') terbentuk dari kantung satu spora (sporangium) dan spora aktifnya (zoospora) dihasilkan di dalam rongga tersebut (*vesicle*). Spesies *Phytophthora* tidak memiliki rongga pada kantung sporanya.


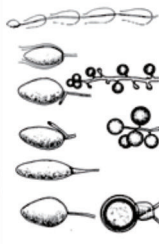
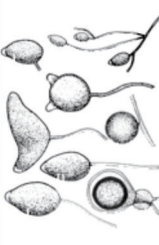
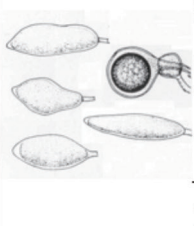


4.7. Daftar istilah-istilah

Istilah (penyebutan)	arti
Amphigynous (amfigines)	: Organ seksual betina tumbuh melalui organ seksual jantan sehingga organ seksual jantan dikelilingi oleh tangkai organ seksual betina
antheridium	: Organ seksual jantan atau gametangium (,gamə'tanjēəm)
caducous (kə'd(y) ōokəs)	: kantung spora yang terpisah dari tangkainya
klamidiospora	: Spora istirahat yang dipisahkan dari miselium oleh satu sekat, bisa juga dipisahkan dari ujung hifa (<i>terminal</i>) atau diantara hifa (<i>intercalary</i>) dengan dinding tebal. Spora istirahat bertahan waktu lama dalam tanah

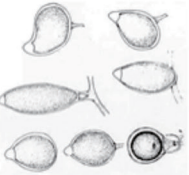

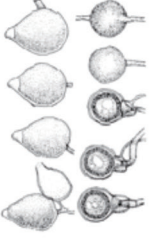
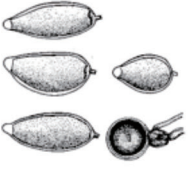


heterothallic (heterotalik)	:	tipe reproduksi seksual melibatkan perkawinan silang dari jenis lain yang berbeda tipe perkawinan seksual A1 dan A2
homothallic (homotalik)	:	tipe reproduksi seksual dengan perkawinan sendiri (hanya memerlukan satu sel jantan dan betina)
Oogonium	:	organ seksual betina (gametangium) dimana oospore terbentuk setelah kawin dengan organ seksual jantan (antheridium)
oospora	:	spora yang berdinding tebal atau zigot ('zī,gōt) yang terbentuk dalam kantung spora atau oogonium (,ōə'gōnēəm) sebagai hasil perkawinan antara organ jantan dan betina.
papila	:	Tonjolan pada pinggir atas kantung spora
paragynous (parajinēs)	:	Organ seksual jantan tersisip pada sisi organ seksual betina yang dikarakteristikan kedalam groups I, III dan V
pedisel	:	tangkai menghubungkan kantung spora dengan tangkai kantong spora lain
sporangiofor	:	tangkai pada kantung spora dihasilkan yang bisa tunggal atau percabangan
Sporangio-spora	:	Spora aktif yang dilengkapi dengan sepasang kaki gerak (,flə'jeləm) terbentuk setelah perkecambahan kantung spora yang juga disebut sebagai zoospora
sporangium	:	Kantung spora dimana spora aktif dihasilkan

Tabel 4.3 Karakteristik morfologi beberapa jenis Phytophthora (diagram and foto diperoleh dari Erwin dan Ribeiro, 1996)

