



**POTENSI BAKTERIOFAG UNTUK MENGENDALIKAN PENYAKIT
LAYU BAKTERI (*Ralstonia solanacearum*) PADA TANAMAN
TEMPAKAU (*Nicotiana tabacum*)**

SKRIPSI

Oleh

**Rizkiyanti Faradina
NIM 151510501312**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**



**POTENSI BAKTERIOFAG UNTUK MENGENDALIKAN PENYAKIT
LAYU BAKTERI (*Ralstonia solanacearum*) PADA TANAMAN
TEMPAKAU (*Nicotiana tabacum*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Agroteknologi (S1) dan mencapai gelar Sarjana Pertanian

Oleh

**Rizkiyanti Faradina
NIM 151510501312**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2019**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala karunia dan limpahan rahmat dalam penyelesaian karya ilmiah ini sehingga terselesaikan dengan lancar.
2. Baginda Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umat manusia dari zaman zahiliah ke dalam zaman yang terang benderang akan akhlak dan ilmu.
3. Ayahanda Salehuddin, Ibunda Era Sari, dan kedua adikku karena kasih sayang dan motivasinya yang selalu diberikan.
4. Dosen-dosen saya di Fakultas Pertanian yang telah memberikan ilmu dan membimbing dengan penuh kesabaran.
5. Almamaterku tercinta Universitas Jember.

MOTTO

“Asalkan kamu percaya, semua bisa terjadi”

(Christopher Reeve)

“Kelemahan terbesar kita adalah bersandar pada kepasrahan. Jalan yang paling jelas menuju kesuksesan adalah selalu mencoba setidaknya satu kali lagi”

(Thomas A. Edison)

“Bersabarlah kamu dan kuatkanlah kesabaranmu dan tetaplah bersiap siaga dan bertaqwalah kepada Allah supaya kamu menang”

(QS Al Imraan : 200)

“Janganlah kamu bersikap lemah dan janganlah pula kamu bersedih hati, padahal kamulah orang-orang yang paling tinggi derajatnya, jika kamu orang-orang yang beriman”

(Q.S. Ali-Imran : 139)

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Rizkiyanti Faradina

NIM : 151510501312

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Potensi Bakteriofag untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*)”** adalah benar-benar hasil karya penulis sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun serta bukan karya tulis plagiasi. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapatkan sanksi akademik jika ternyata dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 30 Oktober 2019

Yang menyatakan

Rizkiyanti Faradina
NIM. 151510501312

SKRIPSI

**POTENSI BAKTERIOFAG UNTUK MENGENDALIKAN PENYAKIT
LAYU BAKTERI (*Ralstonia solanacearum*) PADA TANAMAN
TEMPAKAU (*Nicotiana tabacum*)**

Oleh :

Rizkiyanti Faradina
NIM 151510501312

Pembimbing

Dosen Pembimbing Skripsi : Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D.

NIP. 198011092005011001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Potensi Bakteriofag untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*)**” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 30 Oktober 2019

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Skripsi,

Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D
NIP. 198011092005011001

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Nanang Tri Haryadi, SP., M.Sc.
NIP. 198105152005011003

Ir. Abdul Majid, MP.
NIP. 196709061992031004

**Mengesahkan,
Dekan,**

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D.
NIP. 196005061987021001

RINGKASAN

Potensi Bakteriofag untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*); Rizkiyanti Faradina; 151510501312; 2019; Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Tanaman Tembakau merupakan salah satu komoditas perkebunan yang cukup penting serta banyak dibudidayakan di Kabupaten Jember, akan tetapi dalam produksi tembakau masih mengalami penurunan. Salah satu hal yang menyebabkan terjadinya penurunan produksi adalah adanya patogen yang mengganggu proses budidayanya. Berdasarkan hasil peninjauan lapang, banyak ditemukan tanaman tembakau yang mengalami gejala layu. Salah satu patogen penting yang menyebabkan tembakau terserang penyakit layu yaitu bakteri *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* mampu menyebabkan kematian tembakau hingga lebih dari 50%.

Bakteri FTb4 berhasil diisolasi dari lahan pertanaman tembakau di Patrang, Kabupaten Jember dan tergolong bakteri Gram negatif. Bakteri FTb4 bersifat patogenik dan mampu menimbulkan gejala layu pada tanaman tembakau. Hasil amplifikasi FTb4 dengan primer phcA menghasilkan pita DNA berukuran 1228 bp dan primer phylotype berukuran 144 bp dan terklarifikasi sebagai *Ralstonia solanacearum*.

Bakteriofag merupakan agen hayati dari *R. solanacearum*, dalam hal ini bakteriofag RsoX1IDN berhasil diisolasi dari lahan tembakau di Patrang, Kabupaten Jember dan mampu mengendalikan bakteri FTb4. Hasil uji in vitro bakteri FTb4 yang diinfeksi oleh bakteriofag RsoX1IDN menunjukkan hasil berbeda nyata dengan perlakuan tanpa infeksi Bakteriofag RsoX1IDN, sedangkan pada perlakuan moi menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata antar moi 1, moi 0.1, dan moi 0.01. Bakteriofag RsoX1IDN juga mampu menekan keparahan penyakit layu bakteri pada tanaman tembakau dengan konsentrasi terendah yaitu moi 0.01.

SUMMARY

Bacteriophage Potential to Control Bacterial Wilt (*Ralstonia solanacearum*) on Tobacco (*Nicotiana tabacum*); Rizkiyanti Faradina; 151510501312; 2019; Agrotechnology Study Program; Faculty of Agriculture; University of Jember.

Tobacco is one of the most important plantation commodities and widely cultivated in Jember, but tobacco production was still decreased. One of the causes of production decrease is pathogen that disrupt the process of cultivation. Based on the results of field observations, there are many tobacco plants were found wilting symptoms. One of the important pathogens that cause wilting is *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* can cause tobacco death up to more than 50%.

FTb4 bacteria was successfully isolated from tobacco plantations in Patrang, Jember and classified as negative Gram bacteria. FTb4 bacteria is pathogenic and the cause of wilting symptoms in tobacco plants. The results of FTb4 amplification with phcA primer produced DNA bands measuring 1228 bp and phylotype primer measuring 144 bp and clarified as *Ralstonia solanacearum*.

Bacteriophage are biological agents of *R. solanacearum*, in this case the RsoX1IDN bacteriophage was successfully isolated from tobacco plantations in Patrang, Jember and was able to control the FTb4 bacteria. In vitro test results of FTb4 bacteria infected by RsoX1IDN bacteriophage showed significantly different results with treatment without infection with RsoX1IDN bacteria, whereas in moi treatment showed no significant difference between moi 1, moi 0.1, and moi 0.01. RsoX1IDN is also able to reduce the severity of bacterial wilt in tobacco plants with the lowest concentration of moi 0.01.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat, karunia dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “**Potensi Bakteriofag untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tembakau (*Nicotiana tabacum*)**”. Tak lupa sholawat dan salam tetap tercurahkan kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW.

Dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari masukan dan bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu ucapan terima kasih saya sampaikan kepada

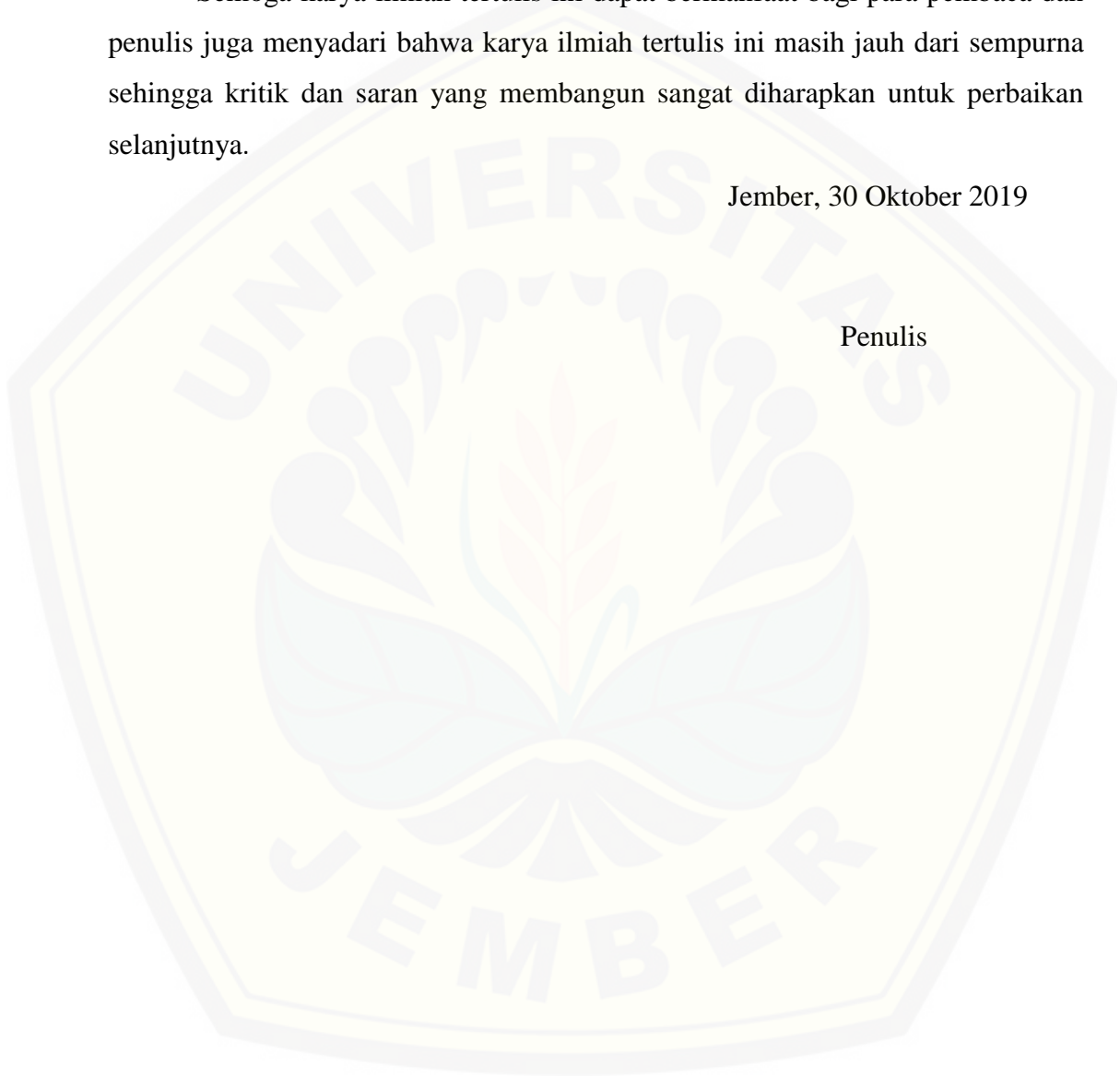
1. Bapak Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D. selaku Dekan Fakultas Pertanian, Universitas Jember.
2. Bapak Ir. Hari Purnomo, M.Si., Ph.D., DIC. selaku Ketua Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.
3. Bapak Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Dosen Pembimbing Skripsi untuk waktu, arahan, motivasi, dan kesabaran selama perkuliahan serta penyusunan skripsi.
4. Bapak Nanang Tri Haryadi, SP., M.Sc. selaku Dosen Penguji I dan Bapak Ir. Abdul Majid, MP. selaku Dosen Penguji II yang meluangkan waktu dan perhatiannya untuk memberikan ilmu serta bimbingannya.
5. Ibunda Era Sari dan Ayahanda Salehuddin, dan adik-adikku yang telah memberikan doa, dukungan, kasih sayang serta semangat secara moral dan materi mulai dari awal hingga terselesaikannya skripsi ini.
6. Keluarga besar Arief Moestain dan keluarga besar Tabrane yang selalu mendukung dan memotivasi saya.
7. Teman saya Hurin Nabila Aghnia Ilma, Winda Ruliyanti, dan Fauziyah Nurul Laili, yang telah membantu serta memberikan dukungan mulai awal perkuliahan hingga akhir.
8. Teman-teman Phage Team yang telah memberikan semangat dan dukungan kepada saya.
9. Laboratorium CDAST Universitas Jember yang telah memfasilitasi saya selama melakukan penelitian.

