

Abstrak dan Executive Summary

PENELITIAN HIBAH BERSAING



PRODUKSI BIOMATERIAL BERBAHAN *Ralstonia solanacearum* DENGAN TEKNIK MOLEKULAR DAN PRODUKSI MASSAL AGENSIA PENGENDALI HAYATI BERBASIS BAKTERIOFAG

Tahun ke I (Pertama) dari Rencana 3 Tahun

TIM PENGUSUL

**(Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D., NIDN: 0009118004)
(Erlia Narulita, S.Pd., M.Si., NIDN: 0005078004)**

**UNIVERSITAS JEMBER
November 2016**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : **Produksi Biomaterial Berbasis Ratan (Coniosolanaccarum dengan Teknik Molekular dan Proclul;sj Massa! Agens,a Pengendali Hayati Berbas1> Bal:imofag**

~ndid/Pelaksana
 Nama Lengkap : **HARDIAN SUSILO ADDY S.P.M.P.PbJ)**
 Perguruan Tinggi : Universitas **Jember**
 NIDN : 0009118004
 Jabatan Fungsional , **Lektor**
 Program Studi ; **Biotcknologi**
 NomorHP ; **082141331654**
 Alamat surel (c-maal) , **h"<ldy.fal>el'UI"unej.ac.id**
 Anc,ou, (I)
 Nama Lenatap : **FRIIA NARUIITA S Pd..MS,**
 NIO° . **0005078004**
 l!:JJW"l.>D Tana,, : **UniversilM Jember**
 lns111u" Malla (aka Ida)
 Nama ln'-lltU,J\11tt1 :
 Alanw
 P<nanuung Ja\0111>
 Tahun PelW1.111aan . **Tahun ke I dan rencana 3 tahun**
 Baaya Tabun Berjalan . **Rp 50.000.000.00**
 Baaya Keseluruhan : **Rp 22.'i.000.000.00**



Jember, 29 • II • 2016
 KC1U:a,



(HARDIAN SUSILO ADDY S P. M.P. PhD)
 NIP/NIK J9roJ J0920050110()1



RD)~
 /

Produksi Biomaterial Berbahan *Ralstonia solanacearum* dengan Teknik Molekular dan Produksi Massal Agensia Pengendali Hayati Berbasis Bakteriofag

Hardian Susilo Addy*^{1,2} dan Erlia Narulita^{1,3}

¹Divisi Biologi Molekul dan Bioteknologi, *Center for Development of Advanced Sciences and Technology*. Universitas Jember

²Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember

³Jurusan Pendidikan Biologi, Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan

*email korespondensi: hsaddy.faperta@unej.ac.id

ABSTRAK

Upaya pengendalian bakteri layu akibat *Ralstonia solanacearum* masih harus terus dikembangkan mengingat bakteri patogen ini termasuk ke dalam *soild-borne* pathogen yang sulit dikendalikan. Untuk menunjang pertanian berkelanjutan, maka upaya pengendalian haruslah efektif, efisien dan ramah lingkungan. Salah satu alternatifnya adalah dengan pemanfaatan bakteriofag yang telah diketahui efektif dan efisien mampu mengendalikan bakteri patogen. Namun dalam pengembangannya sebagai agensia hayati yang dapat diaplikasikan dalam skala besar, diperlukan upaya produksi massal. Tidak seperti agensia hayati lainnya, produksi massal bakteriofag memerlukan bakteri inangnya, namun dalam prosesnya, bakteri inangnya harus dipisahkan dengan partikel bakteriofagnya karena bakteri inang bersifat virulen dan berbahaya bagi tanaman. Hal inilah yang menyebabkan kurang efisiennya produksi massal bakteriofag dalam bentuk siap aplikasi sehingga diperlukan bahan atau biomaterial yang aman yaitu dengan menggunakan strain avirulen. Seiring telah ditemukannya gen *phcA* yang diketahui bertanggungjawab pada virulensi dan patogenisitas *R. solanacearum*, maka mutasi pada gen ini dapat menyebabkan hilangnya virulensi. Oleh karena itu, melalui produksi biomaterial berbahan *R. solanacearum* yang avirulen akan dapat mengatasi permasalahan tersebut dan produksi massal bakteriofag akan semakin mudah dalam menghasilkan produk APH dan cara aplikasinya. Tujuan penelitian ini dapat terpenuhi melalui rancangan penelitian yang dibuat dalam jangka waktu 3 tahun. Pada tahun pertama akan dilakukan pembuatan/konstruksi genetic untuk menghasilkan biomaterial (strain avirulen) melalui aktivitas konstruksi plasmid, tranformasi genetik, dan seleksi mutan. Hasil pada capaian saat ini yaitu telah diperoleh *backbone vector* untuk mengkonstruksi pSK+*phcA*::Kan^r yang selanjutnya digunakan untuk proses mutagenesis dan menghasilkan mutan *phcA*::Kan^r.