Jenis	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<i>Phytophthora colocasiae</i>
Waterhouse Group	Group II	Group VI	Group II	Group IV
Reproduksi seksual	Kawin silang	Kawin silang	kawin (kadang-kadang)	Kawin silang
Pertumbuhan suhu optimum	28°C	24-28°C	24-28°C	27-30°C
Morfologi				
Kantung spora:				
Tonjolan (papillation)	ada atau tonjolan sedikit (kadang-kadang 2 atau 3 di ujung)	Tidak ada	Ada tonjolan	Ada tetapi tonjolan sedikit. Terlihat dimana kantung spora membentuk tangkainya
Bentuk	Bulat telur (<i>Ovoid</i>), bulat balon (<i>obovoid</i>), bulat pipih (<i>ellipsoid</i>)	Meliputi bulat telur, bulat buah pir (<i>obpyriform</i>), bulat pipih, bulat runcing pangkal bawah	Bermacam-macam dari bulat penuh, bulat telur, bulat buah pir, tumpul (<i>obtrihinate</i>) sampai pipih (<i>ellipsoidal</i>)	Meliputi bulat telur, bulat pipih dan silinder kedua sisinya lancip (<i>fusiform</i>). Tumpul pangkal bawahnya (<i>tapered base</i>) kadang-kadang dengan sisipan kantung spora terpisah dari tangkainya
Sisipan	kantung spora kelihatan terpisah dari tangkai panjang	Kantung sporanya tidak terpisah dari tangkainya. Terbenak di ujung hifa	Kantung spora tidak terpisah dari tangkainya. Biasanya ujung hifa, kadang-kadang tegak lurus (<i>lateral</i>) atau diapit oleh hifa (<i>intercalary</i>)	Kantung spora terpisah dari tangkainya
Percabangan kantung spora (Sporangioophores)	tidak beraturan	Biasanya tanpa percabangan	tidak beraturan	Tidak beraturan
Rasio panjang: lebar kantung spora	Beragam dari 1.3 sampai 2.1	>1.5	Beragam dari 1.2 sampai 2.0	1.6
Organ seksual jantan	menempel pada bagian sisi bawah dari organ sel betina (<i>Paragynous</i>)	menempel pada sisi bawah samping dari organ sel betina (<i>amphigynous</i>)	Tidak diproduksi organ seksual secara alami	Menempel di sisi bawah sel betina, ujung hifa
Organ seksual betina	Bulat sempurna (<i>Globose</i>)	Bulat sempurna, halus dan dindingnya tipis	Bulat sempurna	bulat
Spora seksual (oospore)	Dari bulat sempurna hingga bulang lonjong	Bulat sempurna dan dinding tipis antara 19-54 µm	Sulit dihasilkan dalam media biakan	18-30 µm
Spora istirahat	Melimpah dihasilkan oleh isolat dari kakao, lada hitam dan kacang macadamia	Melimpah dihasilkan dalam biakan, bulat, berdinding tipis. Di Ujung hifa atau diapit oleh hifa, mirip dengan kluster buah anggur antara 3-10	Hanya pada isolat dari kakao	Melimpah pada beberapa isolate tetapi jarang isolate lain. Terbentuk diujung hifa or diantara hifa pada miselium (fase seksual)
Miselium	Seperti tabung, pembengkakan hifa	Menyerupai karang, melimpah pembengkakan hifa dan berongga	Halus atau kasar, ada pembengkakan hifa pada beberapa isolat	Tidak dihasilkan pembengkakan hifa
Perbedaan karakteristik	Tangkai panjang pada kantung spora terpisah dari tangkainya (<i>coelocous</i>), dibandingkan dengan bulat halus, tanpa kantung spora terpisah dari tangkainya pada <i>P. nicotianae</i> and bulat telur, kantung spora bermacam bentuk dengan tangkai pendek pada <i>P. palmivora</i>	Morfologi miselium	Tidak dilaporkan	Tidak dilaporkan

Species	<i>Phytophthora capsici</i>	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<i>Phytophthora colossalis</i>
<p>Karakteristik morfologi</p>	 <p>Tonjolan kantung spora terpisah dari tangkainya. Sepasang tonjolan khas kantung spora (tanan atas) dan pemanjangan pembengkakan hifa</p>	 <p>Kantung spora tanpa tonjolan. Produksi kantung spora secara internal. Spora seksual bulat dengan tempelan spora jantan dari sisi bawah (bawah kiri). Spora istirahat bulat (bawah tengah)</p>	 <p>Satu atau dua tonjolan pada kantung spora. Kantung spora terpisah dari tangkainya. Spora jantan menempel di sisi bawah sel betina (kiri bawah)</p>	 <p>Kantung spora dengan tonjolan sedikit dan hanya dengan tangkai pendek</p>
<p>Tambahan Gambar dan keterangan</p>	 <p>Hifa berbentuk tabung (torulose) dengan pembengkakan hifa</p>	 <p>Hifa berbentuk karang dengan pembengkakan hifa</p>	<p>Daerah tropis dan sub tropis <i>P. nicotianae</i>, <i>P. cinnamomi</i> dan <i>P. palmivora</i> menyerang tanaman jeruk. <i>P. citrophthora</i> aktif di daerah bersuhu moderate (30 °C) sedangkan <i>P. nicotianae</i> aktif di daerah suhu tinggi (>30 °C)</p>	<p>-</p>