10. Keluarga besar IMAGRO, UKKM serta Agroteknologi 2015 atas pengalaman, kenangan, kebersamaan, dan suka duka selama masa perkuliahan.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah memberikan semangat, dukungan dan bantuan.

Semoga karya ilmiah tertulis ini dapat bermanfaat bagi para pembaca dan penulis juga menyadari bahwa karya ilmiah tertulis ini masih jauh dari sempurna sehingga kritik dan saran yang membangun sangat diharapkan untuk perbaikan selanjutnya.

Jember, 30 Oktober 2019

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Tanaman Tembakau.....	4
2.2 Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau	6
2.2.1 Penyakit Layu pada Tanaman Tembakau	6
2.2.2 Deskripsi dan Klasifikasi <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
2.2.3 Gejala.....	9
2.3 Bakteriofag pada Bakteri <i>R. solanacearum</i>	10
2.3.1 Bioekologi Bakteriofag.....	10
2.3.2 Potensi Bakteriofag.....	11
2.3.3 Interaksi Bakteriofag dan Inangnya.....	12

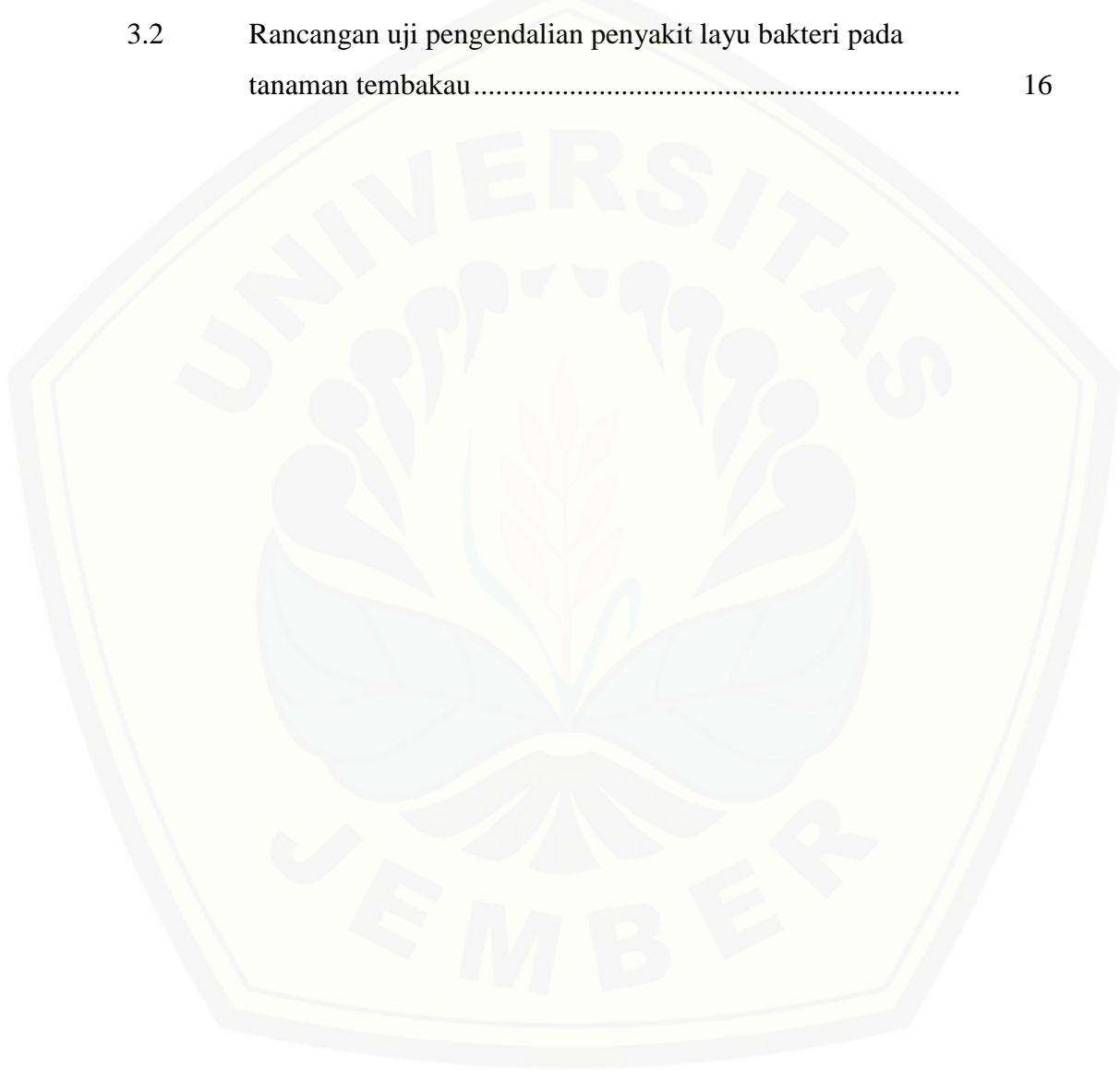
2.4 Hipotesis	12
BAB 3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	13
3.2 Persiapan Penelitian	13
3.2.1 Alat dan Bahan.....	13
3.2.2 Penanaman Tanaman Tembakau	13
3.2.3 Isolasi Bakteri <i>R. solanacearum</i> dari Sampel Tanaman Sakit.....	14
3.2.4 Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag dari Tanah Pertanaman Tembakau	14
3.2.5 Perhitungan Kerapatan Inokulum	15
3.3 Pelaksanaan Penelitian	15
3.3.1 Rancangan Percobaan	15
3.3.2 Prosedur Penelitian	17
3.3.3 Variabel Pengamatan	20
3.4 Analisis Data	21
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Hasil	22
4.1.1 Isolasi bakteri <i>R. solanacearum</i>	22
4.1.2 Uji Gram Bakteri (KOH 3%) dan Uji Hipersensitif	23
4.1.3 Uji Virulensi	23
4.1.4 PCR dengan Primer Spesifik <i>phcA</i> dan Phylotype.....	24
4.1.5 Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag.....	25
4.1.6 Uji Daya Hambat <i>R. solanacearum</i> oleh bakteriofag	25
4.1.7 Pengujian Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau	26
4.2 Pembahasan	28
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32

DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN.....	37



DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
3.1	Rancangan uji kemampuan penghambatan bakteriofag terhadap <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
3.2	Rancangan uji pengendalian penyakit layu bakteri pada tanaman tembakau	16

