



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG YANG
MENGINFEKSI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PADA
PISANG ASAL KABUPATEN LUMAJANG**

SKRIPSI

Oleh

**NORITA FATATIK AZIZI
NIM 101510501026**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG YANG
MENGINFEKSI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PADA
PISANG ASAL KABUPATEN LUMAJANG**

SKRIPSI

diajukan guna memenuhi salah satu persyaratan untuk menyelesaikan
Program Sarjana pada Program Studi Agroteknologi (S1)
Fakultas Pertanian Universitas Jember

Oleh

**NORITA FATATIK AZIZI
NIM 101510501026**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama: Norita Fatatik Azizi

NIM : 101510501026

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: “**Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang**” adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap dan etika ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, April 2015
Yang menyatakan,

Norita Fatatik Azizi
NIM 101510501026

SKRIPSI

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG YANG
MENGINFEKSI BAKTERI *Ralstonia solanacearum* PADA
PISANG ASAL KABUPATEN LUMAJANG**

Oleh

**NORITA FATATIK AZIZI
NIM 101510501026**

Pembimbing

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D.
NIP : 19801109 200501 1 001

Pembimbing Anggota : Ir. Paniman Ashna Mihardjo, M.P.
NIP : 19500903 198003 1 001

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang**”

telah diuji dan disahkan pada :

hari, tanggal : Rabu, 1 April 2015

tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Tim Penguji
Penguji,

Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS. Ph.D.
NIP 19521217 198003 2 001

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D
NIP 19801109 200501 1 001

Ir. Paniman Ashna Mihadjo, M.P.
NIP 19500903 198003 1 001

Mengesahkan
Dekan,

Dr. Ir. Jani Januar, M.T.
NIP 19590102 198803 1 002

RINGKASAN

Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang. Norita Fatatik Azizi, 101510501026. Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Kabupaten Lumajang Jawa Timur, merupakan salah satu wilayah yang mempunyai keragaman plasma nutfah tanaman pisang. Budidaya tanaman pisang tidak terlepas dari kendala gangguan hama dan penyebab penyakit. Salah satu penyebab penyakit yang menyerang adalah bakteri layu yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* (sebelumnya bernama *Pseudomonas solanacearum*). Bakteri *R. solanacearum* menimbulkan kerugian yang sangat besar karena penyebarannya sangat luas dan mampu menginfeksi berbagai jenis tanaman. Pada tahun 2004, jumlah tanaman pisang yang terserang dilaporkan mencapai 2.116.829 rumpun, sehingga perlu dilakukan tindakan pengendalian, salah satunya melalui pemanfaatan bakteriofag yang spesifik menginfeksi bakteri tersebut.

Identifikasi isolat bakteri yang diduga sebagai patogen layu bakteri yang diisolasi dari jaringan tanaman pisang asal Lumajang dilakukan dengan teknik PCR. Isolasi bakteriofag dari tanah perakaran pisang yang sakit dilakukan untuk mendapatkan partikel bakteriofag yang spesifik terhadap bakteri *R. solanacearum*, infektifitas (virulensi) bakteriofag terhadap semua isolat, juga dilakukan selain analisa jenis asam nukleat dengan menggunakan perlakuan enzim RNAse dan DNAse.

Identifikasi patogen menggunakan teknik PCR pada sembilan isolat layu bakteri pada pisang asal Kabupaten Lumajang, membuktikan bahwa patogen layu pada pisang disebabkan oleh *R. solanacearum*. Kedua partikel bakteriofag (ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2) mampu menginfeksi ke sembilan isolat bakteri *R. solanacearum*, meskipun dua isolat bakteri (TP1 dan TP2) memiliki jenis *plaque* yang keruh yang diduga akibat siklus lisogenik pada bakteriofag dan strain bakteri yang berbeda dari isolat lainnya. Analisa asam nukleat yang dilakukan menunjukkan bahwa asam nukleat bakteriofag berupa DNA (*deoxyribonucleic acid*).

SUMMARY

Isolation and Characterisation of Bacteriophages that infect Bacterial *Ralstonia solanacearum* on Banana of Lumajang District . Norita Fatatik Azizi, 101510501026. Agrotechnology Study Program; Faculty of Agriculture University of Jember.

Lumajang, East Java, is an area that has banana germplasm diversity. Banana plants can not be separated from pests and diseases, one of the diseases is bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (the previous name is was *Pseudomonas solanacearum*). *R. solanacearum* causes yield losses due to its widespread distribution and wide hostranges. In 2004, the number of infected banana plants were reported up to 2,116,829 clumps. Therefore, it is necessary to control the pathogen such as the use of spesific bacteriophages.

Identification of bacterial isolates which were suspected as pathogen of bacterial wilt disease isolated from banana plant tissue from Lumajang was done by PCR technique. Isolation of bacteriophages from soil of bacterial wilt infected banana roots was conducted to obtain specific bacteriophage particles against *R. solanacearum*. Infectivity (virulence assay) of bacteriophages in all isolates, was also done beside nucleic acid analysis using RNAse and DNAse enzyme treatment to determine the type of nucleic acid of bacteriophage.

Pathogen identification using PCR technique in all nine isolates origin from Lumajang, have proved that the disease was caused by *R. solanacearum*. Both bacteriophage particles (ϕ RSSKD1 and ϕ RSSKD2) capable to infect all nine isolates of *R. solanacearum*, although the two isolates (TP1 and TP2) have turbid plaques which was probably caused by lysogenic cycle in bacteriophage and different strains of bacteria. Nucleic acid analysis showed that the bacteriophage nucleic acid was DNA (*deoxyribonucleic acid*).

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, Sholawat serta salam kita sampaikan kepada Nabi Muhammad SAW, Keluarga, Sahabat serta pengikut Beliau yang setia hingga akhir zaman, sehingga penyusunan skripsi dengan judul Isolasi dan Karakterisasi Bakteriofag yang Menginfeksi Bakteri *Ralstonia solanacearum* pada Pisang Asal Kabupaten Lumajang dapat diselesaikan. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) sebagai sarjana pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Beberapa pihak turut membantu penyusunan skripsi ini. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Dr. Ir. Jani Januar, M. T. selaku Dekan Fakultas Pertanian;
2. Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU), Ir. Paniman Ashna Mihardjo, M.P. selaku Dosen Pembimbing Anggota (DPA) dan Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS. Ph.D. selaku Dosen Penguji, yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, peningkatan wawasan, keterampilan, dan motivasi dalam pelaksanaan penelitian serta penyelesaian skripsi;
3. Dr. Ir. Moch. Hoesain, MS. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Kedua Orang Tua ku, Ibu Farida dan Bapak Mahfud, serta Kakak ku Abu Qusairi, S.E., dan Mila Sari Pristi N, S.E. yang tidak pernah lelah selalu mendukung dan mendo'akan demi kelancaran dalam penelitian dan menuntut ilmu.

Akhirnya penulis berharap semoga Karya Ilmiah (Skripsi) ini dapat bermanfaat bagi pembaca dan dapat digunakan sebagai acuan penelitian-penelitian selanjutnya.