Species	<i>Phytophthora heveae</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>
Waterhouse Group	Group II	Group IV	Group II	Group II
Sistem reproduksi	Kawin dalam satu spesies	Kawin silang	Kawin silang	Kawin silang
Pertumbuhan suhu optimum	25°C	20°C	27-32°C	27-30°C
Morfologi				
Kantung spora: Tonjolan (papilla)	ada	Ada tonjolan sedikit	ada	Ada dan tampak jelas
Bentuk	Tak beraturan, bulat buah pir terbalik (obpyriform) to bulat balon (ellipsoid)	Bulat telur (ovoid), bulat balon (ellipsoid) to bulat buah lemon (limoniform)	Bermacam-macam mulai dari bulat balon, bulat telur, bulat buah pir sampai bulat kecil-kecil, dilengkapi dengan tonjolan yang jelas	Umumnya bulat balon and bulat telur, bulat buah pir
Sisipan/tempelan	Kantung spora terpisah dari tangkainya (<i>caudicous</i>)	Kantung spora terpisah dari tangkainya	Kantung spora tidak terpisah dari tangkainya (non-caudicous)	Kantung spora terpisah dari tangkainya
Sporangiophores	Tangkai kantung spora terbentuk pada cabang tak beraturan. Kantung spora sering terbentuk tegak lurus pada tangkainya	Tangkai kantung spora yaitu sepasang kantung spora terbentuk pada satu dan selang selang (compound simpodial) pada satu cabang utama, hifa sedikit memisahkan di bawah kantung spora	Kantung spora tak beraturan atau percabangan selang selang	Kantung spora pada grup ini terbentuk sampai 20 unit berselang seling dalam satu tangkai (sympodium). Tangkai kantung spora pendek
Rasio Panjang dan lebar kantung spora	1.5	1.6	Bermacam-macam dari 1.1 sampai 1.7	Bermacam-macam dari 1.7 sampai 1.9
Organ seksual jantan	Menempel di bawah sel betina, bulat kecil or batang, kadang-kadang bicellular	Menempel di bawah sel betina	Bulat atau pipih, menempel di bawah sel betina	Menempel di bawah sel betina
Organ seksual betina	bulat, bentuk corong dan diproduksi dalam bisakan	Bulat kecil (spherical) sampai obpyriform, berdingding halus	Bulat kecil dan berdingding halus	Bulat kecil (Spherical)
Spora seksual	Oospora bulat, halus dan dinding tebal, 15-28 µm	30 µm	24 µm	23 µm
Spora istirahat	Tidak dihasilkan	Tidak diketahui		
Miselium	Pembengkakan hifa tidak dihasilkan	Pembengkakan hifa tidak dihasilkan	Pembengkakan hifa dihasilkan	Pembengkakan hifa dijumpai pada beberapa isolat.
Perbedaan karakteristik	<i>P. heveae</i> berbeda dari <i>P. colocasiae</i> , <i>P. nicotianae</i> dan <i>P. palmivora</i> by miselium udara kurang dihasilkan dan spora istirahat tidak ada	Belum diketahui	belum diketahui	<i>P. palmivora</i> dibedakan dari tipe kantung selang dengan produksi tonjolan kantung spora yang jelas dengan tangkai pendek dan spora istirahat dihasilkan

Species	<i>Phytophthora keveae</i>	<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Phytophthora palmivora</i>
<p>Karakteristik morfologi</p>	 <p>Tonjolan kantung spora bermacam-macam bentuk. Kantung spora biasanya terbentuk tegak lurus pada tangkainya (bawah tengah)</p>	 <p>Tonjolan sedikit, kantung spora terpisah dari tangkainya (<i>exochous</i>) (kiri). Sel jantan menempel bagian bawah sel betina. Memiliki tangkai kantung spora tegak terstruktur (<i>stimpodial</i>) (kanan).</p>	 <p>Tonjolan kantung spora. Sel jantan menempel sisi bawah sel betina. Spora isratrat terbentuk di ujung dan disipit oleh hifa (kanan bawah)</p>	 <p>Tonjolan tampak jelas dengan kantung spora terpisah dari tangkainya. Kantung spora berkelompok. Tangkai kantung spora sangat pendek dan sel jantan menempel pada sisi bawah sel betina</p>
<p>Tambahan gambar dan keterangan</p>			 <p>Foto kantung spora bermacam-macam bentuk</p>	 <p>Foto kantung spora bulat telur</p>

4.8. Media biakan

4.8.1. Agar wortel

1. Bilas 200 g wortel dan iris tipis
2. Didihkan wortel kedalam 500 ml air suling atau air diionisasi,
3. Blender wortel panas tersebut dengan putaran maksimum selama 40 detik,
4. Remas, aduk dan tapis dengan 4 kali penyaringan tipis,
5. Buatlah suspensi 1 liter dengan air suling,
6. Tambahkan 15 g agar dan didihkan kembali
7. Tuang kedalam cawan petri 40-50 buah dengan lapisan agar yang tipis untuk memudahkan pengamatan di bawah mikroskop.