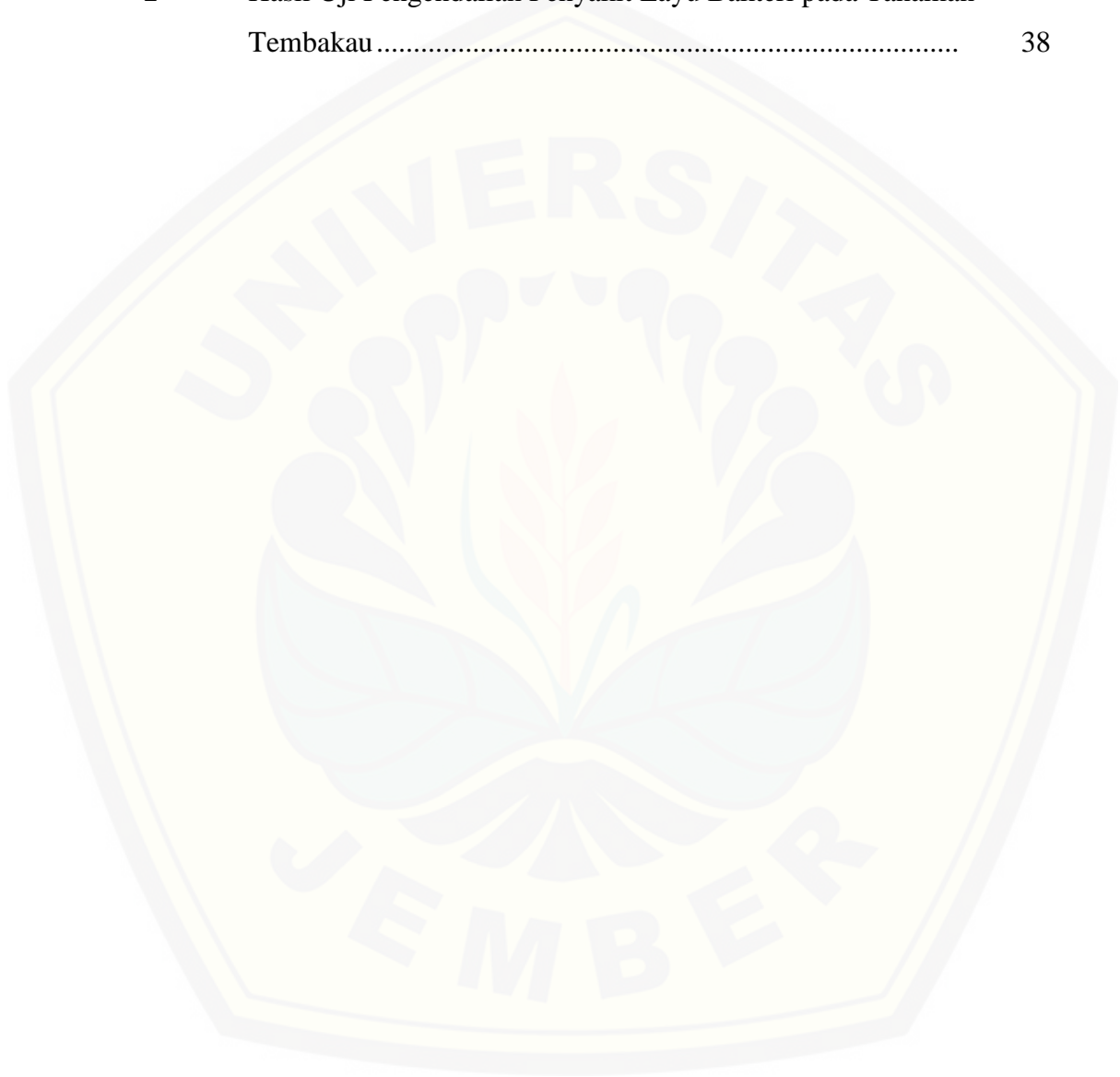


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Morfologi Tanaman Tembakau	5
2.2	Morfologi Bakteri <i>R. solanacearum</i> strain K60	7
2.3	Gejala Penyakit Layu Bakteri.....	10
2.4	Morfologi Bakteriofag RsoP1IDN	11
2.5	Siklus Litik Bakteriofag	12
4.1	Gejala Penyakit Layu Bakteri pada Tembakau Hasil Isolasi	22
4.2	Goresan koloni FTb4 pada Media CPGA dan TZC 1%	23
4.3	Uji Gram (KOH 3%) bakteri FTb4 dan Uji hipersensitif.....	23
4.4	Uji virulensi hari ke-5 setelah inokulasi	24
4.5	Elektroforesis Hasil PCR Bakteri FTb4 dengan primer phcA dan phyloTYPE pada Agarose 1,2%.....	24
4.6	Hasil Spot Test Bakteriofag dan Purifikasi Bakteriofag	25
4.7	Hasil Uji Daya Hambat FTb4 oleh bakteriofag RsoX1IDN secara in vitro	26
4.8	Kurva Keparahan Penyakit Layu Bakteri dan Hasil Uji In Vivo pada Tanaman Tembakau Pada Hari Ke-14 Setelah Inokulasi	27

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Judul	Halaman
1	Dokumentasi Hasil Penelitian Tugas Akhir	37
2	Hasil Uji Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau	38



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tembakau (*Nicotiana tabacum*) merupakan salah satu komoditas tanaman perkebunan dengan prospek yang cukup menjanjikan. Tanaman ini tergolong dalam tanaman tropis yang berasal dari Amerika dan pertama kali dibudidayakan pada Tahun 1612. Tanaman yang tergolong dalam famili Solanaceae ini mulai dibudidayakan sebagai tanaman komersial pada 21 negara, salah satunya di Indonesia (Matnawi, 1997). Tembakau adalah salah satu komoditas tanaman ekspor yang cukup banyak menyumbang pemasukan bagi Indonesia. Menurut Data Statistik Perkebunan Indonesia Tahun 2015-2017, volume ekspor tembakau secara keseluruhan dapat dikatakan cukup yaitu mencapai 30.675 ton pada Tahun 2015, akan tetapi angka tersebut telah mengalami penurunan dari tahun sebelumnya. Produksi tembakau menurut status perusahaan pada Tahun 2014 mencapai 198.301 ton, sedangkan Tahun 2015 mengalami penurunan menjadi 193.301 ton. Hal tersebut secara tidak langsung berdampak terhadap volume ekspor tembakau yang juga ikut menurun. Pada Tahun 2014 volume ekspor tembakau mencapai 35.009 ton dengan total nilai 181.323 US\$ dan menurun menjadi 30.675 ton dengan total nilai 156.784 US\$. Menurut Pusat Karantina Tumbuhan dan Keamanan Hayati Nabati (2017), salah satu kendala yang menyebabkan turunnya produksi tembakau adalah adanya Organisme Pengganggu Tanaman (OPT) pada tembakau yang diekspor.

Tanaman Tembakau di lapang diketahui cukup banyak mengalami gejala layu, adapun tiga patogen penting yang dapat menyebabkan gejala layu pada tanaman tembakau yaitu *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovora*, dan *Phytophthora nicotianae*, dimana dari ketiganya mampu menyebabkan penurunan produksi tembakau hingga 20-80% (Yulianti *et al.*, 2012). *R. solanacearum* sendiri tercatat mampu mengakibatkan kematian pada tanaman tembakau lebih dari 50% sehingga berdampak terhadap penurunan produksi dan mutu dari daun tembakau yang dihasilkan (Supriyono, 2015). Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan suatu kegiatan pengendalian guna mencegah penurunan produksi dari tembakau.

Teknik pengendalian dengan memanfaatkan agen hayati *R. solanacearum* memiliki potensi yang cukup baik serta selaras dengan prinsip keberlanjutan. Menurut Fujiwara *et al.* (2011), pengendalian secara biologi memiliki beberapa kelebihan, seperti menekan penggunaan bahan kimia dalam mengendalikan patogen, mengatasi masalah pencemaran lingkungan, dan menurunkan tingkat residu bahan kimia pada tanaman. Salah satu agen hayati dalam mengendalikan penyakit layu bakteri tembakau adalah bakteriofag. Menurut Menurut Bhunchoth *et al.* (2015), bakteriofag memiliki potensi yang cukup baik dan efektif dalam mengendalikan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat. Hal tersebut juga didukung oleh hasil penelitian Addy *et al.* (2018), yang menyatakan bahwa bakteriofag RsoP1IDN yang diisolasi dari Indonesia memiliki potensi yang cukup baik sebagai agen hayati dari *R. solanacearum* yang berasal dari tanaman terong. Meski demikian, efektivitas dari bakteriofag masih dibatasi oleh kisaran inang yang spesifik. Menurut Addy *et al.* (2019), bakteriofag RsoM1USA secara signifikan mampu menghambat pertumbuhan dari *R. solanacearum* secara *in vitro*. Akan tetapi, uji *in vivo* pada tanaman tomat tidak menunjukkan hasil yang signifikan jika dibandingkan dengan tanaman tomat tanpa aplikasi bakteriofag RsoM1USA. Berdasarkan hal tersebut, maka dilaksanakan penelitian terhadap bakteriofag hasil isolasi dari lahan pertanian tembakau guna mengetahui keberadaan bakteriofag sebagai agen hayati yang mampu mengendalikan penyakit layu bakteri pada tanaman tembakau.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini yaitu apakah bakteriofag hasil isolasi dari lahan pertanian tembakau mampu mengendalikan *Ralstonia solanacearum*.

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui kemampuan bakteriofag hasil isolasi dari lahan pertanian tembakau dalam mengendalikan *R. solanacearum*.

1.4 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait keberadaan bakteriofag sebagai agen hayati dari *Ralstonia Solanacearum* pada pertanaman tembakau serta potensinya dalam mengendalikan penyakit layu bakteri serta menjadi informasi guna melanjutkan penelitian terkait bakteriofag.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Tembakau

Tembakau merupakan salah satu komoditas tanaman perkebunan penting dan cukup banyak dalam menyumbang devisa bagi Indonesia. Menurut Direktorat Jenderal Perkebunan dalam statistik perkebunan Indonesia tahun 2015-2017, pada tahun 2016 volume dan ekspor tembakau diestimasikan mampu mencapai 21.933 ton dengan nilai 95.236 US\$, dimana Jawa Timur merupakan salah satu Provinsi yang memiliki luas area dan produksi tembakau tertinggi jika dibandingkan dengan Provinsi lain di Jawa, dengan luas area tanam dan produksi pada tahun 2015 mencapai 108.046 Ha dan 99.016 ton. Salah satu wilayah yang cukup banyak menyumbang dalam produksi tembakau adalah Kabupaten Jember. Menurut Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember pada tahun 2013, luas lahan pertanaman tembakau di Jember mencapai 9.138 Ha dengan total produksi 119.782 Kw. Tembakau sendiri memiliki banyak varietas, Grompol Jatim I, Kasturi, Kasturi 1, Kasturi 2, PVH 20, PVH 03, PVH 09, dan lain-lain.