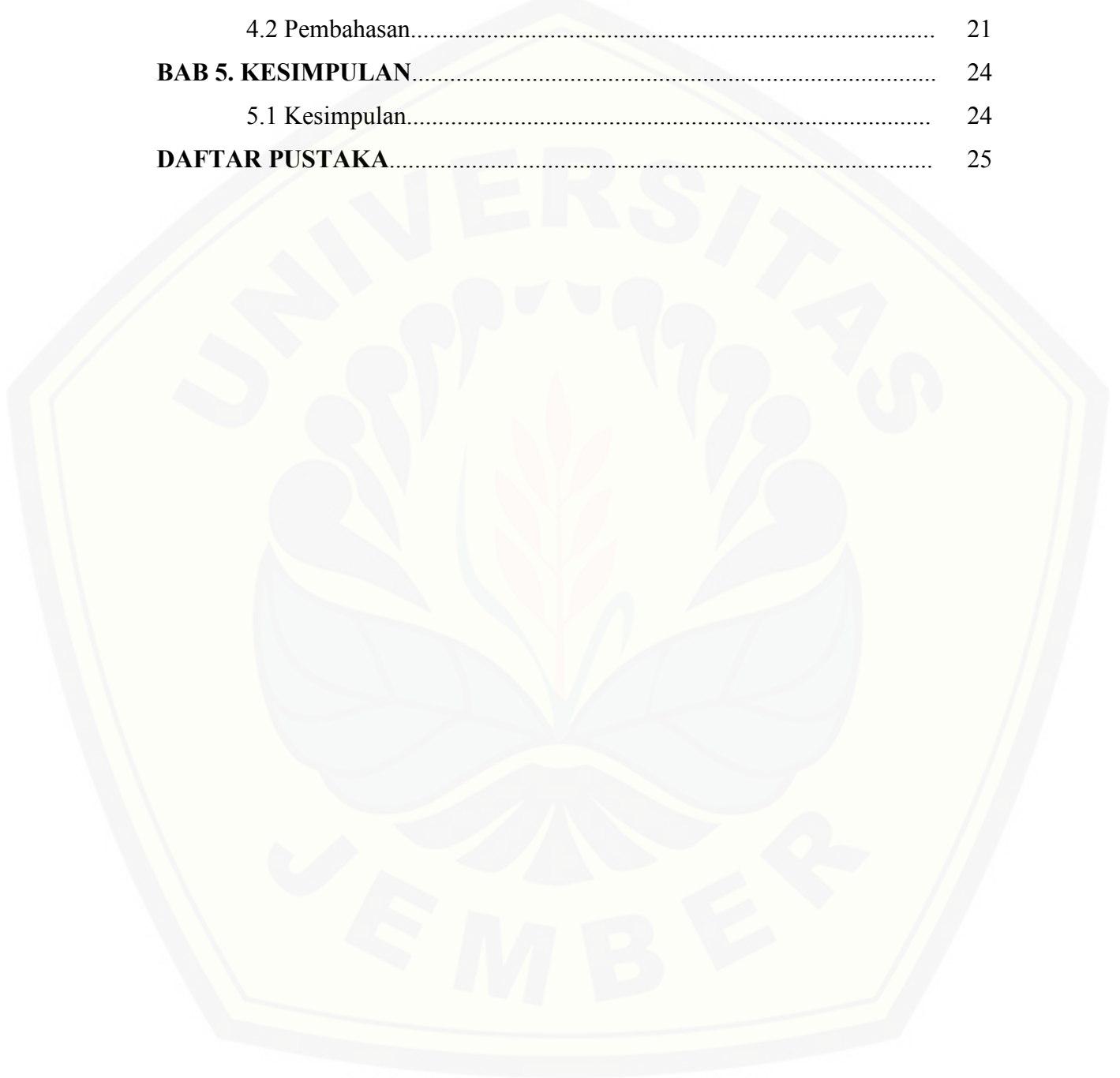
Jember, 1 April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
BAB 2. TINJUAN PUSTAKA	4
2.1 Habitat dari tanaman pisang.....	4
2.2 <i>Ralstonia solanacearum</i> sebagai patogen pada pisang.....	4
2.3 Identifikasi <i>R. solanacearum</i> dengan PCR.....	5
2.4 Bakteriofag pada bakteri <i>R. solanacearum</i>	6
BAB 3. METODE PENELITIAN	9
3.1 Bahan dan alat.....	9
3.3 Metode.....	9
3.3.1 Pengambilan sampel.....	9
3.3.2 Isolasi bakteri <i>R. solanacearum</i> pada tanaman pisang, Uji hipersensitifitas dan sifat Gram (KOH 3%).....	10
3.3.3 Isolasi DNA bakteri.....	11
3.3.4 Deteksi gene <i>fliC</i> pada isolat yang diduga <i>R. solanacearum</i>	12
3.3.5 Visualisasi hasil PCR.....	12
3.3.6 Isolasi bakteriofag.....	12
3.3.7 Purifikasi bakteriofag.....	12
3.3.8 Infektifitas (Virulensi) bakteriofag.....	13
3.3.9 Analisa asam nukleat bakteriofag.....	13
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Hasil.....	15
4.1.1 Pengambilan sampel.....	15

4.1.2 Gejala layu bakteri pada pisang.....	15
4.1.3 Identifikasi genom <i>R. solanacearum</i> dengan primer <i>fliC</i>	18
4.1.4 Isolasi dan karakterisasi bakteriofag.....	19
4.2 Pembahasan.....	21
BAB 5. KESIMPULAN	24
5.1 Kesimpulan.....	24
DAFTAR PUSTAKA	25



DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
4.1	Hasil uji larutan KOH 3% dan uji hipersensitifitas tembakau pada beberapa bakteri yang dirisolasi dibeberapa varietas pisang dari beberapa kecamatan di Kabupaten Lumajang.....	18
4.2	Reaksi dua macam bakteriofag terhadap sembilan isolat <i>R. solanacearum</i>	19

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
3.1	Peta pengambilan sampel di beberapa kecamatan (tanda merah) di Kabupaten Lumajang.....	10
4.1	Buah pisang dari dua varietas yang bergejala patogen layu bakteri.....	15
4.2	Gejala penyakit layu bakteri pada pisang.....	16
4.3	Karakteristik pertumbuhan koloni isolat patogen layu bakteri tanaman pisang pada media CPG yang mengandung 0.01% TZC, foto diambil 24 jam setelah inkubasi kecuali isolat PJ1 (48 jam).....	17
4.4	Elektroforesis hasil PCR isolat bakteri penyebab penyakit layu bakteri menggunakan primer <i>fliC</i> pada 1% gel agarose.....	18
4.5	Uji infektifitas ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2 pada beberapa isolat <i>R. solanacearum</i> menggunakan.....	20
4.6	Kenampakan jenis <i>plaque</i> yang berbeda dilihat dari tingkat kekeruhan.....	20
4.7	Visualisasi elektroforesis asam nukleat bakteriofag menggunakan 1% gel agarose.....	21

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kabupaten Lumajang Jawa Timur, merupakan salah satu wilayah yang mempunyai keragaman plasma nutfah pisang. Di daerah ini terdapat 33 plasma nutfah pisang (Prahardini *et al.*, 2010). Pisang sebagai salah satu jenis buah yang berpotensi tinggi untuk dikelola dan dikembangkan dimasa kini dan mendatang, tanaman pisang tidak terlepas dari berbagai kendala salah satunya adalah serangan hama dan penyakit. Di Indonesia, hingga saat ini penyakit layu bakteri yang disebabkan *Ralstonia solanacearum* (sebelumnya bernama *Pseudomonas solanacearum*) masih merupakan salah satu penyakit yang sangat penting pada berbagai jenis tanaman hortikultura. Bakteri ini mempunyai banyak tanaman inang, meliputi tomat, kentang, terung, cabai, buncis, kacang panjang, jahe, dan pisang.

Penamaan penyakit layu bakteri, masih sering digunakan beberapa nama berbeda. Supriadi (1999) menggunakan nama *Pseudomonas celebensis*, sedangkan nama ilmiah yang digunakan saat ini adalah *R. solanacearum*. Tingkat pengamat lapangan, penyakit ini disebut sebagai penyakit darah. Sedangkan kedua penyakit ini di Sumatera Barat dikenal petani sebagai penyakit layu kuning (Nasir *et al.*, 2005). Bakteri *R. solanacearum* menimbulkan kerugian yang besar karena penyebarannya sangat luas dan mampu menginfeksi berbagai jenis tanaman (Supriadi, 2011), salah satunya adalah tanaman pisang. Pada Tahun 2004, jumlah tanaman pisang yang terserang dilaporkan mencapai 2.116.829 rumpun (Departemen Pertanian, 2005). Hal tersebut disebabkan (i) semua jenis tanaman pisang yang dibudidayakan saat ini rentan terhadap patogen tersebut dan sumber-sumber ketahanan yang ada pada tanaman pisang tipe liar sangat terbatas, (ii) tingginya potensi penularan oleh serangga vektor, dan (iii) biaya pengendaliannya relatif mahal serta hanya dapat diimplementasikan dalam areal kerja yang luas (Rustam, 2007).

Bakteriofag merupakan virus yang menginfeksi dan memperbanyak diri pada sel bakteri inang yang spesifik, terdiri dari asam nukleat yang dikelilingi oleh

selubung protein (Haq *et al.*, 2012). Bakteriofag ini memiliki target yang spesifik yaitu hanya menyerang bakteri yang merupakan inang dari bakteriofag itu sendiri (Kakoma, 2009). Bakteriofag memiliki perbedaan dengan virus yang lain yaitu virus hidup dan berkembang biak dalam organisme lain yang multisel sedangkan bakteriofag hidup dan berkembang biak dalam organisme yang unisel (Clokie, 2011).

Kespesifikan bakteriofag telah dimanfaatkan sebagai deteksi terhadap spesies dan strain bakteri (Hagens and Loessner, 2007). Kespesifikan bakteriofag tersebut telah dibuktikan, bahwa bakteriofag yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* tidak mampu menginfeksi bakteri *Xanthomonas campestris* (Addy *et al.*, 2012).

Dalam penelitian ini dilakukan karakterisasi bakteriofag dengan mengetahui inang virus yang dapat diinfeksi oleh bakteriofag dengan melihat dari gejala serangannya. Menurut Askora *et al.* (2009) dari masing-masing bakteriofag (ϕ RSM1, ϕ RSM3, ϕ RSM13, dan ϕ RSS1) pada 15 strain bakteri *R. solanacearum* penyebab penyakit layu pada tomat, memiliki kisaran inang yang berbeda. Seperti halnya partikel virus pada umumnya, partikel bakteriofag diketahui terdiri atas mantel protein dan asam nukleat (Hershey and Chase, 1952). Menurut Yuwono (2005) bahwa asam nukleat dapat berupa DNA dan RNA.