Kata Kunci: *Ralstonia solanacearum*, Bakteriofag, Pengendali Hayati

RINGKASAN

Upaya pengendalian bakteri layu akibat *Ralstonia solanacearum* masih harus terus dikembangkan mengingat bakteri patogen ini termasuk ke dalam *soild-borne* pathogen yang sulit dikendalikan. Untuk menunjang pertanian berkelanjutan, maka upaya pengendalian haruslah efektif, efisien dan ramah lingkungan. Salah satu alternatifnya adalah dengan pemanfaatan bakteriofag yang telah diketahui efektif dan efisien mampu mengendalikan bakteri patogen. Namun dalam pengembangannya sebagai agensia hayati yang dapat diaplikasikan dalam skala besar, diperlukan upaya produksi massal. Tidak seperti agensia hayati lainnya, produksi massal bakteriofag memerlukan bakteri inangnya, namun

dalam prosesnya, bakteri inangnya harus dipisahkan dengan partikel bakteriofagnya karena bakteri inang bersifat virulen dan berbahaya bagi tanaman. Hal inilah yang menyebabkan kurang efisiennya produksi massal bakteriofag dalam bentuk siap aplikasi sehingga diperlukan bahan atau biomaterial yang aman yaitu dengan menggunakan strain avirulen. Seiring telah ditemukannya gen *phcA* yang diketahui bertanggungjawab pada virulensi dan patogenisitas *R. solanacearum*, maka mutasi pada gen ini dapat menyebabkan hilangnya virulensi. Oleh karena itu, melalui produksi biomaterial berbahan *R. solanacearum* yang avirulen akan dapat mengatasi permasalahan tersebut dan produksi massal bakteriofag akan semakin mudah dalam menghasilkan produk APH dan cara aplikasinya. Adapun target yang ingin dicapai melalui penelitian ini adalah dihasilkannya biomaterial produksi massal bakteriofag yang aman melalui pendekatan bioteknologi molekular yaitu mutasi genetik pada gen pengatur virulensi (*phcA*) yang akan dipublikasikan sekurang-kurangnya pada Jurnal Internasional, atau pada pertemuan seminar internasional. Selain itu, pada akhir penelitian ini diharapkan telah diusulkan satu draf paten untuk biomaterial yang dihasilkan selain produk berupa agensia pengendali hayati berbasis bakteriofag siap pakai. Tujuan dan target ini dapat terpenuhi melalui rancangan penelitian yang dibuat dalam jangka waktu 3 tahun. Pada tahun pertama akan dilakukan pembuatan/konstruksi genetik untuk menghasilkan biomaterial (strain avirulen) melalui aktivitas konstruksi plasmid, transformasi genetik, dan seleksi mutan. Hasil pada capaian saat ini yaitu telah diperoleh backbone vector untuk mengkonstruksi pSK+*phcA*::Kan^r yang selanjutnya digunakan untuk proses mutagenesis dan menghasilkan mutan *phcA*::Kan^r.

PRAKATA

Puji syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT, atas rahmat dan karunia Nya penulis dapat menyelesaikan Laporan Tahunan Penelitian Skim Hibah Bersaing yang berjudul “Produksi Biomaterial Berbahan *Ralstonia solanacearum* dengan Teknik Molekular dan Produksi Massal Agensia Pengendali Hayati Berbasis Bakteriofag”. Penelitian ini dilaksanakan berdasarkan Dibiayai oleh Direktorat Jenderal Penguatan Riset dan Pengembangan, Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi Nomor: No. 0581 /E3/2016. Tersusunnya Laporan Tahunan penelitian ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak, karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ir. Sigit Soepardjono, M.S., Ph.D selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Jember
2. Prof. Dr. Bambang Sugiharto, M.agr selaku Ketua *Center for Development of Advanced Sciences and Technology*.
3. Semua pihak yang telah membantu dalam penulisan Laporan Tahunan Penelitian ini.

Penulis berharap semoga Laporan Tahunan Penelitian ini memberikan manfaat dan pertimbangan untuk dapat terus diselesaikan hingga keseluruhan peta jalan penelitian yang direncanakan.

Jember, 20 November 2016

Penulis

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakteri *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit penting pada tanaman budidaya. Menurut Hayward (2000) bahwa bakteri ini memiliki kisaran inang yang cukup luas yang meliputi 200 spesies dari 50 famili tanaman dan telah menyebar di seluruh dunia. Berbagai strategi pengendalian telah diterapkan seperti modifikasi tanah, penggunaan pestisida kimia, rotasi tanaman, dan penggunaan varietas tanaman tahan (Denny, 2006). Modifikasi pH maupun solarisasi tanah dianggap efektif menekan populasi bakteri ini, namun hal ini hanya efektif pada skala kecil (Champoiseau, *et al.*, 2009). Begitupula teknik pengendalian dengan rotasi tanaman yang dianggap kurang efektif dikarenakan *R. solanacearum* memiliki kisaran inang yang luas serta memiliki kemampuan bertahan hidup yang lama di dalam tanah (Adhikari & Basnyat, 1998). Meskipun penggunaan kultivar tanaman tahan merupakan salah satu teknik pengendalian yang dianggap paling efektif, namun masih belum dapat mengatasi masalah dikarenakan kemampuan produksi kultivar tahan yang membutuhkan waktu dan terkadang berdampak pada kualitas hasil yang kurang memuaskan (Boucher *et al.*, 1992). Oleh karena itu alternatif pengendalian yang lebih efektif, aman dan tidak berdampak buruk bagi lingkungan masih diperlukan dan salah satu upaya yang bisa dilakukan yaitu melalui pemanfaatan agensia yang mampu menginduksi ketahanan tanaman maupun penggunaan bakteriofag yang mampu membunuh bakteri patogen tersebut (Fujiwara *et al.*, 2011).