4.8.2. Agar kaldu kacang Lima

1. Tuang 50 g kacang lima yang sebelumnya dibekukan di dalam 1 liter air suling atau air diionisasi selama 15 menit
2. Kaldu kacang lima disaring dan ditambah hingga menjadi 1 liter larutan stok. Tambahkan 15 g agar dan didihkan.
3. Untuk kaldu kacang lima, jangan menambahkan agar sebelum dipanaskan. Simpan di dalam ruangan tertutup tanpa cahaya

4.8.3. Agar ekstrak kacang

1. Tuang kacang 285 g kacang lima yang sebelumnya dibekukan kedalam 1 liter air suling dan air diionisasi selama 15 menit.
2. Air kaldunya disaring dan cukupkan menjadi 1 liter larutan stok. Tambahkan 15 g agar dan didihkan.
3. Kaldu dibuat dengan tidak menambahkan agar sebelum dididihkan. Simpan dalam ruangan gelap

4. Media biakan ini cocok untuk merangsang pembentukan kantung spora *P. capsici*, *P. erythroseptica*, *P. heveae* dan *P. infestans*.

4.8.4. Larutan garam Chen dan Zentmyer (1970)

Encerkan bahan bahan berikut kedalam 1 liter air suling

Calcium carbonate $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$:	1,64 g
Potassium nitrate KNO_3 :	0,05 g
Magnesium sulphate MgSO_4	0,48 g

Tambahkan 1 ml bubuk besi seperti bahan dibawah ini, dan ukur sampai pH 7.0.

Chelated iron dibuat dari pengenceran bahan bahan dibawah ini kedalam air suling dan buat 1 liter larutan:

Ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA)	13,05 g
Potassium hydroxide (KOH)	7,5 g
Ferrous sulphate (FeSO_4)	24,9 g

Uji inokulasi *Phytophthora* ke jaringan tanaman

Setelah *Phytophthora* diisolasi dari jaringan sakit, ditumbuhkan kedalam biakan murni lalu diidentifikasi pada tingkat spesies karena penelitian lebih lanjut tentang gejala penyakit sering melibatkan inokulasi tanaman inang. Beberapa alasan untuk menginokulasi tanaman inang antara lain sebagai berikut:

- ♦ Menentukan patogenisitas atau kemampuan menyebabkan penyakit dari *Phytophthora* tertentu pada inang. Hal terpenting adalah *Phytophthora* belum pernah berasosiasi dengan inang sebelumnya. Sehingga dengan postulat Koch sangat penting untuk membuktikan bahwa strain *Phytophthora* tersebut yang menyebabkan gejala penyakit sehingga keberadaannya dapat diisolasi dari inangnya lagi.
- ♦ Menentukan agresivitas isolat *Phytophthora*. Uji inokulasi *Phytophthora* ke jaringan tanaman inang bertujuan untuk

menentukan apakah isolat berbeda dari spesies yang sama atau isolat berbeda spesies menyebabkan tingkat penyakit yang sama pada inang lain.

- ◆ Menentukan virulensi isolat *Phytophthora*. Uji virulensi ini bertujuan untuk membedakan strain-strain *Phytophthora* dari spesies yang sama yang mampu meruntuhkan gen-gen ketahanan tanaman inang. Uji ini biasanya dilakukan pada inang-inang spesifik dari *Phytophthora* seperti *P. sojae*, *P. infestans*, *P. vignae* dll.
- ◆ Skrining plasma nutfah untuk ketahanan inang terhadap penyakit menggunakan strain atau spesies *Phytophthora* tertentu.

Banyak cara uji inokulasi *Phytophthora* ke jaringan tanaman tergantung pada jenis *Phytophthora*, jenis tanaman inang yang terlibat dan tingkat pertumbuhan dan perkembangan tanaman inang. Berikut ini secara umum teknik yang sering digunakan:

1. Inokulasi kantung spora kedalam jaringan daun atau buah.
2. Sisipkan miselium ke dalam batang bibit muda.
3. Sisipkan potongan agar dengan biakan (miselium) kedalam lubang pada batang pohon
4. Inokulasi tanah dan penanaman tanaman muda ke dalam tanah yang terinfestasi.

Metode inokulasi *Phytophthora* kedalam jaringan inang yang disebutkan dibawah sebagai langkah awal. Pada setiap kombinasi antara inang dan *Phytophthora* tertentu, Disarankan menggunakan referensi protokol dan prosedur yang lebih rinci dan spesifik.