1.1 Rumusan Masalah

Permasalahan pada penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut :

1. Apakah isolat bakteri yang diisolasi dari jaringan tanaman pisang yang bergejala layu disebabkan oleh bakteri *R. solanacearum*.
2. Apakah disekitar tanaman pisang terdapat agen hayati untuk mengendalikan *R. solanacearum*.
3. Bagaimana karakteristik bakteriofag yang menginfeksi isolat *R. solanacearum* pada pisang dari beberapa kecamatan di Kabupaten Lumajang.

1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

1.2.1 Tujuan

1. Untuk mengetahui apakah tanaman pisang yang bergejala layu disebabkan oleh *R. solanacearum*.
2. Untuk mengetahui apakah disekitar tanaman pisang terdapat agen hayati yang dapat mengendalikan *R. solanacearum*.
3. Untuk mengetahui karakteristik bakteriofag yang menginfeksi patogen *R. solanacearum* pada tanaman pisang pada beberapa daerah di Lumajang.

1.2.2 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini ialah sebagai sumber informasi tentang karakteristik bakteriofag yang dapat menginfeksi bakteri patogen *R. solanacearum* pada pisang asal Lumajang.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Habitat tanaman pisang

Pisang adalah salah satu tanaman budidaya paling penting untuk masyarakat yang hidup daerah tropis dan subtropis. Tanaman ini menjadi komoditi pertanian global terpenting nomor empat setelah beras, gandum dan susu. Sebagian besar dikonsumsi oleh penduduk lokal, tetapi kira-kira 10% dari 70 juta produksi dunia adalah diekspor (Khasanah, 2009). Pada kondisi tanpa air, pisang masih tetap tumbuh karena air dapat disuplai dari batangnya yang mengandung banyak air. Angin dengan kecepatan tinggi seperti angin kumbang dapat merusak daun dan mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Curah hujan optimal adalah 1.520-3.800 mm/tahun dengan 2 bulan kering. Variasi curah hujan harus diimbangi dengan ketinggian air tanah agar tanah tidak tergenang pada daerah pertanaman (Kantor Deputy Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, 2000).

Kabupaten Lumajang Jawa Timur, merupakan salah satu wilayah yang mempunyai keragaman plasma nutfah pisang. Salah satu sentra tanaman pisang yaitu di Kecamatan Senduro dan Pasrujambe karena keragaman varietas pisang yang dibudidayakan petani cukup tinggi. Jumlah kultivar pisang yang ditemukan di kecamatan tersebut sebanyak 14 kultivar, diantaranya Pisang embun, pisang byar, pisang agung semeru, pisang agung jawa, pisang kepok, pisang barley/berlin, pisang mas kripik, pisang mas kirana, pisang ambon kuning, pisang ambon hijau, pisang songgro, pisang susu, pisang raja angka, dan pisang raja mala (Prahardini *et al.*, 2010).

2.2 *Ralstonia solanacearum* sebagai patogen pada pisang

R. solanacearum merupakan penyebab Penyakit layu yang menjadi masalah utama dalam budidaya tanaman famili Solanaceae dan tanaman penting lainnya seperti pisang dan mulberry. *R. solanacearum* merupakan bakteri Gram negatif dan berbentuk batang, menginfeksi melalui luka pada akar dan daun akibat nematoda atau insekta (Dewi *et al.*, 2014).

Indikator gejala serangan bakteri *R. solanacearum* pada tanaman pisang di lapang, didasarkan pada gejala khas layu bakteri berupa penguningan daun, munculnya cairan putih (*ooze*) pada kelopak bunga jantan (jantung), jatung kering dan layu, tetapi kelopaknya masih melekat dan menggulung ke atas, daging buah menghitam, dan pembusukan di bagian tengah pseudostem atau bagian tengah bonggol (Nasir *et al.*, 2005).

Ciri-ciri yang tampak pada tanaman pisang yang terserang patogen darah adalah pada saat menjelang timbulnya tandan, mula-mula daun muda mengalami perubahan warna dari ibu tulang daun ketepi daun tampak warna kekuning-kuningan. Kondisi ini berlangsung hingga buah menjelang masak. Dalam jangka waktu seminggu setelah gejala pertama, semua daun menguning dan kering lalu menjadi coklat dan tanaman menjadi layu. Perkembangan buah lambat, dimana pada saat buah hampir masak, buah berwarna kuning kecoklatan dan busuk, daging buah menjadi cairan seperti lendir berwarna merah kecoklatan yang mengandung banyak bakteri. Selanjutnya apabila batang dipotong melintang akan mengeluarkan cairan yang berwarna coklat kemerahan dan berbau kurang sedap (Liptan, 2003).

Koloni *R. solanacearum* berwarna putih, fluidal dan berbentuk tidak teratur bila ditumbuhkan pada medium YPA (*Yeast peptone agar*). Pada medium TTC (*Tripentyltetrazolium Chloride*) koloni berwarna putih dengan pusat merah muda yang menandakan isolat tersebut mempunyai tingkat virulensi yang tinggi. Warna putih bagian pinggir koloni adalah EPS (Ekstraseluler Polisakarida) yang berfungsi sebagai pertahanan diri bakteri dari faktor lingkungan yang tidak mendukung, juga sebagai cadangan makanan bagi bakteri (Liestiany *et al.*, 2012).

2.3 Identifikasi *R. solanacearum* dengan PCR

Bakteri *R. solanacearum* dikenal mempunyai keragaman genetik yang tinggi, dan diperlukan diagnosis strain yang informatif yaitu dengan teknik genetik molekuler untuk diagnosis strain khususnya dengan PCR yang cukup akurat, cepat serta menghasilkan informasi yang lebih luas (Suryadi dan

Machmud, 2001), dengan menggunakan primer khusus yang dapat mendeteksi dalam jumlah kecil, yaitu satu sel dalam sampel (Seal *et al.*, 1993).

Pendeteksian dengan primer DNA mempunyai tingkat kepekaan yang dapat mendeteksi 1-20 sel bakteri (Maghirang, 1993). Primer DNA 759f/760r menghasilkan satu produk fragmen PCR berukuran 281 bp pada semua strain *R. solanacearum* yang diuji dan tidak bereaksi terhadap genus *Pseudomonas* lainnya (Suryadi dan Mahmud, 2001). Sedangkan Taghavi *et al.* (1996) menguji strain *Pseudomonas* berdasarkan urutan gen 16S rRNA.

Teknik PCR dilakukan melalui pendekatan yang sesuai dengan amplifikasi urutan gen ribosom, seperti gen pengkode 16S rRNA yang tidak mudah termutasi dan mengandung tanda urutan spesifik spesies yang berguna untuk mengidentifikasi bakteri hingga ke level spesies (Israhmadini, 2008), dan 16s rDNA yang merupakan gen pengkode 16s RNA yang dimiliki oleh semua bakteri (Nuroniyah dan Putra, 2012). Beberapa primer khusus lainnya seperti gen endoglukanase, *hrpB*, *fliC*, dan urutan DNA sitokrom *c1* peptida sinyal dikembangkan untuk mendeteksi *R. solanacearum* (Chen *et al.*, 2010).

Flagellin (FliC) adalah struktur penyusun filamen dari komponen spesifik flagela yang terdiri dari protein (Tasteyre *et al.*, 2001). Primer *Rsol fliC* dirancang spesifik untuk *R. solanacearum*. Dengan sistem primer ini, produk PCR spesifik diperoleh 400 bp diuji pada *R. solanacearum* dari semua 82 strain (Schonfeld *et al.*, 2003).

2.4 Bakteriofag pada bakteri *R. solanacearum*

Pemanfaatan bakteriofag dalam pengendalian penyakit dan perlindungan tanaman tanpa menggunakan bahan kimia berkembang dengan cepat. Bakteriofag ϕ RSM3 yang menginfeksi strain *R. solanacearum* digunakan sebagai agen potensial untuk mengendalikan bakteri layu pada tomat dan dapat mengurangi keracunan pada tanaman. Ditunjukkan dengan perlakuan pada patogen layu bakteri tanaman tomat yang diinokulasikan ϕ RSM3 (10^5 CFU/ml) tidak menyebabkan tanaman menjadi layu (Addy *et al.*, 2012).