Pemanfaatan bakteriofag secara umum terus berkembang sebagai strategi pengendalian bakteri patogen yang dikenal dengan terapi fag (*Phage therapy*). Addy *et al.* (2012) mendemonstrasikan bakteriofag yang mampu menginfeksi *R. solanacearum* dan juga mampu melindungi tanaman dari penyakit layu bakteri. Begitupula, Fujiwara *et al.* (2011) menemukan bakteriofag yang mampu membunuh dan efektif mengendalikan penyakit layu akibat *R. solanacearum*. Meskipun demikian, pemanfaatan dan pengembangan bakteriofag sebagai agensia pengendali hayati masih harus dikembangkan, mengingat bakteriofag menggunakan inangnya sebagai material untuk memperbanyak diri (Frampton *et al.*, 2012). Untuk itu, dalam produksi massalnya, bakteriofag harus dipisahkan dari bakteri inangnya selama proses produksi massal (Fujiwara *et al.*, 2011) dan hal ini menjadi salah satu kendala bagi pengembangan bakteriofag. Apabila bakteri inang tidak dipisahkan, maka bakteri tersebut dapat menyebabkan gangguan pada tanaman jika diaplikasikan bersamaan dengan aplikasi bakteriofag. Oleh karena itu diperlukan inovasi dalam pembiakan massal

bakteriofag terutama dalam penggunaan biomaterial produksi, misalnya dengan penggunaan strain bakteri yang avirulen.

Bakteri *R. solanacearum* strain avirulen telah banyak dilaporkan untuk diaplikasi pada tanaman dikarenakan memiliki peran dalam menginduksi ketahanan tanaman terhadap infeksi *R. solanacearum* strain virulen. Menurut Trigalet & Trigalet-Demery, (1990) bahwa strain avirulen dapat dibuat/dihasilkan melalui mekanisme mutasi spontan. Namun cara tersebut beresiko tinggi dikarenakan kurang stabilnya mutan atau adanya kemungkinan mutan tersebut kembali menjadi virulen (Tanaka *et al.*, 1990), sehingga diperlukan cara lain untuk membuat mutan yang lebih stabil diantaranya melalui teknologi molekular yaitu melalui mekanisme *homologous recombination* (Addy *et al.*, 2014).

Baru-baru ini Chen *et al.* (2015) berhasil mendemonstrasikan peranan gen yang mengontrol virulensi dari *R. solanacearum* yaitu gen *phcA*. Menurut Yoshimochi *et al.* (2009) dan Trigalet & Trigalet-Demery (1990) bahwa mutasi pada gen ini menyebabkan bakteri menjadi avirulen secara permanen. Addy *et al.* (2012) juga melaporkan bahwa gangguan aktivitas pada gen tersebut, menyebabkan ketidakstabilan virulensi pada *R. solanacearum*. Oleh karena itu, melalui mutasi gen, bakteri *R. solanacearum* akan menjadi strain avirulen yang selanjutnya dapat digunakan sebagai biomaterial untuk produksi massal bakteriofag yang aman dan sederhana.

Bab 2. TINJAUAN PUSTAKA

Ralstonia solanacearum merupakan bakteri patogen tumbuhan penting yang menyebabkan kerugian besar pada tanaman budidaya. Tanaman yang terinfeksi bakteri ini umumnya menjadi layu dan mati, sehingga tidak bisa berproduksi (Hayward, 2000). Pada tanaman tomat, infeksi bakteri ini menyebabkan tanaman mati selambat-lambatnya 5 hari setelah infeksi (Addy *et al.*, 2012). Pada beberapa kasus, infeksi bakteri ini dapat menyebabkan kerugian hingga 100% seperti yang dilaporkan di Kenya (Muthoni *et al.*, 2012), 80% pada tomat di Nigeria (Abeokuta *et al.*, 2014), begitupula di Indonesia (Kumar & Sarma, 2004). Untuk mengatasi kerugian dan kehilangan hasil tersebut, maka perlu dilakukan upaya pengendalian. Banyak teknik pengendalian yang dapat dilakukan, namun masing-masing teknik tersebut memiliki beberapa kekurangan termasuk beresiko bagi lingkungan dan manusia seperti modifikasi tanah dan penggunaan pestisida kimia (Denny, 2006). Modifikasi pH yang hanya efektif pada skala kecil (Champoiseau, *et al.*, 2009), rotasi tanaman gagal karena kisaran inang yang luas (Adhikari & Basnyat, 1998), bahkan

produksi kulitavar tahan yang lama (Boucher *et al.*, 1992). Oleh karena itu, banyak peneliti merekomendasikan upaya pengendalian dengan cara yang lebih aman seperti penggunaan bakteriofag yang telah berhasil dikembangkan pada patogen manusia dan hewan (Endersen *et al.*, 2014).

Bakteriofag merupakan virus yang hanya menginfeksi dan berkembang pada sel bakteri inangnya (Sulakvelidze *et al.*, 2001). Kemampuan bakteriofag untuk infeksi dan berkembang pada bakteri sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor di antaranya faktor kespesifikan inangnya (Askora *et al.*, 2009). Telah banyak dilaporkan bahwa terdapat bakteriofag yang mampu menginfeksi bakteri patogen tumbuhan dengan kespesifikan infeksi yang berbeda-beda seperti yang dilaporkan oleh Yamada (2012) bahwa terdapat beberapa jenis bakteriofag yang mampu menginfeksi patogen layu yang disebabkan oleh bakteri *R. solanacearum*, bakteriofag pada patogen hawar api yang disebabkan oleh *Erwinia amylovora* (Nagy *et al.*, 2007), bakteriofag pada patogen kudis pada kentang yang disebabkan oleh *Streptomyces scabies* (McKenna *et al.*, 2001), dan bakteriofag pada patogen kanker jeruk yang disebabkan oleh *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Ahmad *et al.*, 2014). Menurut Hyman and Abedon (2010) bahwa kemampuan infeksi bakteriofag terhadap inangnya melalui uji kisaran inang berbeda-beda tergantung pada spesies inangnya, sehingga bakteriofag yang menginfeksi spesies bakteri yang satu tidak dapat menginfeksi spesies bakteri lain. Kemampuan inilah yang dimanfaatkan oleh beberapa peneliti untuk dijadikan agensia terapi untuk beberapa kasus serangan patogen tumbuhan dari kelompok bakteri atau yang dikenal dengan sebutan terapi bakteriofag atau *Phage Therapy* (Endersen *et al.*, 2014).