5.1. Inokulasi kantung spora ke jaringan daun atau buah

Uji inokulasi kantung spora bertujuan untuk melihat ketahanan inang terhadap perbedaan-perbedaan strain dari satu spesies *Phytophthora*. Uji ini secara umum dilakukan pada strain penyebab penyakit daun, seperti *P. infestans* pada kentang dan tomat; *P. colocasiae* pada talas dan *P. palmivora* pada daun durian. Spora *Phytophthora* bisa diperoleh dari bercak dari jaringan inang yang diinokulasi, atau dari media biakan dengan membilas air suling dan memanen spora beberapa jam setelah pembilasan. Sebagai panduan umum, 10-50 μL air suling yang mengandung 10^4 kantung spora/mL diteteskan di atas permukaan daun secara terpisah. Untuk memperoleh hasil maksimal, sebaiknya daun yang digunakan adalah daun muda, kemudian disimpan di dalam talang yang lembab untuk membantu perkembangan penyakit. Hindari kondisi talang terlalu basah sebab memicu busuk lain.

Daun tersebut ditempatkan di atas permukaan media agar atau dimasukkan ke dalam busa agar tidak mengering. Cara lain adalah menempatkan daun di atas kain kasa terlebih dahulu dan kemudian di bawahnya kertas saring basah. Talang tempat daun tersebut ditutup. Dengan kondisi lembab dan tidak ada persentuhan antara daun dan kertas saring basah dapat memperoleh hasil maksimal. Setelah 24 jam, kertas saring basah dikeluarkan dan air yang masih tersisa di permukaan daun dihilangkan dengan membuka tutup talang untuk mencegah pembusukan. Untuk menghindari daun mengalami penuaan dini selagi gejala berkembang, penggunaan hormon tumbuh sitokinin seperti benzimidazole membantu mempertahankan daun hijau. Konsentrasi hormon tumbuh diinokulasikan ke daun sampai 20 ppm, tetapi sebaiknya perlu diuji lebih terlebih dahulu untuk mendapatkan konsentrasi terbaik

sebelum diinokulasikan ke daun. Daun kemudian harus disimpan pada kisaran suhu 20-25°C dengan penerangan 16 jam selama 5-7 hari untuk merangsang perkembangan gejala. Bercak akan berkembang dan pembentukan spora dapat diamati bergantung pada inang dan jenis *Phytophthora* yang digunakan. Perkembangan bercak menunjukkan kerentanan inang. Pada jenis *Phytophthora* lainnya, tingkat perkembangan bercak dapat diukur dan digunakan sebagai indikator ketahanan.

5.2. Penyisipan miselium ke dalam batang bibit

Teknik ini digunakan untuk menskrining ketahanan *Phytophthora* pada tanaman dan menentukan virulensi strain-strain *Phytophthora* misalnya *P. solae* pada kedelai (Ryley *et al.* 1991), *P. vignae* pada kacang tunggak dan kacang lainnya. Tanam 10 biji ke dalam pot dan pada saat fase pembentukan bakal daun (kotiledon), batangnya dilubangi kecil kecil dengan pisau bedah dan lalu media miselium dimasukkan ke dalam pot tersebut. Setelah semua bibit diinokulasi, tanah tempat tumbuh kotiledon disemprot dengan air suling untuk menjaga kelembaban. Pot dilepas 24-48 jam setelah inokulasi. Gejala dapat dilihat 4-6 hari setelah inokulasi. Bibit rentan biasanya menunjukkan perkembangan bercak pada batang lebih cepat sehingga menyebabkan kelayuan dan disusul dengan kematian bibit. Oleh sebab itu, respons bibit pada *Phytophthora* dinilai rentan. Bibit tahan hanya menunjukkan bercak tetapi tetap tumbuh dan berkembang.

5.3. Inokulasi kedalam pohon dewasa

Isolat *Phytophthora* yang ditumbuhkan kedalam agar bisa diinokulasi langsung ke batang pohon. Dengan menggunakan

pelubang tembaga ukuran 10-mm (*cork borer*) untuk melubangi kulit pohon dan jaringan batang 1-1.5 m dari atas tanah. Kemudian memasukkan lingkaran miselium ukuran 10 mm kedalam lubang batang dan menutup dan melilitkan dengan plastik perekat elastis mencegah media dan miselium kering. Panjang bercak yang diamati sama seperti pelunturan warna gelap pada jaringan floem sekunder mulai diukur 6-8 minggu setelah inokulasi. Gejala panjang pelunturan warna pada floem tergantung pada jenis *Phytophthora* dan kerentanan inang.