Beberapa Bakteriofag yang telah diisolasi dari *R. solanacearum* memiliki sifat fisik dan fisiologis, seperti pada bakteriofag P4282 yang virulen, memiliki kepala polyhedral (diameter 69 nm) dan ekor pendek (panjang 20 nm) (Tanaka *et al.*, 1990), dan mengandung 39,3-kbp genom dsDNA sirkular (Ozawa *et al.*, 2001). Sedangkan bakteriofag PK-101, yang diisolasi dari tanah memiliki 35-kbp genom dsDNA linear (Toyoda *et al.*, 1991). Keduanya menunjukkan kisaran inang yang sangat sempit, hanya menginfeksi beberapa strain *R. solanacearum*. bakteriofag P4282 yang menginfeksi strain M4S, digunakan untuk mengontrol layu bakteri tanaman tembakau di laboratorium (Tanaka *et al.*, 1990). Penggunaan bakteriofag sebagai agen biokontrol terhadap layu bakteri, diperlukan bakteriofag yang memiliki kisaran inang yang luas dan aktivitas litik yang kuat.

Empat jenis bakteriofag (ϕ RSL, ϕ RSA, ϕ RSM dan ϕ RSS) yang diisolasi dari beberapa strain *R. solanacearum* memiliki karakteristik dan kisaran inang yang berbeda. Pada bakteriofag ϕ RSL1 dan ϕ RSA1 tipe Myovirus memiliki 240 kbp dan 39 kbp genom dsDNA. Bakteriofag ini memiliki kisaran inang yang relatif luas. Pada bakteriofag ϕ RSA1 mampu menginfeksi 15 strain *R. solanacearum* dari berbagai ras atau biovar yang berbeda. Sedangkan pada bakteriofag ϕ RSM1 dan ϕ RSS1 tipe Inovirus memiliki ukuran genom ssDNA 9,0 kb dan 6,6 kb. Bakteri *R. solanacearum* yang sensitif terhadap ϕ RSM1 menunjukkan resisten terhadap ϕ RSS1 dan sebaliknya. Beberapa strain *R. solanacearum* terkandung ϕ RSM1 dan sedikitnya satu strain menghasilkan partikel ϕ RSM1, yang menunjukkan keadaan lisogenik. Bakteriofag ini tidak hanya dapat digunakan untuk studi biologi molekuler dari *R. solanacearum* tetapi juga untuk deteksi spesifik dan efisien (ϕ RSM1 dan ϕ RSS1) dan pengendalian patogen berbahaya (ϕ RSL dan ϕ RSA) di tanam ekosistem serta tumbuh tanaman (Yamada *et al.*, 2007).

Asam nukleat adalah suatu polimer nukleotida yang berperan dalam penyimpanan serta pemindahan informasi genetik. Bahan genetik virus ada yang berupa DNA dan ada yang berupa RNA. Molekul DNA dan RNA tersebut dapat berupa molekul untai tunggal (*single-stranded*) dan dapat berupa molekul untai

ganda (*double-stranded*). Ekspresi genetik virus dilakukan dengan menggunakan sistem enzim yang ada di dalam sel bakteri (Yuwono, 2005).



BAB 3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini dilaksanakan di *Laboratorium Center for Development of Advanced Scienced and Technologi* (CDAST) Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Juni 2014 - Januari 2015.

3.1 Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Sampel tanaman pisang yang bergejala layu bakteri, media *Casaminoacid Pepton Glucose* (CPG), media *Nutrient Agar* (NA), media *Top Agar*, glukosa, akuades, alkohol, gliserol, NaCl, polyethylene glycol, SM buffer, bahan deteksi gene *fliC* dengan PCR, *2× master mix solution* (merk Intron), Enzim DNase dan RNase.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : Kamera digital, petridish, tabung reaksi, tabung eppendorf, mikropipet, autoklaf, laminar air flow, jarum ose, cutter, alumunium foil, bunsen, kapas, tissue, cutter, vortex, lemari pendingin, inkubator, rak tabung reaksi, rak eppendorf, filter membran 0.2 μm , erlenmeyer, gelas ukur, timbangan, pH meter, *gel doc*, alat deteksi PCR.

3.3 Metode

3.3.1 Pengambilan sampel

Metode ini dilakukan untuk menentukan lokasi pengambilan sampel tanaman pisang yang bergejala layu bakteri serta sampel tanah perakaran yang berada di daerah Lumajang. Kegiatan ini dilakukan dengan melakukan pemetaan daerah Kabupaten Lumajang dan mengambil sampel yang dapat mewakili populasi serangan mengikuti arah penyebaran patogen (Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Peta pengambilan sampel di beberapa kecamatan (tanda merah) di Kabupaten Lumajang.

3.3.2 Isolasi *R. solanacearum* tanaman pisang, uji hipersensitif, dan sifat Gram (KOH 3%)

Bakteri diisolasi dari sampel pohon pisang terinfeksi patogen dengan gejala layu yang disertai keluarnya cairan berwarna merah seperti darah. Bonggol pisang yang bergejala di desinfeksi permukaannya dengan 70% etanol dan dibilas 4-5 kali menggunakan air steril, sampel dipotong ukuran 5 mm dan ditanam pada media NA dan diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah diinkubasi mengamati pertumbuhan koloni, koloni yang tumbuh digoreskan pada media CPG (*Cassaminoacid Peptone Glucose*) dan diinkubasi selama 24-48 jam.

Uji hipersensitif dilakukan pada daun tanaman tembakau dengan perlakuan melukai permukaan bawah daun pada percabangan tulang daun dengan menggunakan jarum steril dan menyuntikkan suspensi bakteri berumur 24 jam, diamati gejala yang muncul. Uji sifat gram bakteri dengan larutan KOH 3%, sebanyak satu ose bakteri diletakkan pada objek gelas kemudian ditambah satu

tetes KOH 3% dan dicampur hingga homogen dengan jarum ose. Bakteri Gram negatif ditunjukkan dengan sifat yang menyerupai lendir dan lengket, sedangkan bakteri gram positif memiliki sifat yang cair/encer.

3.3.3 Isolasi DNA bakteri

Isolasi DNA bakteri bertujuan untuk identifikasi bakteri *R. solanacearum*, dan ditunjukkan dengan tiga tahapan, yaitu tahapan preparasi ekstrak sel DNA (perusakan dinding sel dan lisis membran sel), langkah pertama yaitu munumbuhkan bakteri hingga berumur 24-48 jam sebanyak 1500 µl suspensi dan dipindah ke tabung eppendrof. Sentrifugasi selama 10 menit kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C sehingga didapatkan endapan (pelet) dan dihomogenkan dengan 100 µl TE buffer (10 mM tris, 0,1 mM EDTA (ethilendiamin tetra asetat)). Tahapan selanjutnya yaitu purifikasi (pemurnian) DNA, untuk menghilangkan kotaminasi dari senyawa sekunder (fenol), polisakarida, protein dan RNA dengan cara suspensi bakteri ditambahkan dengan 100 µl PCI (*Phenol: Chloroform:Isoamyl alcohol -25:24:1*), lalu dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit. Campuran tersebut disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C sehingga. Supernatan (lapisan atas yang bening) diambil dan ditambahkan 10% 3M sodium asetat. Terakhir adalah tahapan presipitasi DNA dengan 97% etanol absolut (dingin) dengan sebanyak ± 2,5× volume sampel dan diinkubasi pada -20°C selama 60 menit. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit 4°C, dan pelet dicuci dengan 100 µl 70% etanol, dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit 4°C.

Pelet yang diperoleh dibersihkan dari sisa-sisa etanol dengan cara dikering anginkan pada oven 45°C. Kemudian ditambah 50 µl TE buffer (10 mM tris, 0,1 mM EDTA), dicampur hingga homogen dan disimpan pada suhu 4°C. Pelet ini adalah DNA yang akan digunakan pada PCR.

3.3.4 Deteksi gene *fliC* pada isolat yang diduga *R. solanacearum*

Untuk mengetahui isolat bakteri yang diperoleh adalah *R. solanacearum*, maka dilakukan identifikasi menggunakan teknik PCR dengan primer *fliC*. Campuran yang digunakan dalam reaksi PCR (20 μ l) terdiri atas 7 μ l ddH₂O, 1 μ l Primer R (5' GGCGGCCTTCAGGGAGGTC 3'), 1 μ l Primer F (5' GAACGCCAACGGTGCGAACT 3'), 1 μ l sampel DNA, 10 μ l 2x PCR mix (intron).

Amplifikasi DNA bakteri *R. solanacearum* dilakukan pada kondisi berikut : Pre-Denaturasi pada suhu 94°C selama 5 menit, Denaturasi pada suhu 94°C selama 30 detik, Annealing pada suhu 63°C selama 2 menit, Elongasi pada suhu 72°C selama 60 detik, dan Final Elongasi pada suhu 72°C selama 10 menit dengan 25-30 siklus (Schonfeld *et al.*, 2003).