Menurut Matnawi (1997), tanaman tembakau merupakan salah satu tanaman tropis asli Amerika dan pertama kali dibudidayakan pada tahun 1612. Tembakau diperkirakan masuk ke Indonesia dibawa oleh bangsa Portugis atau Spanyol pada abad XVI. Besarnya produksi tembakau di Indonesia menjadi tanaman ini menjadi salah satu tanaman yang diekspor untuk bahan baku rokok. Tanaman yang tergolong dalam famili Solanaceae ini memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Ordo : Magnoliopsida
Familia : Solanaceae
Sub Familia : Nicotianae
Genus : Nicotiana
Species : *Nicotiana tabacum*.

Tanaman tembakau tumbuh dengan baik pada tanah dengan pH 5,5 – 6,5 serta gembur, remah, mudah mengikat air, memiliki tata air dan udara yang baik.

Suhu optimum untuk pertumbuhan tembakau berkisar 18 - 27°C, sedangkan rentangan suhu udara untuk pertumbuhan tanaman tembakau berkisar 21 – 32,30°C. Curah hujan rata-rata yang baik untuk tanaman tembakau dataran rendah yaitu 2000 mm/tahun, sedangkan curah hujan rata-rata untuk tembakau dataran tinggi yaitu 1500–3500 mm/tahun. Ketinggian tempat optimum untuk tanaman tembakau adalah 0-900 mdpl (Budiman, 2011).

Menurut Tim Penulis PS (1993), tanaman tembakau umumnya memiliki batang tegak dengan tinggi rata – rata 2,5 m dan pada keadaan yang mendukung tembakau mampu tumbuh hingga 4 m dengan sedikit cabang. Batang tembakau berwarna hijau dan hampir seluruhnya ditumbuhi oleh bulu-bulu halus berwarna putih. Sistem perakaran tunggang dengan panjang sekitar 50 – 75 cm dan memiliki banyak serabut serta bulu akar. Daun tembakau memiliki bentuk bulat panjang dengan ujung meruncing, tepi daun licin dan pertulangan daun menyirip. Umumnya setiap tanaman memiliki jumlah daun sebanyak 2 helai, dalam kondisi yang cukup optimum jumlah daun dapat mencapai 28 – 32 helai. Bunga tembakau tergolong bunga majemuk yang berbentuk terompet dengan jumlah benangsari lima buah. Warna bunga dalam satu malai ada yang kemerah-merahan pada bagian atas dan putih pada bagian bawah kelopaknya. Biji tembakau memiliki ukuran yang sangat kecil, dalam 1 cm³ memiliki berat kurang lebih 0,5 gram yang berisi sekitar 6000 butir biji. Setiap tanaman mampu menghasilkan rata – rata 25 gram biji dengan daya kecambah mencapai 95%.



Gambar 2.1 (A) morfologi tanaman tembakau, (B) morfologi bunga tembakau (Sumber : Tim Penulis PS, 1993)

2.2 Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau

2.2.1 Penyakit Layu pada Tanaman Tembakau

Penyakit layu banyak menjangkit tanaman tembakau, yang mana penyebab dari penyakit ini dapat terjadi karena beberapa patogen, baik dari golongan cendawan ataupun bakteri, bahkan dapat pula disebabkan oleh nematoda. Adapun patogen yang berasal dari golongan cendawan yaitu *Rhizoctonia solani* dan *Phytophthora nicotianae* (Budiman, 2011), sedangkan patogen penyebab layu dari golongan bakteri yaitu *Ralstonia solanacearum* dan *Xanthomonas solanacearum*. Patogen tersebut umumnya hidup pada tanah dan menyerang daerah perakaran yang terluka. Penyakit ini mampu menyebabkan banyak kerugian secara ekonomi, hal tersebut dikarenakan patogen tersebut umumnya tidak hanya menyerang satu jenis tanaman saja (Matnawi, 1997), salah satu patogen yang cukup merugikan yaitu *Ralstonia solanacearum*. Menurut Rahayu (2015), bakteri *R. solanacearum* tergolong patogen penting dengan kisaran inang yang luas juga persebaran yang cukup luas yang meliputi wilayah beriklim tropis dan sub tropis.

2.2.2 Deskripsi dan Klasifikasi *Ralstonia solanacearum*.

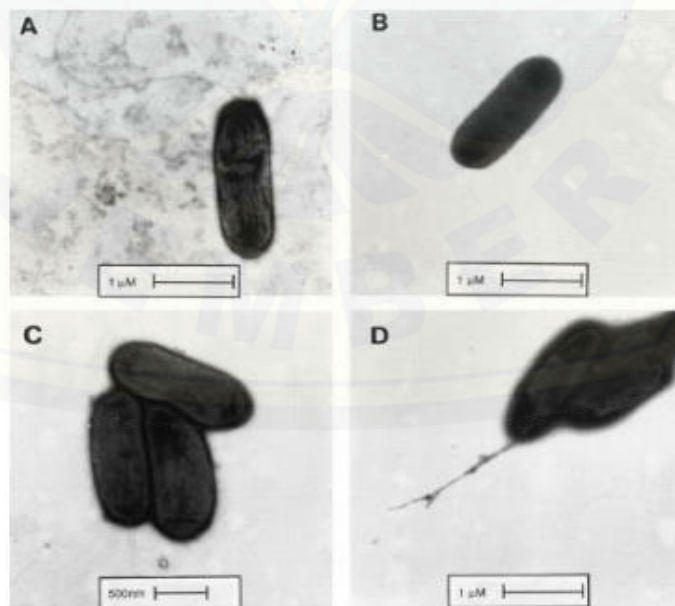
Menurut Nasrun *et al.* (2007), *R. solanacearum* termasuk dalam kelompok bakteri yang memiliki 5 ras berdasarkan kisaran inang. Ras 1 menyerang tanaman tembakau, tomat dan Solanaceae lainnya, Ras 2 menyerang pisang dan Heliconia, Ras 3 menyerang Kentang, Ras 4 menyerang Jahe dan Ras 5 menyerang Murbei. Menurut Arwiyanto (2014), *R. Solanacearum* terbagi menjadi 4 kelompok berdasarkan kluster monofiletik yang disebut filotipe (*phylotypes*), yang mana strain dari tiap-tiap filotipe berasal dari lokasi geografi yang sama. Filotipe I merupakan strain yang diisolasi dari Asia, filotipe II berasal strain yang diisolasi dari Amerika, filotipe III merupakan strain bakteri yang diisolasi dari Afrika dan kepulauan sekitarnya, dan filotipe IV terdiri atas strain yang berasal dari Indonesia.

Menurut Rahayu (2015), *R. solanacearum* memiliki kisaran inang yang sangat luas, dapat menginfeksi 200 species tanaman dari 53 famili. Secara taksonomi bakteri *R. solanacearum* tersebut diklasifikasikan sebagai berikut :

Bangsa : Bakteri
Filum : Proteobacteria
Kelas : Betaproteobacteria
Ordo : Burkholderiales
Famili : Burkholderiaceae
Marga : Ralstonia
Species : *R. solanacearum*

R. solanacearum termasuk dalam kelompok bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek, sel tunggal berukuran 0,5–0,7 x 1,5–2,0 μm , tidak membentuk spora, dan tidak berkapsul.

Setiap bakteri memiliki kondisi fisik tertentu untuk pertumbuhannya, termasuk juga *R. solanacearum*. Pemilihan media harus disesuaikan dengan kebutuhan nutrisi yang sesuai dengan bakteri serta inkubasi media pada kondisi yang sesuai dapat memacu pertumbuhan bakteri dengan baik dalam kurun waktu 24 jam (Hajoeningtjas, 2012). *R. solanacearum* dapat tumbuh pada media CPG (Casamino Acid Peptone Glucose) yang tersusun atas 0,1 % casamino acid, 1% pepton dan 0,5% glukosa pada suhu 28°C dan digojok 200 hingga 300 rpm (Addy *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Morfologi bakteri *R. solanacearum* strain K60 (Rahayu, 2015)

Identifikasi bakteri dapat dilakukan melalui beberapa cara. Identifikasi bakteri yang dapat dilakukan dengan mengamati morfologi serta sifat dari bakteri. Klarifikasi bakteri awal dari *R. solanacearum* dilakukan dengan uji hipersensitivitas pada daun tembakau, yang kemudian diamati terjadinya gejala klorosis pada daun tembakau dalam kurun waktu 2 hari. Uji lainnya yang umum digunakan adalah uji virulensi dari isolat bakteri pada tanaman asal ditemukannya bakteri yang kemudian diketahui kemampuan bakteri dalam menginfeksi tanaman. Berdasarkan hasil uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas tersebut, diperoleh hasil sementara bahwa bakteri yang menginfeksi tanaman tersebut adalah *R. solanacearum* (Nasrun *et al.*, 2007), selain itu saat ini juga mulai banyak dilakukan identifikasi bakteri secara biologi molekuler.