5.4. Inokulasi ke tanah

Teknik inokulasi *Phytophthora* ke tanah umumnya digunakan untuk sebagian besar *Phytophthora*. Secara garis besar teknik inokulasi disajikan sebagai berikut. Inokulasi agar yang berisi miselium, kantung spora, atau miselium yang tumbuh pada substrat gandum yang sudah diautoklaf. Untuk *P. cinnamomi* yang belum menghasilkan spora, inokulasi dengan substrat alami memberikan hasil maksimal. Campuran substrat alami antara lain 40 ml gandum (atau biji-bijian lain seperti gandum, gandum hitam atau millet) dilarutkan ke dalam 40 ml air suling atau air deionisasi, didiamkan semalam lalu dibilas sampai bersih, dimasukkan ke dalam botol gelas lain yang tahan tekanan sebelum di autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit, dilakukan selama dua hari berturut-turut.

Selanjutnya masukkan ke dalam botol labu 5 - 10 potongan agar yang sebelumnya telah ditumbuhi oleh miselium, botol disimpan pada suhu kamar dan menghindari penggunaan lampu atau cahaya langsung. Setiap hari botol diaduk supaya miselium *Phytophthora* dapat tumbuh rata di seluruh botol labu. Biji gandum yang dipenuhi oleh miselium setelah 2-3 minggu di penyimpanan, dibuat tepung

dengan cara ditumbuk atau digiling dengan penggilingan atau dengan blender. Mengambil 1 gram tepung gandum tersebut dicampur ke dalam 1 liter pasir steril dan dimasukkan ke dalam pot. Selanjutnya menanam benih ke dalam pot tersebut dan benih lain bisa ditanam ke dalam pot yang berisi tanah terinfeksi. Untuk memperoleh hasil infeksi *Phytophthora* yang terbaik, disarankan untuk membasahi dan mengeringkan bibit dalam pot tersebut secara rutin. Kemudian menempatkan cawan petri di bagian bawah setiap pot dan tuangkan air selama 3 hari di samping melakukan penyiraman. Selama 4 hari berikutnya cawan petri dibalik dan tanaman disiram air secukupnya. Dengan penggenangan selama 3 hari dan pengeringan selama 4 hari mendukung produksi kantung spora dan spora aktif dan juga memberikan lingkungan yang baik untuk infeksi *Phytophthora*. Mengairi secara terus menerus akan menyebabkan busuk akar dan akar jenuh air tidak hanya pada perlakuan juga pada pot tanpa inokulasi. Tingkat infeksi akar dapat diketahui dengan menghitung jumlah akar sehat.

Daftar Pustaka

- Bartnicki-Garcia, S., and M.C. Wang. 1983. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, edited by D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Bourke, P.M. 1964. Emergence of potato blight. *Nature* 203:805-808.
- Brasier, C.M. 1983. Problems and prospects in *Phytophthora* research. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, edited by D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Brasier, C.M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*: I. Genetic system, sexuality and the generation of variation. *Annual Review of Phytopathology* 30:153-171.
- Campbell, W.A. 1949. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from the soil. *Plant Disease Reporter* 33:134-135.
- Cavalier-Smith, T. 1986. The kingdom Chromista: origin and systematics. In *Progress in phycological research*, edited by I. Round and D.J. Chapman, Bristol, England: Biopress.

- Chee, K.H. and K.M. Foong. 1968. Use of cacao pod for recovering *Phytophthora* species pathogenic to *Hevea brasiliensis*. *Plant Disease Reporter* 52:5.
- Chen, D.W. and G.A. Zentmyer. 1970. Production of sporangia by *Phytophthora cinnamomi* in axenic culture. *Mycologia* 62:397-402.
- Desjardins, P.R., G.A. Zentmeyer, and D.A. Reynolds. 1969. Electron microscopic observations of the flagellar hairs of *Phytophthora palmivora* zoospores. *Canadian Journal of Botany* 47:1077-1079.
- Drenth, A. 1994. Molecular genetic evidence for a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in Europe. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
- Eckert, J.W. and P.H. Tsao. 1960. A preliminary report on the use of pimaricin in the isolation of *Phytophthora* spp. from root tissues. *Plant Disease Reporter* 44:660-661.
- Eckert, J.W. 1962. A selective antibiotic medium for isolation of *Phytophthora* and *Pythium* from plant roots. *Phytopathology* 52:771-777.
- Elliott, C.G. 1983. Physiology of sexual reproduction in *Phytophthora*. In *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*, edited by D. C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Erwin, D.C. and O.K. Ribeiro. 1996. *Phytophthora diseases worldwide*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Galindo, A.J. and M.E. Gallegly. 1960. The nature of sexuality in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 50:123-128.
- Gerrettson-Cornell, L. 1974. A comparative test of isolation of *Phytophthora cinnamomi* Rands between the lupin baiting and a newly devised apple trap. *Phyton* 32:35-36.