Dalam pemanfaatannya, pengembangan bakteriofag pada skala besar dapat dicapai dengan melakukan produksi massal menggunakan bahan dan media yang tepat. Menurut Hagens & Loessner (2010) bahwa salah satu syarat untuk produksi massal bakteriofag adalah penggunaan strain non-patogenik atau non-virulen baik dengan bahan tambahan maupun partikel bakteriofag murni dari hasil pembiakan bakteri dalam kultur cair. Salah satu kendala adalah penggunaan strain non-virulen (avirulen), oleh karena itu dalam prosesnya, partikel bakteriofag harus dipisahkan dari sel inangnya (Wittebole *et al.*, 2013).

Salah satu cara dalam teknik pengendalian hayati berbasis mikrob adalah melalui pemanfaatan bakteri-bakteri dari strain avirulen. Menurut Lindgren, (1995) bahwa telah banyak penelitian yang membuktikan bahwa pemanfaatan strain avirulen telah berhasil mengendalikan penyebab penyakit terutama akibat infeksi bakteri dari strain virulen.

Sebagai contoh adalah penggunaan strain avirulen *R. solanacearum* mampu mengendalikan *R. solanacearum* strain virulen pada tomat (Addy *et al.*, 2012). Begitupula Hanemian *et al.* (2013) mengatakan bahwa *R. solanacearum* strain avirulen memiliki kemampuan untuk melindungi tanaman terhadap infeksi strain virulen akibat terinduksinya ketahanan tanaman.

Umumnya strain avirulen dapat diperoleh melalui dua cara yaitu melalui mekanisme mutasi spontan yang cenderung bersifat alami dan tidak stabil (Poussier *et al.*, 2003; Brumbley *et al.*, 1993) atau melalui mutasi genetik yang sifatnya cenderung stabil (Chen *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2011). Mutasi genetik untuk menghasilkan strain avirulen diketahui memiliki keunggulan karena sifatnya yang permanen sehingga pada aplikasinya di lingkungan tetap bersifat ramah lingkungan. Untuk menghasilkan strain avirulen pada *R. solanacearum*, beberapa peneliti telah melaporkan bahwa terdapat beberapa gen yang dikarakterisasi berhubungan erat dengan virulensi bakteri tersebut. Sebagai contoh gen *monT* yang mengontrol aktivitas pergerakan bakteri di dalam jaringan tanaman (Meng *et al.*, 2011), *hrp* yang mengontrol patogenesis bakteri (Lindgren, 1995), gen *popS* yang merupakan salah satu dari efektor penting bagi virulensi (Jacobs *et al.*, 2013) dan juga gen *phcA* yang diketahui merupakan gen yang mengontrol ekspresi semua gen virulensi yang telah disebutkan sebelumnya (Chen *et al.*, 2015). Teknik yang umum digunakan untuk memperoleh mutant ini dapat dilakukan dengan memanfaatkan teknik biologi molekular yaitu homologous recombination menggunakan disain plasmid unik yang dikenal dengan *suicide plasmid* (Addy *et al.*, 2014).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

3.1 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah

1. Menghasilkan biomaterial berbasis *R. solanacearum* avirulen melalui teknik mutasi genetika pada gen *phcA*.
2. Melakukan pengujian sifat unggul biomaterial baik sebagai bahan produksi massal bakteriofag ϕ SKD1 maupun sebagai biomaterial penginduksi ketahanan tanaman
3. Menghasilkan produk agensia pengendali hayati berbasis bakteriofag yang unggul.

3.2 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan diperoleh sebuah terobosan baru dalam produksi biomaterial yang memiliki peran ganda baik sebagai bahan pembiakan massal bakteriofag

yang aman dan dapat langsung diaplikasikan, juga dapat berperan membantu meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyebab penyakit.

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Perbanyakan Bakteri *Eschericia coli* XL10 Gold, *Ralstonia solanacearum* dan Propagasi Bakteriofag

Isolat bakteri *R. solanacearum* SKD strain virulen dapat diperoleh dari koleksi Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian Universitas Jember. Isolat bakteri ditumbuhkan pada media CPG baik cair maupun padat (Addy *et al.*, 2012) dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Isolat bakteri *E. coli* XL10Gold (membawa plasmid pBluescript II SK(+)) diremajakan dan diperbanyak dalam media LB-broth yang mengandung 100 ppm antibiotik ampisilin dan diinkubasikan pada suhu 37°C dengan agitasi 150 rpm selama semalam.