Salah satu teknik identifikasi secara molekuler adalah melalui PCR (*Polymerase Chain Reaction*) guna memastikan bahwa bakteri yang menginfeksi tanaman adalah *R. solanacearum* tingkat molekuler. PCR merupakan suatu metode biomolekuler dalam memperbanyak segmen DNA spesifik secara *in vitro* yang terjadi secara enzimatis oleh enzim DNA polimerase dan primer nukleotida tertentu (Elza dan Arief, 1998). Primer *phcA* dan *phylo* merupakan primer spesifik yang digunakan dalam teknik PCR untuk bakteri *R. solanacearum*. Amplikon dari primer *phcA* berupa pita DNA berukuran 1228 bp (Ramadhan, 2017). Primer spesifik *phylo* terdiri atas empat primer yaitu *phylo* I, *phylo* II, *phylo* III dan *phylo* IV akan menghasilkan pita DNA dengan ukuran 144 bp, 372 bp, 91 bp, dan 213 bp (Sagar *et al.*, 2014).

R. solanacearum menyerang tanaman inangnya pada bagian akar, dimana bakteri ini masuk ke jaringan tanaman melalui luka. Menurut Tahat and Sijam (2010), patogen masuk ke jaringan akar dapat disebabkan oleh serangan serangga ataupun nematoda, transplanting, pengolahan ataupun pemeliharaan sehingga bakteri dapat masuk dan berkembang dengan pesat pada sistem vascular dan akhirnya jaringan xylem dipenuhi bakteri dan massa bakteri berupa lendir. Menurut Saile *et al.* (1997), bakteri *R. solanacearum* ini bertahan serta mampu mendominasi wilayah perakaran pada tanaman sehingga terjadi inokulasi antara bakteri dan akar tanaman. Kemudian terjadi infeksi pada jaringan tanaman, dimana bakteri akan

masuk menuju jaringan tanaman melalui ruang antar sel yang sedang berkembang menuju kebagian korteks. Bakteri akan melakukan penetrasi menuju jaringan xylem, dalam hal ini bakteri dibantu dengan enzim yang dihasilkannya untuk mendegradasi dinding sel tanaman yaitu endoglucase, endopectinase dan eksopectinase, dimana senyawa tersebut menjadi penentu dari tingkat keganasan dari bakteri *R. solanacearum* selanjutnya, terjadi infeksi pada jaringan tanaman, tepatnya pada bagian korteks yang menjadi pintu masuk bagi bakteri, akibatnya terjadi infeksi sel parenkim yang diikuti dengan penyebaran bakteri dalam pembuluh xylem. Bakteri ini akan menyebar pada pembuluh xylem menuju organ tanaman lain seperti batang dan daun. Menurut Rahayu (2015), dalam proses infeksi bakteri *R. solanacearum* akan mengeluarkan beberapa senyawa ekstraseluler dengan berat molekul yang tinggi. Deposit senyawa eksopolosakarida yang berlebihan dalam pembuluh xylem akan menyumbat aliran air dari tanah menuju bagian tanaman lainnya sehingga tanaman kekurangan suplai air dan menjadi layu.

2.2.3 Gejala

Menurut Arwiyanto (2014), gejala khusus yang terjadi pada tembakau yaitu kelayuan yang terjadi secara tiba-tiba pada siang hari yang panas, tetapi tanaman akan nampak sehat atau segar kembali pada sore hari. Daun tanaman akan berubah menjadi kekuningan pada gejala yang terjadi secara lambat, sedangkan ketika gejala berjalan secara cepat atau patogen menginfeksi tanaman rentan maka seluruh daun akan layu dan berwarna tetap hijau kemudian daun akan terkulai. Pada famili Solanaceae seperti terung, cabai dan tembakau, seluruh daun menjadi layu hanya dalam kurun waktu dua sampai tujuh hari (Gambar 2.3 A). Gejala yang muncul di bagian bawah tanah pada tanaman tembakau, terung dan tomat berupa akar-akarnya masih sehat meski bagian tajuk tanaman mengalami layu, akan tetapi ketika akar dibelah secara melintang ataupun membujur akan tampak warna cokelat pada berkas pembuluhnya (Gambar 2.3 B). Menurut Nasrun *et al.* (2007), serangan lanjut akan menyebabkan akar dan pangkal batang membusuk serta terdapatnya massa bakteri berwarna putih mirip susu sebagai tanda dari serangan *R. solanacearum*.

Salah satu cara deteksi cepat dapat dilakukan dengan memotong akar atau batang tanaman yang terserang kemudian dan meletakkannya pada wadah yang berisi air jernih, maka akan terlihat massa bakteri atau juga disebut nenek yang keluar dari batang tanaman.



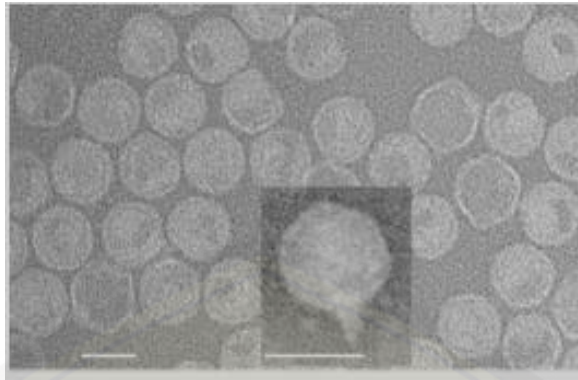
Gambar 2.3 Gejala penyakit layu bakteri pada (A) tajuk tanaman, (B) batang tanaman.

2.3 Bakteriofag pada Bakteri *R. solanacearum*

2.3.1 Bioekologi Bakteriofag

Bakteriofag dapat berasal dari beberapa ordo, seperti Caudovirales (Myoviridae, Siphoviridae dan Podoviridae). Salah satu bakteriofag Filamentous yang berasal dari famili Inoviridae mampu menginfeksi bakteri. Bakteriofag dapat diisolasi dengan mudah, baik dari tanah, air ataupun bagian tanaman (Frampton *et al.*, 2012). Bakteriofag memiliki bagian tubuh seperti virus pada umumnya yaitu kepala, ekor dan serabut ekor. Menurut Addy *et al.* (2018), bakteriofag RsoP1IDN berhasil diisolasi dari Indonesia, dimana bakteriofag tersebut memiliki potensi sebagai agen hayati dari *R. solanacearum*. Bakteriofag RsoP1IDN tergolong dalam famili Podoviridae dengan morfologi kepala berbentuk ikosahedral yang berdiameter 62 ± 4 nm dan ekor pendek non-kontraktil dengan panjang 17 ± 2 nm.

Hasil isolasi bakteriofag kemudian di tambahkan pada suspensi bakteri sebagai bakteri inang sehingga bakteriofag dapat bereproduksi dan kemudian diinkubasi. Pertumbuhan dari bakteriofag tersebut ditandai dengan munculnya zona bening (*plaque*) pada media dan kemudian di lakukan purifikasi serta penyimpanan dari bakteriofag yang umumnya dilakukan pada suhu 4°C (Nindita dan Wardani, 2013).



Gambar 2.4 Morfologi bakteriofag RsoP1IDN (Addy *et al.*, 2018).

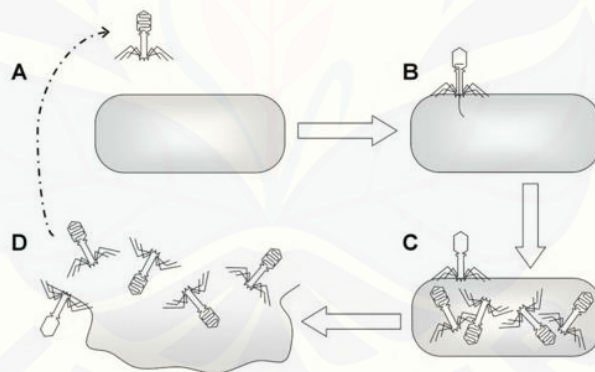
2.3.2 Potensi Bakteriofag dalam Mengendalikan Penyakit Tanaman

Bakteriofag dilaporkan mampu mengendalikan penyakit pada tanaman, dimana menurut Balogh *et al.* (2008), aplikasi bakteriofag secara signifikan mampu mengurangi keparahan penyakit kanker pada tanaman jeruk jika dibandingkan dengan perlakuan kontrol tanpa aplikasi bakteriofag. Menurut Resita *et al.* (2013), bakteriofag SK31 mampu menekan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas syringae* pada media cair, hal tersebut juga terlihat daun dengan perlakuan pemberian bakteriofag memiliki keparahan penyakit lebih ringan jika dibandingkan dengan perlakuan *P. syringae*.

Bakteriofag memiliki kisaran inang yang spesifik dan terbukti mampu menekan pertumbuhan dari bakteri inangnya, salah satunya yaitu bakteriofag *Ralstonia solanacearum*. Menurut Fujiwara *et al.* (2011), bakteriofag RSL1 mampu menekan penetrasi, pertumbuhan dan pergerakan dari bakteri dalam proses inokulasi akar tanaman. Aplikasi bakteriofag RSL1 menjadikan tanaman sehat serta tidak mengalami gejala layu selama masa inokulasi bakteri, sedangkan tanaman tomat tanpa perlakuan aplikasi bakteriofag RSL1 menunjukkan gejala layu 4 hari setelah dilakukan inokulasi bakteri. Menurut Addy *et al.* (2012), bakteriofag RSM3 mampu mengurangi virulensi bakteri *R. solanacearum* dalam menyebabkan penyakit pada tanaman tomat dengan kerapatan 10^5 pfu/ml, dimana tanaman tersebut tidak menunjukkan gejala layu, sedangkan untuk tanaman tanpa perlakuan infeksi bakteriofag RSM3 mengalami gejala layu.