- Grimm, G.R. and A.F. Alexander. 1973. Citrus leaf pieces as traps for *Phytophthora parasitica* from soil slurries. *Phytopathology* 63:540-541.
- Hawksworth, D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., and Pegler D. N. 1995. *Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th ed. Wallingford, UK: CAB International.
- Hendrix, J.W. 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology* 8:111-130.
- Holliday, P. and W.P. Mowat. 1963. *Foot rot of Piper nigrum L. (Phytophthora palmivora)*, *Phytopathological Papers No. 5*: Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Jeffers, S.N. and S.B. Martin. 1986. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease Reporter* 70:1038-1043.
- Jenkins, S.F. 1962. Preliminary studies estimating the disease potential of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in infested tobacco soils. *Plant Disease Reporter* 46:825-826.
- Kannwischer, M.E. and D.J. Mitchell. 1978. The influence of a fungicide on the epidemiology of black shank of tobacco. *Phytopathology* 68:1760-1765.
- Kennedy, D.M. and J.M. Duncan. 1995. A papillate *Phytophthora* species with specificity to *Rubus*. *Mycological Research* 99:57-68.
- Klotz, L.J. and T.A. DeWolfe. 1958. Techniques for isolating *Phytophthora* spp. which attack citrus. *Plant Disease Reporter* 42:675-676.
- Ko, W.H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Journal of General Microbiology* 107:15-18.
- Lee, B.S. and G. Varghese. 1974. Studies on the genus *Phytophthora* in Malaysia. I. Isolation techniques, comparative morphology and physiology and reaction to antibiotics. *Malaysian Agricultural Research* 3:13-21.

- Masago, H., M. Yoshikawa, M. Fukada, and N. Nakanishi. 1977. Selective inhibition of *Pythium* spp. from soils and plants. *Phytopathology* 67:425-428.
- Newhook, F.J. 1978. *Phytophthora cinnamomi* in native forests of Australia and New Zealand: indigenous or introduced? In *Microbial ecology*, edited by M. W. and M. Loutit, J.A.R. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Newhook, F.J., and G.V. Jackson. 1977. *Phytophthora palmivora* in cocoa plantation soils in the Solomon Islands. *Transactions of the British Mycological Society* 69:31-68.
- Orellana, R.G. 1954. Contribution to the study of survival, dissemination and control of *Phytophthora* of cacao. Paper read at 5th International-American Cacao Conference, at Turrialba, Costa Rica.
- Papavizas, G.C., J.H. Bowers, and S.A. Johnston. 1981. Selective isolation of *Phytophthora capsici* from soils. *Phytopathology* 71:129-133.
- Pegg, K.G. 1977. Soil application of elemental sulphur as a control of *Phytophthora cinnamomi* root and heart rot of pineapple. *Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbandry* 17:859-865.
- Pratt, B.H. and W.A. Heather. 1972. Method for rapid differentiation of *Phytophthora cinnamomi* from other *Phytophthora* species isolated from soil by lupin baiting. *Transactions of the British Mycological Society* 59:87-96.
- Ryley, M.J., N.R. Obst, and G.E. Stovold. 1991. A new race of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* on soybean in Australia. *Australasian Plant Pathology* 20:97-100.
- Satyprasad, K. and P. Ramaro. 1980. A simple technique for isolating *Phytophthora palmivora* from the soil. *Current Science* 49:360-361.

- Schmitthenner, A.F. and R.G. Bhat. 1994. *Useful methods for studying Phytophthora in the laboratory*. Wooster, Ohio, USA: Department of Plant Pathology, Ohio Agricultural Research and Development Centre.
- Stamps, D.J., G.M. Waterhouse, F.J. Newhook, and G.S. Hall. 1990. *Revised tabular key to the species of Phytophthora*, Institute of Mycology Paper 162: Agricultural Bureau of International Mycology Institute.
- Thompson, J. N. and J. J. Burdon. 1992. Gene-for-gene evolution between plants and parasites. *Nature* 360:121-125.
- Tsao, P.H. 1960. A serial end-point dilution method for estimating disease potentials of citrus *Phytophthoras* in soil. *Phytopathology* 50:717-724.
- Tsao, P.H. 1990. Why many *Phytophthora* root rots and crown rots of tree and horticultural crops remain undetected. *OEP/EPPO Bulletin* 20:11-17.
- Tsao, P.H. and G. Ocana. 1969. Selective isolation of species of *Phytophthora* from natural soils on an improved antibiotic medium. *Nature* 223:636-638.
- Turner, P.D. 1965. Behaviour of *Phytophthora palmivora* in soil. *Plant Disease Reporter* 49:135-137.
- van de Peer, Y., G. van der Auwera, and R. De Wachter. 1996. The evolution of stramenopiles and alveolates as derived by substitution rate calibration of small ribosomal subunit RNA. *Journal of Molecular Evolution* 42: 201-210.
- van der Plaats-Niterink, A.J. 1981. *Monograph of the genus Pythium*, Studies in Mycology No. 21. Baarn, Netherlands: Centraalbureau voor Schimmel cultures.
- Wang, M. C. and S. Bartnicki-Garcia. 1973. Novel phosphoglucans from the cytoplasm of *Phytophthora palmivora* and their selective occurrence in certain life cycle stages. *Journal of Biological Chemistry* 248:4112-4118.
- Waterhouse, G.M. 1963. *Key to the species of Phytophthora de Bary*, Mycological Papers No. 92: Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.