Partikel bakteriofag ϕ SKD1, ϕ RA diperoleh dari koleksi milik Hardian Susilo Addy, Ph.D, Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Jember. Partikel bakteriofag diperbanyak dengan metode *plaque assay* seperti yang dilakukan mengikuti Askora *et al.* (2009) dengan cara menambahkan 100 μ l suspensi filtrat yang mengandung bakteriofag ke dalam 250 μ l suspensi bakteri *R. solanacearum* SKD (yang telah diremajakan) dan diinkubasikan selama 2 jam pada suhu 28°C. Selanjutnya suspensi tersebut dicampurkan dengan media top agar (0.45% media CPG) yang masih hangat (suhu sekitar 50°C) lalu dituang pada media permukaan media CPG dalam cawan Petri dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24 jam. Plaque yang muncul pada media CPG dilarutkan dalam SM buffer dan difiltrasi menggunakan saringan kertas membran 0,2 μ m (Steridisc) dan ditampung sebagai bakteriofag yang telah diperbanyak.

4.2. Isolasi DNA Genome dan plasmid

Untuk keperluan teknik biologi molecular seperti isolasi DNA, digesti dengan enzim restriksi, dan konstruksi DNA rekombinan dilakukan mengikuti standard Sambrook & Russell (2001). Isolasi plasmid untuk keperluan kloning dan transformasi diperoleh dengan teknik mini-preparasi plasmid DNA (Ausubel *et al.*, 1995).

4.3. Konstruksi mutan *phcA* *R. solanacearum*

Mutan *R. solanacearum* pada gen *phcA* akan menghasilkan strain *R. solanacearum* yang avirulen (Tanaka *et al.*, 1990). Secara singkat, pembuatan mutan ini dilakukan

mengikuti (Chen *et al.*, 2015). Fragment gen *phcA* dengan ukuran sekitar 1.228 bp diamplifikasi menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan pasang primer PhcA-1228F : 5' GCC CGG TAC CTT TGT TAT GCA CTG AAA CGA AAA 3' dan PhcA-1228R: 5' CGC GTC TAG AAC TCA TCC TCC TTT TCT GCA TC 3'. Hasil amplifikasi tersebut kemudian didigesti dengan enzim restriksi *XbaI* dan *KpnI* dan diligasasi ke vektor pBlueScripII SK (+) dan ditransformasikan ke *E. coli* XL10Gold kompeten dan diseleksi pada media LBA yang mengandung X-gal sebagai media seleksi. Koloni yang berwarna putih dipilih dan digunakan untuk konfirmasi. Vektor Transforman yang terpilih kemudian didigesti dengan *StuI* dan *EcoRI* untuk menghilangkan bagian tengah sekuensi gen *phcA* dan menghasilkan plasmid linear. Fragmen gen resisten kanamisin (Kan^r) kemudian disisipkan pada plasmid tersebut dengan teknik ligasi dan ditransformasikan ke dalam sel ke *E. coli* XL10Gold kompeten dan diseleksi pada media LBA yang mengandung kanamisin 100 ppm sebagai media seleksi. Plasmid tersebut kemudian dipanen dan dipurifikasi yang selanjutnya digunakan untuk transformasi ke dalam sel kompeten *R. solanacearum* SKD dengan metode elektroporasi.

4.4. Pembuatan Elektrokompeten sel *Ralstonia solanacearum*

Elektro-competent sel bakteri *R. solanacearum* dibuat mengikuti Allen *et al.* (1991). Sebanyak 4 ml kultur bakteri *R. solanacearum* usia 24 jam, di masukan ke dalam media CPG cair (200 mL) dalam erlenmeyer dan diinkubasikan pada suhu ruang dengan penggojokan 150 rpm . Setiap 2 jam sekali kerapatan optik (OD) bakteri diukur pada panjang gelombang 600 nm menggunakan spektrofotometer. Kultur dengan kerapatan OD = 0.6 dipanen dengan cara sentrifugasi pada suhu 4°C, 4.000 rpm selama 20 menit dan diresuspensi beberapa kali dengan 10% gliserol steril pada perbandingan 1:1, 1:0,5, 1:0,05; dan 1:0,01 dengan setiap pencucian di sentrifugasi dengan kondisi seperti sebelumnya. Pelet hasil pencucian terakhir di tambahkan dengan 10% gliserol sebanyak 300µl dan dibagi menjadi 10 tabung eppendorf (masing-masing berisi 30µl) dan disimpan pada suhu -80°C hingga siap digunakan.

4.5. Elektrotransformasi plasmid pSK-*phcA*:: Kan^r

Untuk menghasilkan mutan melalui teknik molekular, maka dilakukan transformasi plasmid pSK-*phcA*:: Kan^r (*Suicide Plasmid*) ke dalam sel kompeten *R. solanacearum*. Transformasi dilakukan dengan cara elektroporasi menggunakan Gene Pulser Xcell (Bio-

Rad) dengan sel 2 mm pada 2.5 kV (Addy *et al.*, 2014). Suspensi kemudian didiamkan pada es selama 10 menit lalu diikubasikan pada suhu 28°C selama 6 jam tanpa agitasi dan dilanjutkan dengan inkubasi dan agitasi selama semalam. Pellet kemudian diresuspensi menggunakan media CPG-broth dan diratakan pada media CPG-agar yang mengandung antibiotic kanamisin 100 ppm. Koloni yang tumbuh dipilih sebagai transformant yang digunakan pada pengujian selanjutnya.