3.3.5 Visualisasi hasil PCR

Sebanyak 5 μ l DNA dielektroforesis pada 1% gel agarosa yang telah dicampur dengan 2 μ l gel red sebagai pewarna (untuk pembacaan pita DNA) dengan 1 \times TBE bufer, pada 50 Volt selama \pm 1,5 jam. Hasil elektroforesis divisualisasi dengan alat UV Gel Documentation System Major Science. Molekul DNA tersebut dapat diketahui ukurannya dengan cara membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi pita DNA marker pada gel (Yuwono, 2005).

3.3.6 Isolasi bakteriofag

Bakteriofag didapatkan dari tanah perakaran tanaman pisang yang bergejala layu bakteri di daerah Lumajang. Sebanyak 20 g tanah dan 4 ml kultur bakteri umur 24 jam ditambahkan pada 100 ml CPG (*Casaminoacid peptone glucose*) yang mengandung 1% CaCO₃ + 50 μ l Mg SO₄.7H₂O. Suspensi digojok selama 24-48 jam dan disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm 4°C selama 10 menit, dan difiltrasi dengan filter (Steradisc, Krabo Co.) dengan kerapatan pori 0.2 μ m.

3.3.7 Purifikasi bakteriofag

Bakteriofag asal *plaque* tunggal (berdiameter kecil ϕ RSSKD1 dan besar ϕ RSSKD2) dipropagasi dan dimurnikan dengan dikulturkan pada media CPG cair dan digojok selama 24-48 jam. Sel bakteri dipisahkan dari virus dengan sentrifuge pada kecepatan 7000 rpm 4°C selama 10 menit dan supernatan difiltrasi dengan menggunakan filter membran (Steradisc, Krabo Co.) dengan kerapatan pori 0.2 μ m. Partikel bakteriofag tersebut disimpan pada suhu -4°C hingga digunakan pada pengujian selanjutnya.

3.3.8 Infektifitas (virulensi) bakteriofag

Spot test dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteriofag dalam mendeteksi beberapa isolat *R. solanacearum* yang diambil dari beberapa lokasi di daerah Lumajang. *Spot test* dilakukan mengacu pada Armon and Kott (1993) dengan cara 350 μ l suspensi bakteri *R. solanacearum* yang berumur 24 jam ditambahkan pada media *Top Agar* 0.3% yang masih hangat (suhu sekitar 50°C) lalu dituang pada permukaan media CPG dalam cawan Petri (metode double layer) dan ditunggu sampai media padat. Sebanyak 2 μ l suspensi bakteriofag dispotkan pada permukaan media CPG dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Pertumbuhan bakteriofag diamati dengan terbentuknya *plaque* (zona bening).

3.3.9 Analisa asam nukleat bakteriofag

Bakteriofag (hasil *spot test*) ditambahkan dengan 4 ml SM buffer (50 mM Tris/HCl pada pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgSO₄ and 0.01 % gelatin) dan diinkubasi 24 jam pada suhu 4°C. Suspensi bakteriofag ditambah dengan 5 μ l *chloroform* dan disentrifugasi pada kecepatan 7000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan ditambah *polyethylene glycol* 6000 dengan perbandingan 1:1. Suspensi bakteriofag disentrifugasi dengan menggunakan sentrifugasi ultra pada kecepatan 40.000 rpm selama 2 jam dengan suhu 4°C. Pelet yang terbentuk dilarutkan dengan TE buffer \pm 500 μ l dan 2 μ l DNase, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Tambahkan 502 μ l PCI (*Phenol: Chloroform:Isoamyl-25:24:1*) dan dihomogenkan. Inkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit. Sentrifugasi

campuran tersebut pada kecepatan 12.000 rpm selama 20 menit pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan ditambah 10% 3M sodium asetat. Asam nukleat dipresipitaskan dengan 97% etanol absolute (dingin) dengan $\pm 2,5 \times$ volume sampel dan diinkubasi pada -20°C selama 60 menit. Setelah itu disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit dengan suhu 4°C, dan pelet dicuci dengan 100 μ l 70% etanol, dihomogenkan dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit 4°C.

Pelet yang diperoleh dibersihkan dari sisa-sisa etanol dengan cara dikering anginkan pada oven 45°C. Kemudian ditambah 50 μ l TE buffer, dihomogenkan. Untuk mengetahui bakteriofag mengandung DNA/RNA dilakukan dengan cara di perlakukan DNase dan RNase dengan kondisi campuran yang terdiri dari 3 μ l ddH₂O, 5 μ l sampel DNA, 5 μ l RNase, 1 μ l buffer I recombinan, dan 1 μ l enzim dan di visualisasikan pada gel agarose 1%.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Pengambilan Sampel

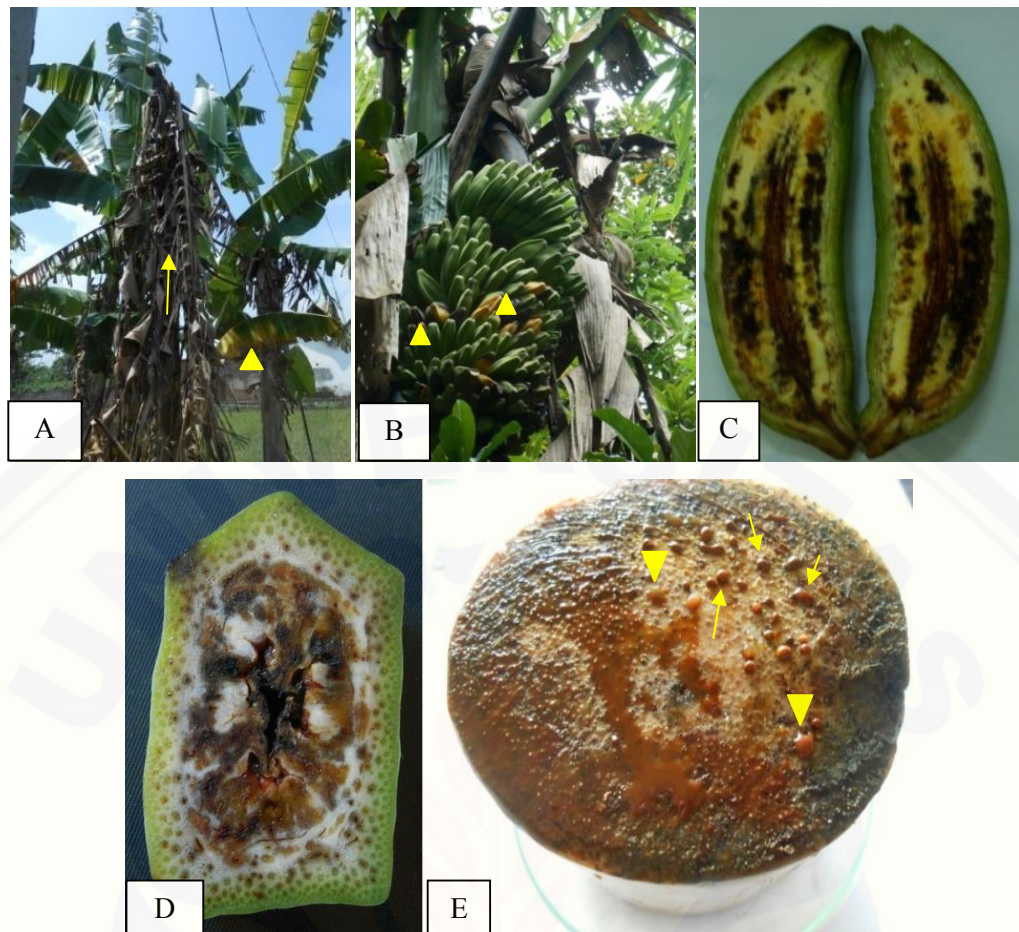
Sampel tanaman pisang yang bergejala layu diperoleh dari tujuh kecamatan di Kabupaten Lumajang, diantaranya Kecamatan Kedung Jajang, Randu Agung, Sukodono, Tekung, Yosowilangun, Tempeh, dan Pasru jambe, yang terdiri dari dua varietas pisang yaitu pisang kepok dan pisang raja.



Gambar 4.1 Buah pisang dari dua varietas yang bergejala patogen layu bakteri (A) pisang raja, (B) pisang kepok.