- Zentmyer, G.A. 1980. *Phytophthora cinnamomi and the diseases it causes, Monograph No. 10*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Zentmyer, G.A., J.D. Gilpatrick, and W.A. Thorn. 1960. Methods of isolating *Phytophthora cinnamomi* from soil and from host tissue. *Phytopathology* 50:87.



MUHAMMAD JUNAID, SP., MP., PHD. adalah dosen pada Departemen Hama dan Penyakit Tumbuhan/ Proteksi Tanaman dan Prodi Agroteknologi sejak tahun 2008 dan pada Prodi Sarjana Terapan Vokasi Fakultas Pertanian Universitas Hasanuddun sejak tahun 2019. Penulis aktif pada Perhimpunan Fitopatologi Indonesia 2020 Komda Sulsel sebagai Sekretaris. Anggota Australiasia Phytopathological society (APPS) sejak 2016 sampai sekarang. Aktif pada kajian multidisiplin sekaligus sebagai

sekretaris Centre Interdisciplinary Sustainability Sciences mulai tahun 2019 di Pasca Sarjana Unhas dan kajian Sustainable Development Goals (SDGs) Unhas. Semasa kuliah S1 aktif sebagai asisten dosen pada kegiatan praktikum dan juga aktif pada kegiatan kemahasiswaan di tingkat Jurusan, Fakultas maupun di Universitas. Selain itu, menjadi asisten dosen memegang matakuliah dasar-dasar perlindungan tanaman, ilmu penyakit tumbuhan, dan mikrobiologi pertanian. Tahun 2006 menyelesaikan studi pada program Magister Ilmu-Ilmu Pertanian konsentrasi Organisme Pengganggu Tumbuhan Pasca Sarjana Unhas. Tahun 2009, memperoleh beasiswa Norman Borlaug bidang kakao kerjasama Departemen Pertanian US (USDA) dan World Cocoa Foundation (WCF) fokus mendalami teknik diagnosis secara molecular patogen penyebab penyakit Vascular streak dieback tanaman kakao. Selama kegiatan di USDA, penulis memperoleh penghargaan sebagai mahasiswa kehormatan pada kegiatan tahunan Pennsylvania Manufacture Confectionary Associations (PMCA). Tahun 2014, penulis mendapat kesempatan mempresentasikan pokok pokok pikiran cocoa farming in Indonesia: present challenges di forum yang sama di PMCA. Tahun yang sama (tahun 2014) penulis melanjutkan pendidikan Doktor (S3) pada Prodi School of Life and Environmental Sciences, The University of Sydney, Australia pada konsentrasi ilmu penyakit tumbuhan dan memperoleh gelar Doktor dalam bidang pertanian tahun 2019. Selama menempuh kuliah S3, penulis memperoleh penghargaan sebagai Mahasiswa terbaik yang diterbitkan oleh direktur Centre for English Teaching, The University of Sydney. Penulis telah mempublikasikan puluhan artikel-artikel pada jurnal, Proceeding, buku/Majalah bereputasi baik skala nasional dan internasional. Penulis juga aktif sebagai pembicara pada forum lokal, nasional dan Internasional terkait isu perlindungan tanaman dan SDGs.

Perumdos UNHAS Jl. Isaac Newton Blok R 42B Tamalanrea, Makassar 90245 | Email: muhammad.junaid@agri.unhas.ac.id | Author ID-SINTA: 6038586 | SCOPUS ID: 54795337200 | ORCID :0000-0002-7116-5887



Gedung UPT Unhas Press
Kampus Unhas Tamalanrea, Jl. Perintis Kemerdekaan Km.10
e-mail: unhaspress@gmail.com
Makassar