4.6. Polymerase Chain Reaction

Untuk keperluan amplifikasi DNA, teknik PCR diperlukan menggunakan PCR mix (Intron) dengan suhu pre-denaturasi pada 98°C selama 5 menit, suhu denaturasi pada 98°C selama 30 detik, dilanjutkan dengan suhu anealing (tergantung primer) dan suhu elongasi pada 72°C selama 1 menit. Hasil PCR divisualisasi menggunakan agarose gel elektroforesis dengan konsentrasi 1%. Konfirmasi mutan dilakukan dengan pendekatan teknik PCR dengan parameter berkurangnya ukuran gen *phcA* (non-aktif gen) menggunakan primer *phcA1-F* dan *phcA4-R*.

BAB 5. HASIL DAN PEMBAHASAN

Peremajaan strain uji, bakteriofag dan strain cloning dilakukan pada beberapa media biakan antara lain CPG dan NA. Peremajaan bakteri uji *R. solanacearum* yang dilakukan pada media CPG yang mengandung Tripenil Tetrazolium Chloride (TTC) menunjukkan karakter biakan atau koloni yang khas seperti pada kebanyakan *R. solanacearum* (Gambar 1A). Menurut Addy *et al.* (2016) bahwa bakteri ini akan menunjukkan morfologi yang berwarna kemerahan pada bagian tengah koloni dan membentuk struktur seperti lendir. Untuk perbanyak plasmid pSK+ dilakukan pada bakteri *E. coli* XL10Gold yang sebelumnya sudah ditransformasikan dengan plasmid tersebut. Untuk memastikan bahwa bakteri yang tumbuh pada media perbanyak adalah bakteri *E. coli* yang mengandung plasmid pSK+, maka media biakan ditambahkan dengan antibiotik ampisilin dengan konsentrasi 100 ppm (Gambar 1B). Koloni yang tumbuh mengindikasikan bahwa semua koloni yang tumbuh membawa plasmid pSK+ yang memiliki gen ketahanan terhadap ampisilin. Selain itu, propagasi bakteriofag yang akan digunakan dilakukan dengan pendekatan *plaque assay* yang ditunjukkan dengan terbentuknya plaque bening di antara kultur bakteri *R. solanacearum* (Gambar 1C). Menurut Yamada *et al.* (2007) bahwa *plaque*

terbentuk akibat adanya infeksi dan reproduksi partikel bakteriofag dalam sel bakteri target yang berdampak pada terhambatnya pertumbuhan bakteri target atau bahkan kematian sel.

Untuk memulai kegiatan molekular pada penelitian ini, dilakukan isolasi DNA, baik DNA genom maupun plasmid dari bakteri yang digunakan pada peremejaan. Untuk isolasi DNA genom dilakukan dari bakteri *R. solanacearum*, sedangkan isolasi plasmid DNA dilakukan dari *E. coli* XL10Gold. Hasil isolasi DNA genom menunjukkan bahwa genom bakteri mempunyai ukuran genom yang cukup besar walaupun tidak dapat diprediksi dengan elektroforesis standar (Gambar 2A).

Untuk memastikan bahwa DNA genom yang terisolasi, maka dilakukan konfirmasi dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik yaitu primer FliC (Gambar 2B) yang mengamplifikasi sequen gen flagellin yang berukuran sekitar 400 bp. Menurut Tans-Kersten *et al.* (2004) bahwa *R. solanacearum* memiliki sequens unik pada gen penyandi protein dominan (Major protein) penyusun flagella yang dikenal dengan flagellin (FliC). Selain itu, untuk plasmid pSK+ yang akan digunakan sebagai vektor diisolasi dan divisualisasi dengan menunjukkan 4 pita pada gel elektroforesis (Gambar 2C) yang mengindikasikan *replicative-form* dari plasmid ketika bereplikasi dalam sel bakteri *E. coli*.

Tahapan selanjutnya adalah membuat desain kostruk plasmid pSK+phcA::Kan^r untuk keperluan mutagenesis. Tahapan ini diawali dengan perbanyakan DNA plasmid pSK+ yang nantinya digunakan sebagai *backbone vector* dan fragmen gen phcA yang digunakan sebagai insert. Perbanyakan insert phcA dilakukan menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik phcA-1228FR dimana primer tersebut memiliki *site restriction* dengan enzim *XbaI* pada ujung 5' dan enzim *KpnI* pada ujung 3' untuk mempermudah proses ligasi pada backbone vector pSK+ (Gambar 3-1,2). Hasil ligasi nantinya ditransformasikan pada sel kompeten *E. coli* XL10Gold menghasilkan pSK+phcA yang nantinya didigesti dengan enzim restriksi dan disisipi dengan gen ketahanan kanamisin menghasilkan pSK+phcA::Kan^r (Gambar 3-3,4) yang selanjutnya digunakan dalam proses elektroporasi untuk mutagenesis pada sel elektrokompeten *R. solanacearum*.

Untuk mengkonfirmasi desain konstruk plasmid tersebut, maka dilakukan percobaan mengikuti desain tersebut. Amplifikasi gen *phcA* menggunakan DNA cetakan genom *R. solanacearum* menunjukkan hasil yang sesuai dengan perkiraan yaitu menghasilkan ampikon sebesar 1,2 kb (Gambar 4A), yang selanjutnya dimurnikan dan dipurifikasi untuk keperluan sekuens dan kloning (Gambar 4B).