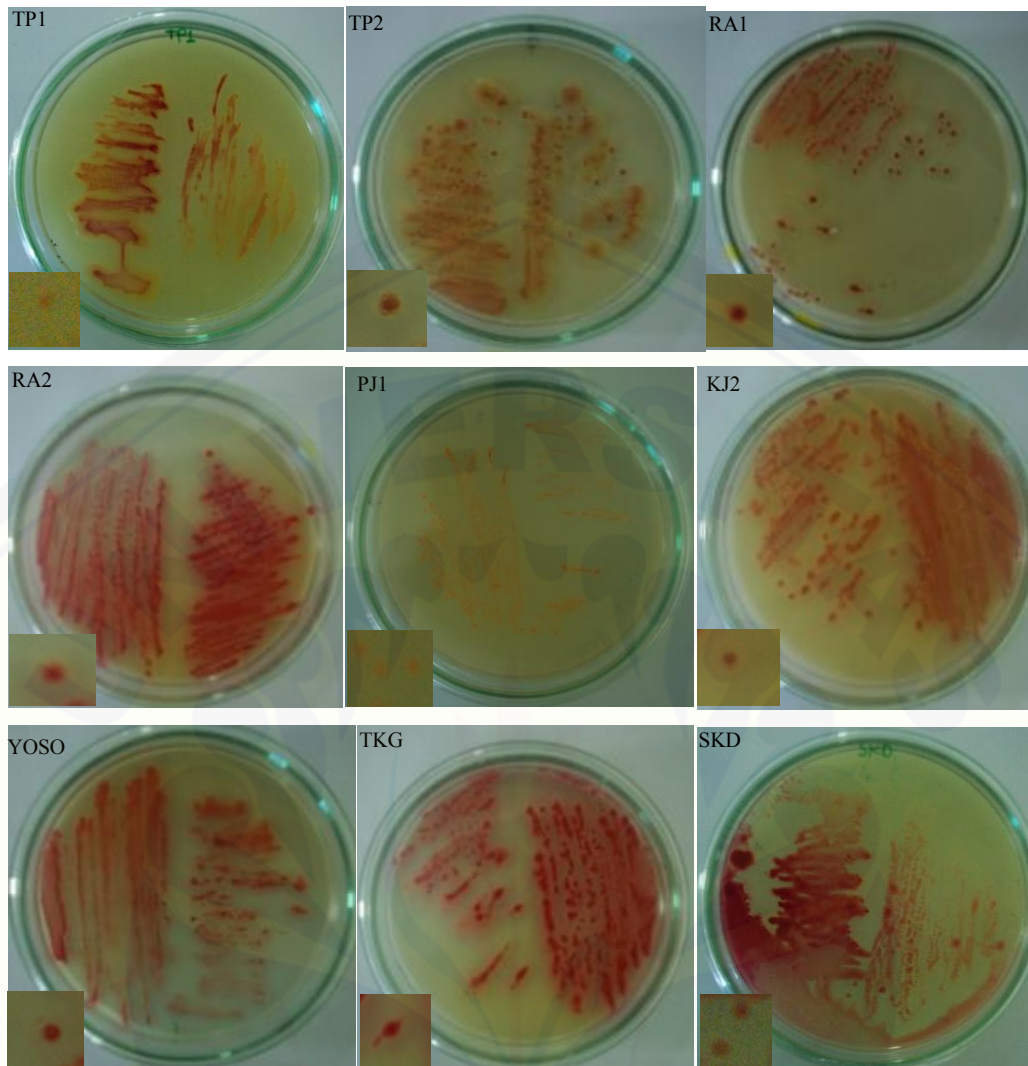
4.1.2 Gejala Layu Bakteri Pada Pisang

Sampel tanaman pisang diambil dari beberapa kecamatan di daerah Lumajang, dan berdasarkan pengamatan di lapang buah tanaman pisang yang terserang patogen menunjukkan gejala layu dan tidak dapat dipanen karena buah menjadi busuk (Gambar 4.2). Pada pohon yang terserang menunjukkan gejala daun menguning, layu dan kering berwarna coklat (Gambar 4.2.A), pada buah berwarna kuning, coklat (Gambar 4.2.B) dan daging buah yang berwarna coklat kehitaman dan busuk berbau tidak sedap (Gambar 4.2.C dan D), sedangkan bonggol terdapat bintik-bintik berwarna coklat kemerahan dan keluar cairan berwarna coklat kemerahan yang menunjukkan massa bakteri (Gambar 4.2.E).



Gambar 4.2 Gejala penyakit layu bakteri pada pisang (A) gejala pada pohon pisang daun menguning dan kering, (B) gejala pada buah berwarna kuning kecoklatan, (C) potongan membujur pada buah, (D) potongan melintang pada buah, (E) gejala pada bonggol keluar ooze bakteri (Tanda panah).

Setelah dilakukan isolasi dari jaringan tanaman pisang bergejala layu bakteri, di peroleh sembilan isolat bakteri yang berasosiasi dengan tanaman pisang yang menunjukkan gejala layu dari beberapa kecamatan di Kab. Lumajang, yaitu Kecamatan Sukodono (SKD), Randu Agung (RA), Kedung Jajang (KJ), Tempeh (TP), Pasru Jambe (PJ), Yosowilangun (Yoso), dan Tekung (TKG). Hasil isolasi menunjukkan bahwa isolat bakteri tersebut memiliki karakteristik koloni berbentuk tidak teratur, cembung mengkilat, dan berwarna merah pada bagian tengah koloni sedangkan pada bagian tepi berwarna putih keruh ketika ditumbuhkan pada media padat CPG + 0.01% TZC (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Karakteristik pertumbuhan koloni isolat patogen layu bakteri tanaman pisang pada media CPG yang mengandung 0.01% TZC, foto diambil 24 jam setelah inkubasi kecuali isolat PJ1 (48 jam).

Seluruh isolat diketahui mampu bereaksi positif pada uji hipersensitifitas pada daun tembakau yang ditandai dengan munculnya gejala nekrosis berwarna kuning diikuti gejala layu setelah 7 hari (Tabel 4.1). Pada uji Gram dengan larutan KOH 3% menunjukkan isolat bereaksi positif yang menandakan bakteri tersebut termasuk Gram negatif.

Tabel 4.1 Hasil uji larutan KOH 3% dan uji hipersensitifitas tembakau pada beberapa bakteri yang diisolasi di beberapa varietas pisang dari beberapa kecamatan di Kabupaten Lumajang.

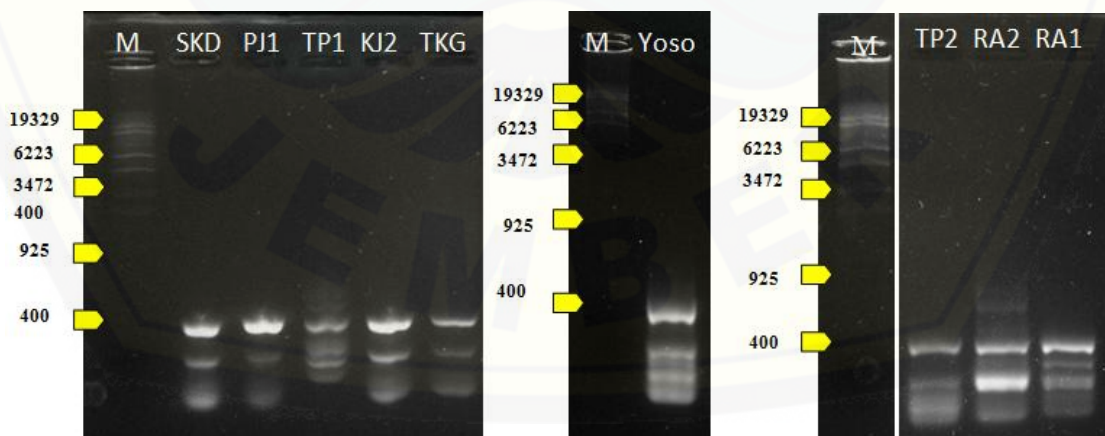
Asal isolat	Varietas pisang	Kode isolat bakteri	Uji gram (KOH 3%) (+/-)	Uji HR (+/-)
Tempeh	Pisang Kepok	TP1	Gram -	+
		TP2	Gram -	+
Randu Agung	Pisang Kepok	RA1	Gram -	+
		RA2	Gram -	+
Pasrujambe	Pisang Raja	PJ1	Gram -	+
Kedung Jajang	Pisang Raja	KJ2	Gram -	+
Yosowilangun	Pisang Kepok	YOSO	Gram -	+
Tekung	Pisang Raja	TKG	Gram -	+
Sukodono	Pisang Kepok	SKD	Gram -	+

Ket: (-) menunjukkan hasil negatif, (+) menunjukkan hasil positif

Dapat disimpulkan bahwa semua isolat bakteri (TP1, TP2, RA1, RA2, PJ1, KJ2, YOSO, TKG, dan SKD) memiliki karakteristik yang sama dengan patogen layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *R. solanacearum* (Gambar 4.3 dan Tabel 4.1) hingga dapat dilakukan pengujian selanjutnya.

4.1.3 Identifikasi genom *R. solanacearum* dengan primer *fliC*

Untuk keperluan identifikasi, maka dilakukan analisa keberadaan fragmen DNA penyandi gen flagelin (*fliC*) menggunakan primer *fliC* yang spesifik untuk mendeteksi *R. solanacearum* (Jung *et al.*, 2007).