2.3.3 Interaksi Bakteriofag dan Inangnya

Menurut Addy *et al.* (2012), terjadinya infeksi oleh bakteriofag RSM3 terhadap inangnya terjadi karena adanya suatu hubungan yang persisten antara bakteriofag dan inangnya, kemudian bakteriofag RSM3 yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* akan menghasilkan partikel virus baru serta replikasi bakteriofag RSM3. Menurut Abedon (2008), Bakteriofag melakukan infeksi melalui beberapa cara, dua diantaranya litik dan lisogenik. Menurut Wiley and Sons (2016), sel bakteri akan mengalami lisis ketika dinding sel dari bakteri berisi sejumlah bakteriofag dalam jumlah cukup banyak, dalam proses infeksi bakteriofag terhadap bakteri tersebut terdapat suatu istilah yaitu *multiplicity of infection* (m.o.i). *Multiplicity of Infection* merupakan ratio dari bakteriofag yang menginfeksi tiap sel bakteri, dimana ketika *multiplicity of infection* dari bakteriofag cukup tinggi maka dapat diartikan bahwa terdapat ratusan bakteriofag yang akan menginfeksi satu sel bakteri serta akan berakibat pada lisisnya sel bakteri akibat terbentuknya partikel bakteriofag baru.



Gambar 2.4 Siklus Litik Baktriofag (A) bakteriofag menemukan bakteri inangnya, (B) adsorpsi (C) replikasi (D) lisis (Abedon, 2008).

2.4 Hipotesis

Adapun hipotesis pada penelitian ini adalah bakteriofag hasil isolasi dari lahan pertanian tembakau mampu mengendalikan *R. solanacearum*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada Maret 2019 sampai Oktober 2019 di Laboratorium CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember dan *Green House* Fakultas Pertanian Universitas Jember.

3.2 Persiapan Penelitian

3.2.1 Alat dan Bahan

Penelitian dilakukan dengan menyiapkan alat dan bahan yang digunakan, alat yang digunakan yaitu beaker glass, micro pipet, botol schott, erlenmeyer, LAF, mesin PCR, Microplate reader, shaker, autoclave, spektrofotometer, cutter, tube, petri, bunsen, pinset, membran filter, syringe, eppendorf, tube PCR dan ice box. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini seperti, cassamino acid, glucose, pepton, agar, akuades, akuabidest, kertas filter, alkohol, spirtus, PCR mix, Primer phcA, primer Phylotype, Nuclease free water, TZC 1%, KOH 3%, EtBr, TAE 1×, Agarose, TE Buffer, PCI, dan NaAc.

3.2.2 Penanaman Tanaman Tembakau

Persiapan penanaman diawali dengan sterilisasi tanah. Tanah yang telah steril dan dingin tersebut kemudian dicampur dengan kompos (perbandingan 3:2) untuk kemudian dimasukkan ke polybag, benih tembakau Besuki Na-oost dibibitkan selama kurang lebih 45 hari. Selanjutnya, melakukan pemilihan bibit tembakau yang siap pindah tanam. Bibit yang dipilih adalah bibit dengan ketinggian seragam dengan jumlah daun 4-5 serta bebas dari OPT. Perawatan yang dilakukan meliputi penyiraman seraca rutin, dan menyiangi gulma yang dilakukan secara berkala setiap dua hari sekali.

3.2.3 Isolasi Bakteri *R. solanacearum* dari Sampel Tanaman Sakit

Pengambilan sampel dilakukan pada lokasi pertanaman tembakau, berupa tanah dan bagian tanaman tembakau. Bakteri diisolasi dari sampel tanaman yang menunjukkan gejala daun menjadi layu seperti kekurangan air serta berwarna hijau kekuningan pada fase lanjut dan batang berwarna kecoklatan serta terdapat massa bakteri berupa lendir berwarna putih kekuningan atau putih keruh (Arwiyanto, 2014). Bagian batang (dekat dengan akar) tanaman yang menunjukkan gejala layu tersebut kemudian dipotong ukuran 5 mm dan didesinfeksi menggunakan alkohol 70%, dilanjut dengan dicuci aquadest 4 kali. Bagian tanaman tersebut kemudian ditanam pada media CPG (*Cassaminoacid Peptone Glucose*) dan inkubasi selama 24-48 jam dan murnikan bakteri (Azizi, 2015).

3.2.4 Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag dari Tanah Pertanaman Tembakau

Pengambilan sampel bakteriofag ini dilakukan dengan mengambil sampel berupa tanah supresif, 10 gram tanah diletakkan pada valcon dan ditambahkan 200 µl kultur bakteri 24 jam serta 50 ml aquadest steril, kemudian digojok selama 24 jam pada 180 rpm dan lakukan filtrasi dengan membran filter steril (ukuran 0,45 µm, Steradisc, Krabo Co) sehingga diperoleh sumber bakteriofag (Yamada *et al.*, 2007). Untuk mengetahui keberadaan bakteriofag, dilakukan spot test pada media top agar. Zona bening/plaque yang muncul kemudian di purifikasi dengan metode *plaque assay*.

Plaque assay dilakukan dengan cara menambahkan 10 µl suspensi bakteriofag hasil filtrasi ke dalam 500 µl suspensi bakteri 24 jam dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu ruang, mencampurkan suspensi tersebut dengan media *top agar* bersuhu sekitar 50°C, kemudian dituangkan ke media agar CPG dalam cawan petri dan inkubasi selama 24-48 jam dalam suhu ruang (amati zona bening/*plaque* yang terbentuk). Bakteriofag asal *plaque* tunggal kemudian diperbanyak serta dimurnikan dengan kultur pada media CPG dan digojok selama 24 – 48 jam (Ramadhan, 2017). Lakukan pemisahan sel bakteri dengan partikel bakteriofag dengan sentrifuge kecepatan 7000 rpm selama 10 menit dan supernatan

difiltrasi dengan menggunakan membran filter kerapat pori 0,2 μm (Steradisc, Krabo Co), simpan partikel bakteriofag pada suhu 4°C (Addy *et al.*, 2012).

3.2.5 Perhitungan Kerapatan Inokulum Bakteri *R. solanacearum* dan Bakteriofag

Bakteri *R. solanacearum* hasil purifikasi kemudian dikultur. Selanjutnya, media tersebut digojok pada 180 rpm serta diinkubasi selama 24 jam (Yamada *et al.*, 2007). Pengukuran kepadatan sel bakteri dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\Sigma \text{ bakteri (cfu/ml)} = \frac{\Sigma \text{ koloni bakteri}}{\text{Volume plating} \times \text{Serial Pengenceran}}$$

kemudian dilakukan pengenceran hingga 10⁸ cfu/ml atau melakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (OD_{600}) = 1 atau ekuivalen 10⁸ cfu/ml (Ramadhan, 2017), sedangkan pembuatan inokulum bakteriofag diambil dari bakteriofag murni yang kemudian dihitung kepadatan bakteriofagnya dengan menggunakan rumus :

$$\Sigma \text{ bakteriofag (pfu/ml)} = \frac{\Sigma \text{ plaque}}{\text{Volume plating} \times \text{Serial Pengenceran}}$$

3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Percobaan

Pengujian potensi bakteriofag dalam mengendalikan *R. solanacearum* ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap yang dilakukan secara *in vitro* dan *in vivo* sebagai berikut :

a) Pengujian Kemampuan Penghambatan Bakteriofag terhadap *Ralstonia solanacearum*

Pengujian kemampuan penghambatan *R. solanacearum* oleh Bakteriofag ini dilakukan secara *in vitro* sebanyak 6 perlakuan yang diulang sebanyak 5 dan diletakkan pada *microplate* dengan volume total tiap *plate* 2 ml dengan CPG untuk kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan *microplate reader*, sebagai berikut :

Tabel 3.1 Rancangan uji kemampuan penghambatan bakteriofag terhadap *Ralstonia solanacearum*

Perlakuan	Suspensi Bakteriofag (10 ⁸ pfu/ml)	Suspensi <i>R. solanacearum</i> (10 ⁸ cfu/ml)
K	-	-
R	-	2 ml
P	1 ml	-
PR (moi 1)	1 ml	1 ml
PR (moi 0,1)	200 µl	1,8 ml
PR (moi 0,01)	20 µl	1,98 ml

Keterangan

moi : Multiplicity of Infection

K : Kontrol

R : *R. solanacearum*

P : Bakteriofag

PR : Bakteriofag dan *R. solanacearum*

b) Pengujian Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau

Pengujian dilakukan secara *in vivo* pada tanaman tembakau berumur ±45 hari. Jumlah perlakuan 4 dengan masing-masing ulangan 5 yang memiliki total volume 60 ml dengan air steril, sebagai berikut :

Tabel 3.2 Rancangan uji pengendalian penyakit layu bakteri pada tanaman tembakau

Perlakuan	Suspensi Bakteriofag	Suspensi <i>R. solanacearum</i>
K	-	-
P	30 ml	-
R	-	30 ml
PR	30 ml	30 ml

Keterangan

K : Kontrol (Air Steril)

P : Bakteriofag

R : *R. solanacearum*PR : Bakteriofag dan *R. solanacearum*

Adapun denah rancangan percobaan adalah sebagai berikut :

R U ₅	R U ₆	R U ₂	P U ₁
P U ₄	R U ₃	K U ₄	PR U ₄
R U ₁	P U ₅	K U ₅	PR U ₅
P U ₂	PR U ₆	P U ₃	K U ₃
K U ₂	P U ₆	K U ₆	PR U ₂
PR U ₁	R U ₄	PR U ₃	K U ₁

3.3.2 Prosedur Penelitian

1. Uji Sifat Bakteri *R. solanacearum*

Bakteri hasil isolasi kemudian dilakukan uji sifat bakteri meliputi :

- a) Uji Gram Bakteri (KOH 3%), dilakukan dengan mengambil satu ose bakteri yang diletakkan pada *object glass* steril kemudian ditambahkan satu tetes KOH 3% dan dicampur sampai homogen dengan jarum ose. Bakteri Gram negatif akan menunjukkan sifat menyerupai lendir dan lengket, sedangkan bakteri Gram positif menunjukkan sifat cair/tidak lengket (Azizi, 2015).
- b) Uji hipersensitivitas, dilakukan dengan menyuntikkan suspensi bakteri hasil isolasi pada daun tembakau sebanyak 100 µl (kepadatan 10⁸ cfu/ml) dengan pembanding air steril serta bakteri DT3 (*R. solanacearum* yang diperoleh dari koleksi Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D.), pengamatan dilakukan selama empat hari setelah infiltrasi.
- c) Uji virulensi, dilakukan dengan menyuntikkan 200 µl (1 × 10⁸ cfu/ml) suspensi bakteri pada batang tanaman tembakau dan mengamati gejala yang muncul hingga hari ketujuh setelah infeksi.