Sebelum dilakukan kloning, maka dilakukan konfirmasi pada fragmen insert yang akan digunakan dengan teknologi sekuensing. Hasil sekuensing menunjukkan bahwa fragmen DNA yang digunakan sebagai insert merupakan fragmen gen *phcA* dari *R. solanacearum* (Telah dideposit ke NCBI dengan Accession No. KX987990). Selanjutnya, sesuai dengan desain konstruk, plasmid pSK+ terlebih dahulu dipotong dengan enzim *XbaI* dan *KpnI* yang menghasilkan untai linier dari plasmid dengan ukuran sekitar 3,0 kbp (Gambar 5, 6B).

Untuk menghasilkan pSK+*phcA*, maka plasmid pSK+ linier disisipi dengan fragmen *phcA* yang sebelumnya telah didigesti dengan enzim *XbaI* dan *KpnI* (Gambar 6B) dan dilanjutkan dengan perlakuan enzim ligasi untuk menyambung vektor dengan insert. Hasil ligase ini kemudian ditransferkan ke dalam sel kompeten *E. coli* XL10Gold mengikuti metode transformasi alami (*natural transformation*).

Hasil menunjukkan bahwa terdapat beberapa koloni yang tumbuh pada media seleksi LBA+ampisilin 100ppm (Gambar 6C) yang mengindikasikan bahwa diperolehnya transforman dan diduga membawa plasmid pSK+*phcA*.

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

Adapun rencana berikutnya adalah melakukan penyelesaian insersi gen kaset kanamisin dalam konstruk pSK+*phcA* dan menghasilkan psK+*phcA*::Kan^r yang secara simultan bersamaan dengan elektroporasi untuk menghasilkan mutan *phcA*::Kan^r.

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

Hingga tahapan dan capaian penelitian pada saat ini, ada beberapa hal yang dapat disimpulkan telah diperoleh plasmid pSK+phcA yang selanjutnya digunakan sebagai backbone vector untuk mengkonstruksi pSK+phcA::Kan^r untuk keperluan mutagenesis dan menghasilkan mutan $\Delta phcA::Kan^r$

DAFTAR PUSTAKA

- Abeokuta, N. P., Ganiyu, S. A., Babalola, O. A., Ayo-John, E. I., Fajinmi, A. A., Kehinde, I. A., et al. (2014). Impact of soil amendments and weather factors on bacterial wilt and yield of two tomato cultivars in South African. *Journal of Plant and Soil*, 31 (4), 195-201.
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, K., Fujie, M., & Yamada, T. (2012). The Filamentous Phage ϕ RSS1 enhances virulence of phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* on tomato. *Phytopathology*, 102 (3), 244-251.
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2012). Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 96 (8), 1204–1208.
- Addy, H. S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2014). Disruption of gspD and its effects on endoglucanase and filamentous phage secretion in *Ralstonia Solanacearum*. *Procedia Environmental Sciences*, 753-759.
- Adhikari, T. B., & Basnyat, R. C. (1998). Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal. *Can. J. Plant. Pathol.*, 20, 283-287.
- Ahmad, A. A., Ogawa, M., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2014). Characterization of bacteriophages Cp1 and Cp2, the strain-typing agents for *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80 (1), 77-85.
- Allen, C., Huang, Y., & Sequeira, L. (1991). Cloning of genes affecting polygalacturonase production in *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4 (2), 147-154.
- Arwiyanto, T., Goto, M., Tsuyumu, S., & Takikawa, Y. (1994). Biological control of bacterial wilt of tomato by an avirulent strain *Pseudomonas solanacearum* isolate from *Strelitzia reginae*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60, 421-430.
- Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2009). Host recognition and integration of filamentous phage ϕ RSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Virology*, 384 (1), 69-76.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., et al. (1995). *Short Protocols In Molecular Biology*. Third Edition. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, Inc.
- Boucher, C. A., Gough, C. L., & Arlat, M. (1992). Molecular genetics of pathogenicity determinants of *Pseudomonas solanacearum* with special emphasis on hrp genes. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 30, 443-461.
- Brumbley, S. M., Carney, B. F., & Denny, T. P. (1993). Phenotype conversion in *Pseudomonas solanacearum* due to spontaneous inactivation of PhcA, a putative LysR transcriptional