Gambar 4.4 Elektroforesis hasil PCR isolat bakteri penyebab penyakit layu bakteri menggunakan primer *fliC* pada 1% gel agarose.

Hasil PCR menunjukkan bahwa, semua isolat memiliki fragmen *fliC* dengan ukuran 400 bp. Meskipun hasil elektroforesis menunjukkan pita DNA hasil amplifikasi tidak satu fragmen (Gambar 4.4), namun dapat membuktikan bahwa ke 9 isolat merupakan bakteri *R.solanacearum*. Menurut Schonfeld *et al* (2003), penggunaan primer *fliC* yaitu untuk mendeteksi adanya pita fragmen DNA *R. solanacearum* yang menyandikan gen *fliC* dengan ukuran 400 bp.

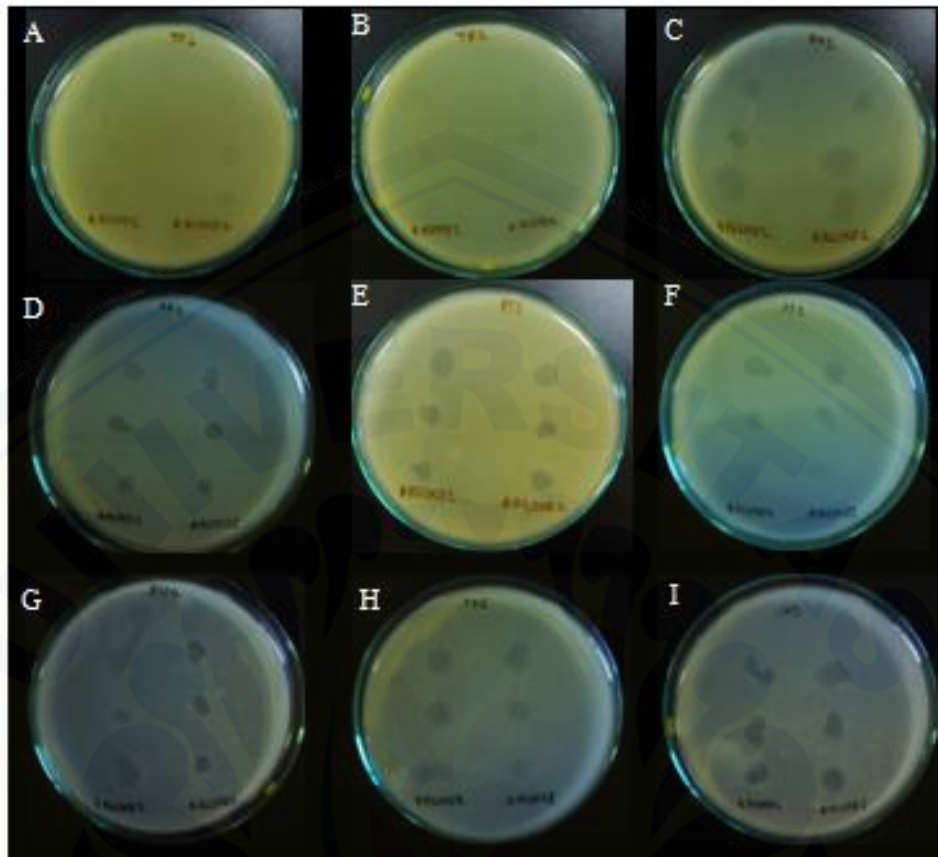
4.1.4 Isolasi dan karakteristik bakteriofag

Isolasi bakteriofag diambil dari tanah perakaran tanaman pisang sakit dari Kecamatan Sukodono dan keberadaannya ditunjukkan dengan adanya *plaque* (Carter *and* Saunders, 2007) dan dipurifikasi dengan metode *double layer* guna mendapatkan *single plaque*. Hasilnya didapatkan bakteriofag yang memiliki dua jenis ukuran *plaque* yang berbeda pada *spot test* yaitu isolat ϕ RSSKD 1 (*plaque* kecil) dan ϕ RSSKD 2 (*plaque* besar).

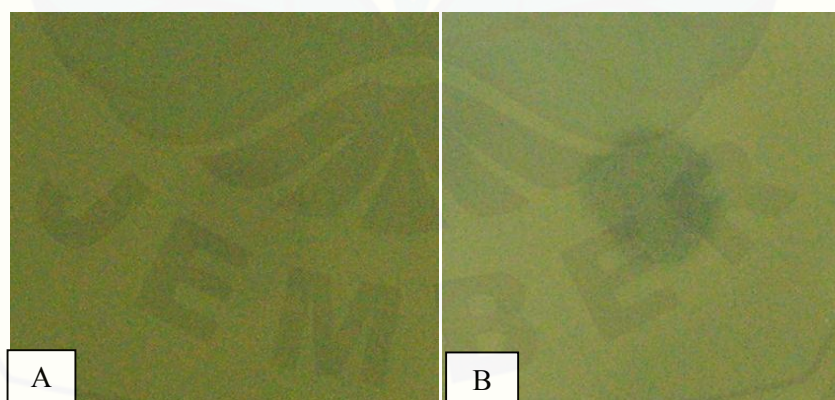
Tabel 4.2 Reaksi dua macam bakteriofag terhadap sembilan isolat *R. solanacearum*.

Isolat bakteri	Hasil	Kenampakan <i>plaque</i> dari dua jenis bakteriofag	
		ϕ RSSKD1	ϕ RSSKD2
TP1	+	Sangat keruh	Sangat keruh
TP2	+	Sangat keruh	Sangat keruh
RA1	+	Bening	Bening
RA2	+	Bening	Bening
PJ1	+	Bening	Bening
KJ2	+	Bening	Bening
YOSO	+	Bening	Bening
TKG	+	Bening	Bening
SKD	+	Bening	Bening

Pada uji infektifitas (virulensi) bakteriofag yang dilakukan pada sembilan isolat bakteri dengan dua jenis bakteriofag (ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2) menunjukkan bahwa kedua bakteriofag tersebut mampu menginfeksi semua isolat *R. solanacearum*, dibuktikan dengan munculnya *plaque* pada bakteri yang tumbuh pada cawan Petri, dan pada beberapa isolat bakteri memiliki tingkat kekeruhan *plaque* yang berbeda (Tabel 4.2, Gambar 4.5 dan 4.6).



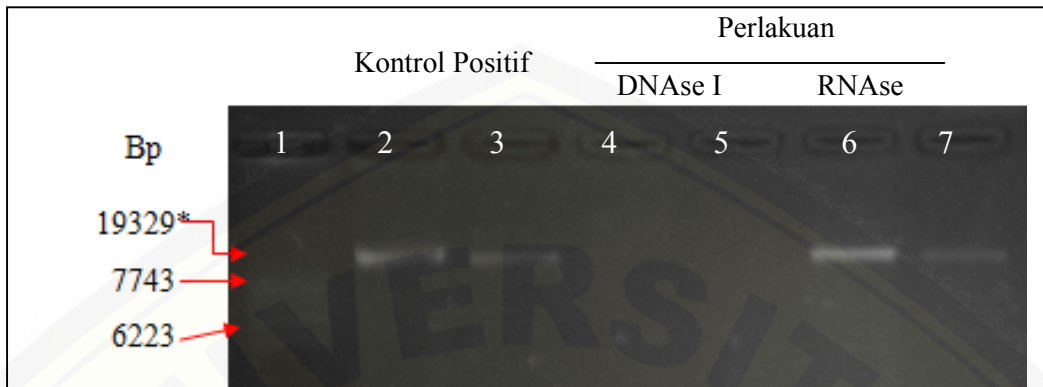
Gambar 4.5 Uji infektifitas ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2 pada beberapa isolat *R. solanacearum* dengan (A) isolat TP1, (B) isolat TP2, (C) isolat RA1, (D) isolat RA2, (E) isolat PJ1, (F) isolat KJ2, (G) isolat Yoso, (H) isolat TKG, (I) isolat SKD.



Gambar 4.6 Kenampakan jenis *plaque* yang berbeda dilihat dari tingkat kekeruhan (A) jenis *plaque* keruh, (B) jenis *plaque* bening.

Hasil juga menunjukkan bahwa ke dua bakteriofag (ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2) mampu menginfeksi semua isolat bakteri tanaman pisang yang diperoleh dari

tujuh kecamatan di Lumajang (Tabel 4.2 dan Gambar 4.5), dan dapat dilakukan uji asam nukleat terhadap dua jenis bakteriofag tersebut.



Gambar 4.7 Visualisasi elektroforesis asam nukleat bakteriofag menggunakan 1% gel agarose lane 1) marker, lane 2) sampel ϕ RSSKD1, lane 3) sampel ϕ RSSKD2, lane 4) sampel ϕ RSSKD1 DNase, lane 5) sampel ϕ RSSKD2 DNase, lane 6) sampel ϕ RSSKD1 RNase, lane 7) sampel ϕ RSSKD2 RNase.