2. Klarifikasi Bakteri *R. solanacearum* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

a) Ekstraksi DNA Bakteri

Isolasi DNA bakteri ini dilakukan untuk mengklarifikasi bakteri yang diisolasi dari tanaman tembakau dengan gejala layu merupakan bakteri *R. solanacearum*. Isolasi diawali dengan preparasi ekstrak DNA dengan cara mengambil 1000 µl suspensi bakteri berusia 24 jam sebanyak dan dipindahkan ke tabung eppendof lalu

disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 11.000 rpm pada suhu 4°C sehingga diperoleh pelet (endapan) dan dihomogenkan dengan 500 µl TE buffer (100 mM tris, 0,1 EDTA) dan disentrifugasi dengan kecepatan 7.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C, kemudian membuang supernatan. Selanjutnya, menambahkan 500 µl TE buffer dan 500 µl PCI (*Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol* -25:24:1) lalu divortex hingga homogen dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan diambil supernatan (bagian bening) serta ditambahkan 10% 3M sodium asetat sebanyak 40 µl dan 1000 µl etanol 70% lalu homogenkan. Larutan diinkubasi selama 60 menit pada suhu -20°C, selajutnya disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit suhu 4°C, kemudian pelet dicuci dengan 100 µl 70% etanol dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit suhu 4°C. Pelet yang diperoleh kemudian dibersihkan dari sisa-sisa etanol dengan cara dikering anginkan pada oven 45°C, kemudian ditambahkan 50 µl TE buffer (10 mM tris, 0,1 mM EDTA) dan dicampur hingga homogen. Simpan pada suhu 4°C (pelet tersebut merupakan DNA bakteri) (Azizi, 2015).

b) Pelaksanaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Teknik identifikasi menggunakan PCR ini dilakukan guna mengetahui bakteri yang diisolasi dari tanaman yang bergejala layu dari lapang tersebut merupakan bakteri *R. solanacearum*. DNA yang telah diisolasi sebelumnya dan diidentifikasi menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik *phcA* dan *phylotype*.

Bahan untuk PCR menggunakan primer *phcA* (10 µl) dilakukan dengan mencampurkan 2 µl ddH₂O, 1 µl Primer R, 1 µl primer F, 1 µl DNA, 5 µl 2× PCR mix (intron). Amplifikasi DNA bakteri dilakukan melalui *Pre-Denaturasi* pada suhu 95°C selama 5 menit, *Denaturasi* pada suhu 95°C selama 30 detik, *Annaeling* pada suhu 59°C selama 30 detik, *Elongasi* pada suhu 72°C selama 40 detik, dan *Final Elongasi* pada suhu 72°C selama 3 menit (Ramadhan, 2017). PCR dengan menggunakan analisis *phylotype* (20 µl) dilakukan dengan mencampurkan 5 µl ddH₂O, 10 µl PCR mix, 2 µl DNA, 3 µl primer mix (primer-F *phylotype* I,II,III, IV dan primer RR). Amplifikasi DNA dilakukan dengan sistem *Pre-Denaturasi* pada suhu 96°C selama 5 menit, *Denaturasi* pada suhu 94°C selama 15 detik, *Annaeling*

suhu 59°C selama 30 detik, *Elongasi* suhu 72°C selama 30 detik dan *Final Elongasi* suhu 72°C selama 10 menit (Sagar *et al.*, 2014).

Hasil PCR kemudian dilakukan visualisasi dengan cara, sebanyak 5 µl DNA dielektroforesis pada 1,2% gel agarosa yang telah dicampur dengan 7 µl Ethidium Bromide sebagai pewarna (pembacaan pita DNA), pada 100 volt selama ±30 menit. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan alat *UV Gel Documentation System Major Science* untuk mengetahui ukuran DNA serta membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi pita DNA pada gel (Azizi, 2015).

1. Pengujian Kemampuan Penghambatan Bakteriofag terhadap *R. solanacearum*

Pengujian ini dilakukan secara *in vitro* dengan cara menambahkan suspensi bakteriofag dan suspensi bakteri *R. solanacearum* pada *microplate* sesuai dengan rancangan penelitian diatas, kemudian *microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu ruang selama tujuh hari. Pada hari ke tujuh dilakukan pengukuran OD bakteri dengan menggunakan Microplaste Reader pada OD₆₀₀ nm untuk kemudian dianalisis hasilnya.

2. Pengujian Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau

Pengujian secara *in vivo* pada tanaman tembakau berumur ±45 hari. Tanaman tembakau diberi perlakuan untuk mengetahui kemampuan pengendalian penyakit layu bakteri oleh bakteriofag. Terdapat 4 perlakuan yang masing-masingnya diulang 5 kali dengan perlakuan sebagai berikut, tanaman air steril/kontrol (K), inokulasi dengan *R. solanacearum* (R), inokulasi Bakteriofag (P), dan inokulasi dengan *R. solanacearum*-Bakteriofag (PR). Tanaman diberi perlakuan dengan cara merendam tanaman pada suspensi sesuai dengan perlakuan pada rancangan, kemudian dipindah pada media tanah pada hari ke-14 setelah inokulasi. Pengamatan dilakukan selama 14 hari setelah inokulasi dengan interval pengamatan setiap 2 hari.

3.3.3 Variabel Pengamatan

- 1 Uji Sifat Bakteri *R. solanacearum*
 - a. Uji Gram Bakteri (KOH 3%) mengamati sifat Gram bakteri, bakteri Gram negatif menunjukkan sifat menyerupai lendir dan lengket (Azizi, 2015).
 - b. Uji hipersensitivitas mengamati terjadinya gejala nekrotik pada jaringan daun tembakau 4 hari setelah infiltrasi, dengan interval pengamatan setiap hari.
 - c. Uji Virulensi mengamati munculnya gejala layu pada tanaman tembakau selama 7 hari setelah dilakukan infeksi.
- 2 Klarifikasi Bakteri *R. solanacearum* dengan PCR menggunakan primer phcA akan mengamplifikasi pita DNA berukuran 1228 bp, sedangkan primer pylotype mengamplifikasi pita DNA berukuran 144 bp untuk phylotype I, 372 bp untuk phylotype II, 91 bp untuk phylotype III, dan 213 bp untuk phylotype IV.
- 3 Kemampuan Penghambatan Bakteriofag terhadap *R. solanacearum* (*in vitro*) dilakukan dengan mengamati kekeruhan dari media CPG pada setiap perlakuan yang diukur dengan Microplate Reader OD₆₀₀ (Addy *et al.*, 2012).
- 4 Pengujian Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau, mengamati gejala yang ditunjukkan oleh tanaman tembakau selama 14 hari setelah infeksi dengan interval pengamatan setiap 2 hari sekali. Penilaian perkembangan penyakit layu bakteri diamati dengan rumus intensitas penyakit (%) sebagai berikut :

$$\bullet \text{ IP} = \frac{\sum_{i=1}^k k \times nk}{Z \times N} \times 100\%$$

Keterangan :

nk : Jumlah tanaman yang terserang penyakit dengan skala k

N : Jumlah tanaman yang digunakan dalam percobaan

Z : Skala penyakit tertinggi

Adapun sistem skala/skor pada penyakit layu bakteri dihitung dengan :

Tabel 3.3 Skor gejala layu pada tanaman

Skor	Persentase daun layu (%)
0	0
1	1 – 10
2	11 – 30
3	31 – 60
4	>60 - ≤100
5	Semua daun

- Menghitung laju infeksi *R. solanacearum* dihitung dengan rumus epidemiologi

Van der Plank (1963) berikut :

$$r = \frac{2,3}{t} \log_{10} \left(\frac{X_2(1-X_1)}{X_1(1-X_2)} \right)$$

Keterangan :

t : interval waktu pengamatan

X₂ : keparahan Akhir

X₁ : keparahan awal

3.4 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Isolat bakteri FTb4 hasil isolasi pada tanaman tembakau bergejala layu disertai busuk pada bagian batang dan akar teridentifikasi sebagai *Ralstonia solanacearum* dan bakteriofag RsoX1IDN hasil isolasi pada lahan pertanaman tembakau mampu mengendalikan *R. solanacearum* baik secara in vitro ataupun in vivo pada tanaman tembakau.

5.2 Saran

Pada penelitian selanjutnya disarankan untuk mengetahui informasi terkait ketahanan tanaman terhadap *R. solanacearum* serta perlu dilakukan uji pendahuluan dalam penggunaan bakteriofag sebagai agen hayati dalam skala besar.