- regulator. *Journal of Bacteriology*, 175 (17), 5477-5487 .
- Champoiseau, P. G., Jones, J. B., & Allen, C. (2009). *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 causes tropical losses and temperate anxieties. Online. Plant Health Progress. DOI: 10.1094/PHP-2009-0313-01-RV. POLISH, Minnesota, USA.
- Chen, D., Li, C., Wu, K., Xun, G., Yuan, S., Shen, Q., et al. (2015). A *phcA*– marker-free mutant of *Ralstonia solanacearum* as potential biocontrol agent of tomato bacterial wilt. *Biological Control* , 80, 96–102.
- Denny, T. P. (2006). *Plant Pathogenic Ralstonia species*. In S. S. Gnanamanickam, Plant-Associated Bacteria (pp. 573-644). Amsterdam, Netherlands: Springer.
- Endersen, L., O'Mahony, J., Hill, C., Ross, R. P., McAuliffe, O., & Coffey, A. (2014). Phage therapy in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5, 327-349.
- Echeverri, F., Quinones, W., Torres, F., & Scheinede, B. (2002). Correlation Between phenylphenalenones phytoalexins and phytopathological properties In Musa and role of a dehydrophenylphenalenonetriol. *Molecules* , 7, 331-340.
- Frampton, R. A., Pitman, A. R., & Fineran, P. C. (2012). Advances in Bacteriophage-Mediated Control of Plant Pathogens. *International Journal of Microbiology*, 1-11.
- Fujiwara, A., Fujisawa, M., Hamasaki, R., Kawasaki, T., Fujie, M., & Yamada, T. (2011). Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77, 4155-4162.
- Hagens, S., & Loessner, M. J. (2010). Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens: calculations and considerations. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 11, 58-68.
- Hanemian, M., Zhou, B., Deslandes, L., Marco, Y., & Trémousaygue, D. (2013). Hrp mutant bacteria as biocontrol agents toward a sustainable approach in the fight against plant pathogenic bacteria. *Plant Signal Behav.*, 8 (10), e25678.
- Hayward, A. (2000). *Ralstonia solanacearum*. In J. Lederberg, Encyclopedia of Microbiology (Vol. 4, pp. 32-42). San Diego, CA: Academic Press.
- Hyman, P., & Abedon, S. T. (2010). Bacteriophage host range and bacterial resistance. *Adv. Appl. Microbiol.*, 70, 217-248. .
- Jacobs, J. M., Milling, A., Mitra, R. M., Hogan, C. S., Ailloud, F., Prior, P., et al. (2013). *Ralstonia solanacearum* requires PopS, an ancient AvrE-family effector, for virulence and to overcome salicylic acid-mediated defenses during tomato pathogenesis. *mBio*, 4 (6), e00875-13.
- Kumar, A., & Sarma, Y. R. (2004). Characterization of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt in ginger. *Indian Phytopathol.*, 57, 12-17.
- Lindgren, P. B. (1995). The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 35, 129-152.
- McKenna, F., El-Tarabily, K. A., Hardy, G. E., & Dell, B. (2001). Novel in vivo use of a polyvalent *Streptomyces* phage to disinfest *Streptomyces scabies*-infected seed potatoes. *Plant Pathol.*, 50, 666-675.
- Meng, F., Yao, F., & Allen, J. (2011). A MotN mutant of *Ralstonia solanacearum* is hypermotile and has reduced virulence. *Journal of Bacteriology*, 193 (10), 2477-2486.
- Muthoni, J., Shimelis, H., & Melis, R. (2012). Management of bacterial wilt [*Ralstonia solanacearum* Yabuuchi et al., 1995] of potatoes: opportunity for host resistance in Kenya.

Journal of Agricultural Science, 4 (9), 64-79.

- Nagy, J. K., Kiraly, L., & Schwarczinger, I. (2007). Phage therapy for plant disease control with a focus on fire blight. *Central European Journal of Biology*, 7 (1), 1-12.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajid, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (11), 1142-1145.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-Demery, D., Barthet, D., Meyer, D., Arlat, M., et al. (2003). Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular Microbiology*, 49 (4), 991-1003.
- Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaad, N., Jones, J., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition. St Paul, USA: American Phytopathological Society Press.
- Sooch, B. S., & Kauldh, B. S. (2013). Influence of multiple bioprocess parameters on production of lipase from *Pseudomonas* sp. BWS-5. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 56 (5), 711-721.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., & Morris, J. G. (2001). Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (3), 649-659.
- Tanaka, H., Negishi, H., & Maeda, H. (1990). Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Annals of Phytopathological Society Japan*, 56, 243-246.
- Tans-Kersten, J. D. Brown, and C. Allen. 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Mol. Plant Microb Interact.* 17(6):686-695.
- Trigalet, A., & Trigalet-Demery, D. (1990). Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36 (1), 27-38.
- van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of patogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 103, 753-765.
- Wittebole, X., De Roock, S., & Opal, S. M. (2013). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5 (1), 226-235.
- Yamada, T. (2012). *Bacteriophages of Ralstonia solanacearum: Their Diversity and Utilization as Biocontrol Agents in Agriculture*. Croatia: InTech-Open Access Publisher.
- Yanti, Y. (2015). Peroxidase enzyme activity of rhizobacteria-introduced shallots bulbs to induce resistance of shallot towards bacterial leaf blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *allii*). *Procedia Chemistry*, 14, 501-507.
- Yoshimochi, T., Hikichi, Y., Kiba, A., & Ohnishi, K. (2009). The global virulence regulator PhcA negatively controls the *Ralstonia solanacearum* *hrp* regulatory cascade by repressing expression of the PrhIR signaling proteins. *Journal of Bacteriology*, 191 (10), 3424-3428.

Lampiran 1. Susunan Organisasi Tim Peneliti dan Pembagian Tugas Peneliti

No	Nama/NIDN	Instansi Asal	Bidang Ilmu	Alokasi Waktu (Jam/Minggu)	Uraian Tugas
PELAKSANAAN TAHUN I					
1.	Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., PhD. 0009118004	Universitas Jember	Bioteknologi Molekular Pertanian	10	Melakukan kegiatan perbanyakkan bakteri dan bakteriofag serta konstruksi plasmid DNA.
2.	Erlia Narulita, S.Pd., M.Si 0005078004	Universitas Jember	Bioteknologi Molekular	10	Melakukan kegiatan elektroporasi plasmid dan seleksi mutan <i>phcA</i> .
PELAKSANAAN TAHUN II					
1.	Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., PhD. 0009118004	Universitas Jember	Bioteknologi Molekular	10	Melakukan pembiakan tanamn uji dan melakukan uji pengendalian invitro, serta analisa sifat biomaterial
2.	Erlia Narulita, S.Pd., M.Si 0005078004	Universitas Jember	Bioteknologi Molekular	10	Produksi biomaterial dan bakteriofag menggunakan bioreaktor skala kecil dan uji pengendalian.