DAFTAR PUSTAKA

- Abedon, S.T. 2008. Bacteriophage Ecology: Population growth, evolution and impact of bacterial viruses. Inggris: Cambridge University Press.
- Addy, H. S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2012. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 8(96):1204-1209.
- Addy, H.S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie and T. Yamada. 2012. Loss of Virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by ϕ RSM filamentous phages. *Bacteriology* 102(2):469-477.
- Addy, H. S., M. M. Farid., A. A. Ahmad and Q. Huang. 2018. Host range and molecular characterization of lytic Pradovirus-like *Ralstonia* phage RsoP1IDN isolated from Indonesia. *Virology* 1(1):1-6.
- Addy, H.S., A. A. Ahmad and Q. Huang. 2019. Molecular and biological characterization of *Ralstonia* phage RsoM1USA, a new species of P2virus, isolated in the United states. *Microbiology* 10(267):1-14.
- Arwiyanto, T. 2014. *Ralstonia solanacearum* biologi penyakit yang ditimbulkan dan pengelolaannya. Yogyakarta:UGM Press.
- Azizi, N. F. 2015. Isolasi dan karakterisasi bakteriofag yang menginfeksi bakteri *Ralstonia solanacearum* pada pisang asal Kabupaten Lumajang. Skripsi, Fakultas Pertanian. Jember:Universitas Jember.
- Badan Pusat Statistik Kabupaten Jember. 2013. Luas panen, rata-rata produksi dan total produksi Tembakau Voor Oogst Kasturi menurut Kecamatan. Kabupaten Jember.
- Balogh, B., B.I. Canteros, R.E. Stall, and J.B Jones. 2008. Control of citrus cancer and citrus bacterial spot with bacteriophages, *Plant Disease* 92(7):1048-1052.
- Bhunchoth, A., N. Phironrit, C. Leksoboon, O. Chatchawankanphanich, S. Kotera, E. Narulita, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2015. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents. *Applied Microbiology* 118:1023-1033.
- Budiman, H. 2011. Budidaya Tanaman Tembakau. Jakarta:Pustaka Baru Press.
- Direktorat Jendral Perkebunan. 2016. Statistik Perkebunan Indonesia Tahun 2015-2017. Jakarta: Sekretariat Direktorat Jenderal Perkebunan.

- Elrod, S. L. And W. D. Stansfield. 2002. Schaum's Outlines of Theory and Problems of Genetics. 4th ed. USA:McGraw-Hill. Terjemahan oleh Tyas, D. 2007. Genetika. 4th ed. Jakarta:Penerbit Erlangga.
- Elbreki, M., Paul, R. R., Colin, H., Jim O., Olivia, Mc. and Aidan, C. 2014. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Hindawi Publishing Corporation Journal of Viruses* ID 382539:1-21
- Elza, I. A dan S. J. Arief. 1998. PCR (Polymerase Chain Reaction) teknik dan aplikasinya di bidang kedokteran gigi. *Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 1(5):43-46.
- Frampton, R. A., A. R. Pitman, and P. C. Fineran. 2012. Advances in bacteriophage-mediated control of plant pathogens. *Microbiology* 1(1):1-12.
- Fujiwara, A., M. Fujisawa, R. Hamasaki, T. Kawasaki, M. Fujie, and T. Yamada. 2011. Biocontrol of *Ralstonia solanacearum* by treatment with lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology* 12(77):4155-4162.
- Hajoeningtjas, O. D. 2012. Mikrobiologi Pertanian. Yogyakarta:Graha Ilmu.
- Kalpage, M.D. and D.M. De Costa. 2014. Isolation of bacteriophages and determination of their efficiency in controlling *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt of Tomato. *Tropical agricultural research* 26(1):140-151.
- Matnawi, H. 1997. Budidaya Tembakau Bawah Naungan. Yogyakarta:Kanisius.
- Muwarni. S. 2015. Dasar-dasar Mikrobiologi Veteriner. Malang:Universitas Brawijaya Press.
- Nasrun, Cristanti, T. Arwiyanto, dan I. Mariska. 2007. Karakteristik fisiologis *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri nilam. *Littri*. 13(2):43-48.
- Nindita, L. O. dan A. K. Wardani. 2013. Purifikasi phage cocktail serta spektrum penghambatannya terhadap bakteri penyebab foodborne disease. *Teknologi Pertanian* 1(14):47-56.
- Poussier, S., P. Thoquet, D.T. Demery, S. Barthet, D. Meyer, M. Arlat, and A. Trigalet. 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. *Molecular microbiology* 1-13.

- Pusat Karantina Tumbuhan dan Keamanan Hayati Nabati. 2017. *Komoditas Ekspor Indonesia*. Jakarta:Badan Karantina Pertanian.
- Rahayu, M. 2015. Penyakit layu bakteri bioekologi dan cara pengendaliannya. Monografi Balitkabi Nomor 13. Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi.
- Ramadhan, A. A. 2017. Pengaruh kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) terhadap pengendalian patogen layu bakteri pada tanaman tomat (*Solanum lycopersicum L.*). Skripsi, Fakultas Pertanian. Jember:Universitas Jember.
- Sagar, V., M. S. Gurjar, J. Arjunan, R. R. Bakade, S. K. Chakrabarti, R. K. Arora, and S. Sharma. 2014. Phylotype analysis of *Ralstonia solanacearum* strains causing potato bacterial wilt in Karnataka in India. *Microbiology* 8(12):1277-1281.
- Saile, E., J. A. McGarvey, M. A. Schell, and T. P. Denny. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 12 (87):1264 – 1271.
- Sastrahidayat, I. R. 2013. Penyakit Tanaman Sayuran. Malang:Universitas Brawijaya Press.
- Supriyono, 2015. Serangan Penyakit Layu Bakteri *Pseudomonas solanacearum* dan lanas Phytophthoranicotianae pada galur-galur harapan tembakau temanggung. *Agrovigor* 1(8):43 – 50.
- Resita, S.R., N.F. Azizi, F.E.S Iriyanto, W. C. Yuliasari, M. Kiptiyah dan H.S. Addy. 2013. Pengendalian hayati penyakit hawar bakteri tanaman kedelai dengan menggunakan bakteriofag. *Otimasi potensi hayati untuk mendukung agroindustri berkelanjutan. Fakultas Pertanian Universitas Trunojoyo*. 18 Juni 2014. 72-77.
- Tahat, M. M. and K. Sijam. 2010. *Ralstonia solanacearum*: the bacterial wilt causal agent. *Plant Science* 9(7):385-393.
- Tim Penulis PS. 1993. Pembudidayaan, Pengolahan dan Pemasaran Tembakau. Jakarta:Penebar Swadaya.
- Wiley, J. And Sons. 2016. Introduction to Modern Virology. New Jersey:Blackwell Publishing Ltd.

Yamada, T., T. Kawasaki, S. Nagata, A. Fujiwara, S. Usami, and M. Fujie. 2007. New bacteriophages that infect the phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. *Microbiologi* 153:2630-2639.

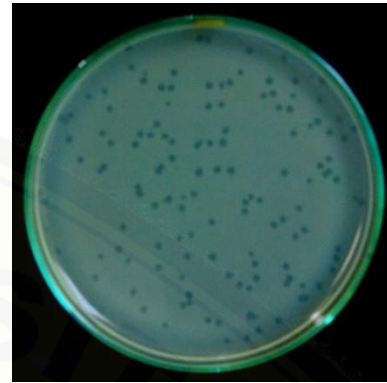
Yulianti, T., N. Hidayah, dan S. Yulaikah. 2012. Ketahanan delapan kultivar tembakau lokal Bondowoso terhadap tiga patogen penting. *Litri*. 18(3):89-94.



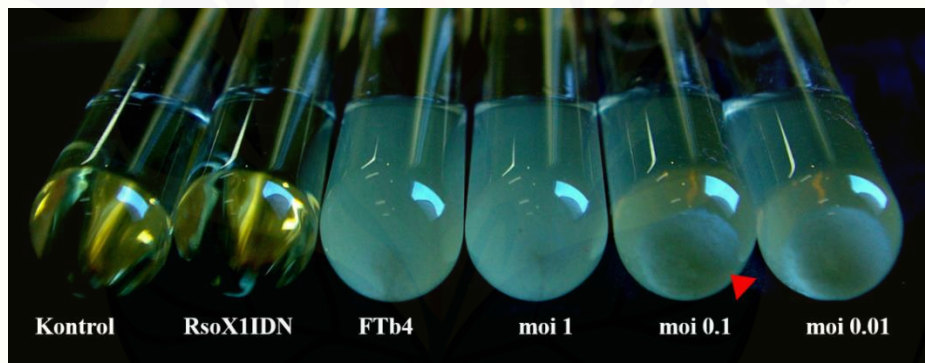
Lampiran 1.
Dokumentasi Hasil Penelitian Tugas Akhir



Gambar 1. Hasil Perhitungan Kerapatan FTb4 $5,8 \times 10^9$ cfu/ml



Gambar 2. Hasil Perhitungan Kerapatan RsoX11DN 3×10^{11} pfu/ml



Gambar 3. Bakteri FTb4 membentuk agregat setelah diinfeksi bakteriofag RsoX11DN



Gambar 4. Batang tanaman tembakau hasil uji in vivo

Lampiran 2.
Hasil Uji Pengendalian Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau

Tabel 1. Rerata Keparahan Penyakit pada Tanaman Tembakau

Perlakuan	Keparahan (%)							
	0	2	4	6	8	10	12	14
Kontrol	0	0	0	0	0	0	0	0
RsoX1IDN	0	0	0	0	0	0	0	0
FTb4	0,00	66,67	76,67	80,00	80,00	83,33	83,33	86,67
moi 0,01	0,00	33,33	40,00	50,00	43,33	43,33	43,33	43,33

Tabel 2. Laju Infeksi Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau

Laju Infeksi Hari ke-	Kontrol	RsoX1IDN	FTb4	moi 0,01
0 – 2	0,00	0,00	0,00	0,00
2 – 4	0,00	0,00	0,22	0,15
4 – 6	0,00	0,00	0,12	0,20
6 – 8	0,00	0,00	0,00	-0,14
8 – 10	0,00	0,00	0,10	0,00
10 – 12	0,00	0,00	0,00	0,00
12 – 14	0,00	0,00	0,16	0,00
RERATA	0,00	0,00	0,09	0,03