Untuk mengetahui karakteristik dasar bakteriofag dilakukan uji asam nukleat pada bakteriofag. Salah satu karakteristik umum bakteriofag yang perlu diketahui adalah jenis asam nukleat selain bentuk partikelnya (Lucy dan Boezi, 1966). Hasil pengujian menunjukkan bahwa asam nukleat bakteriofag tidak tampak ketika di visualisasikan pada gel agarose jika diperlakukan dengan DNase, namun masih tetap tampak meskipun diperlakukan dengan RNase. Hal ini membuktikan bahwa asam nukleat bakteriofag tersebut adalah DNA (*Deoxyribonucleic acid*) (Gambar 4.7).

4.2 Pembahasan

Tanaman pisang di Kabupaten Lumajang yang menunjukkan gejala layu, daun tanaman menguning dan akhirnya mengering disebabkan oleh *R. solanacearum*. Gejala semakin jelas setelah batang (bonggol) dipotong terjadi pembusukan dibagian tengah (Nasir *et al.*, 2005). Pada media *triphenyl tetrazolium chloride* (TTC), bakteri ini memiliki morfologi koloni berwarna merah dengan tepi berwarna putih tipis dan mencirikan karakter bakteri *R. solanacearum* yang virulen (Buddenhagen, 1961; Baharuddin, 1994). Koloni

bakteri *R. solanacearum* memiliki bentuk dengan tepi tidak teratur dan fluidal, hal ini sesuai dengan Liestiany *et al.* (2012). dan bersifat Gram negatif dan hipersensitif positif (Nasrun *et al.*, 2007). Lebih lanjut, untuk memastikan apakah bakteri tersebut *R. solanacearum* diuji lagi menggunakan PCR dengan primer *fliC*. Schonfeld (2003) menguji strain-strain *R. solanacearum* menggunakan teknik PCR dengan primer *fliC*, dengan hasil bahwa 82 strain terdeteksi memiliki pita fragmen DNA berukuran 400 bp ketika diamplifikasi dengan PCR. Hal yang sama juga teramati ketika 9 isolat bakteri asal Kabupaten Lumajang juga diamplifikasi menggunakan primer PCR yang sama, sehingga dapat dipastikan bahwa isolat bakteri yang berasosiasi dengan pisang layu di Kabupaten Lumajang adalah *R. solanacearum*. Meskipun demikian hasil PCR kurang optimal ditandai jumlah pita DNA yang banyak memiliki tingkat keragaman yang bervariasi. Kondisi optimal pada proses PCR dalam penelitian dipengaruhi oleh komponen reaksi PCR (DNA, primer, dNTP, dan Mg^{2+}), spesifitas primer, dan jumlah siklus PCR (Ahmed, 2006).

Dua jenis bakteriofag yang diisolasi dengan bentuk *plaque* (diameter) tidak seragam yaitu *plaque* kecil (ϕ RSSKD1) dan *plaque* besar (ϕ RSSKD2). Ukuran *plaque* yang berbeda dapat disebabkan oleh kemampuan bakteriofag dalam melisis bakteri inang (Pratiwi dan Budiarti, 2010). Setiap bakteriofag memiliki kisaran inang yang berbeda-beda. Hal tersebut sesuai dengan Susianto *et al.* (2014) yang melaporkan bahwa partikel bakteriofag (ϕ GH1, ϕ GH2, dan ϕ GH3) memiliki kisaran inang yang berbeda terhadap isolat *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* yang di isolasi dari tempat yang berbeda (Sukorambi, Keramat, Botosari, dan Manggis). Pada uji infektifitas (virulensi) yang dilakukan pada semua isolat diketahui bahwa ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2 memiliki kisaran inang yang luas hal ini dibuktikan bahwa kedua jenis bakteriofag tersebut mampu menginfeksi semua isolat bakteri yang diperoleh dari beberapa kecamatan di Lumajang. Meskipun pada kasus isolat TP1 dan TP2 memiliki jenis *plaque* yang keruh (turbit), hal ini diduga karena jenis dan strain *R. solanacearum* serta bakteriofag yang mungkin berbeda. Dugaan ini seperti yang dijelaskan oleh Clokie (2011) bahwa jenis *plaque* yang berbeda dipengaruhi oleh siklus

bakteriofag, pada siklus litik bakteriofag bereplikasi dengan cara menyuntikkan asam nukleat dan mengambil alih metabolisme sel inang yang menyebabkan lisisnya sel bakteri, sedangkan pada siklus lisogenik sel inang tidak mengalami lisis hanya mengintegrasikan asam nukleat pada bakteri, sehingga bakteri tetap dapat beraktivitas. Kedua isolat bakteriofag yang diisolasi dari tanah perakaran pisang asal Sukodono adalah DNA karena asam nukleat tersebut hilang ketika diperlakukan dengan DNase namun tidak dengan RNase. DNase merupakan enzim yang berperan dalam proses degradasi DNA (Counis and Torriglia, 2006), oleh karena itu jika ada asam nukleat yang diperlakukan dengan DNase dan hilang setelah diperlakukan menunjukkan bahwa asam nukleat tersebut terdigesti oleh DNase yang juga menandakan bahwa asam nukleat tersebut adalah DNA.

5. KESIMPULAN

5.1 Kesimpulan

1. Semua isolat layu bakteri yang diambil dari 2 varietas tanaman pisang asal Kabupaten Lumajang secara visual dan karakteristik menandakan bahwa isolat tersebut adalah *Ralstonia solanacearum*, dan diperkuat dengan hasil identifikasi menggunakan PCR dengan primer *fliC* menunjukkan target teramplifikasi pada fragmen DNA 400 bp.
2. Pada tanaman pisang yang bergeja layu, didapatkan agen hayati yaitu bakteriofag yang terisolasi dari tanah perakaran.
3. Bakteriofag yang diisolasi memiliki dua jenis bakteriofag (ϕ RSSKD1 dan ϕ RSSKD2) yang mampu menginfeksi semua isolat *R. solanacearum* pada beberapa kecamatan di Lumajang dan memiliki asam nukleat berupa DNA (*deoxyribonucleic acid*).

DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H.S., Askora, A., Kawasaki, T., Fujie, M. and Yamada, T. 2012. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease* 96 (8):1204-1209.
- Ahmed, Z. 2006. Optimazation of PCR condition in vitro for maximum amplification of DNA from *Xanthomonas campestris* 13551. *Journal of Applied Sciences Researces* 2(3):112-122.
- Armon, R., and Kott, Y. 1993. A simple, rapid and sensitive presence/ absence detection test for bacteriophage in drinking water. *J. Appl. Bact* 74:490-496.
- Askora, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., and Yamada, T. 2009. Host recognition and integration of filamentous phage ϕ RSM in the phytopathogen, *Ralstonia solanacearum*. *Virology* 384:69-76.
- Baharuddin. 1994. *Patological, biochemical and serological characterization of the blood disease bacterium affecting banana and plantain (Musa spp.) in Indonesia*. Disertasi 129 hal. Cuvillier Verlag Gottingen.
- Buddenhagen, I. W. 1961. Bacterial wiltsof banana: history and know distribution. *Tropical Agric.* 38:107-121.
- Carter, B., John, and Saunders, V. A. 2007. *Virology principles and applications*. . England: John Wiley and Sons Ltd.
- Chen, Yun, Zhang W.Z., Liu Xin, Ma Z.H., Li Bo, Allen Caitilyn, and Guo J.H. 2010. A real time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacarum* in horticultural soil and plant tissues. *J. Microbiol. Biotechnol* 20(1):193-201.
- Clokie, M.R.J., Millard, A.D., Letarov, A.V., and Heaphy, S. 2011. Phages in nature. *Bacteriophage* 1(1): 31-45.
- Counis, M.F., and Torriglia, A. 2006. Acid DNases and their interest in apoptotic intermediates. HAL Author manuscripts. *Biochimie.* 88(12):1-18.
- Departemen Pertanian. 2005. *Luas serangan OPT utama tanaman pisang*. <http://www.deptan.go.id/ditlinhorti/>[22 April 2005].
- Dewi, M. K., Ratnasari, E., dan Trimulyono, G. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak daun majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu. *LenteraBio* 3 (1) : 51-57.

- Hagens, S., Loessner, and M.J. 2007. Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 76 (3):513-519.
- Handoyo, D., dan Rudiretna, A. 2001. Prinsip umum dan pelaksanaa polymerase chain reaction (PCR). *Unitas* 9(1):17-29.
- Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S., and Qadri, I. 2012. Bacteriophages and their implication on future biotechnology: a review. *Virology Journal* 9:9. [serial online]. <http://www.virologyj.com/content/9/1/9>. [16 April 2015].
- Hershey, A. D., Chase, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *The Journal of General Physiology* 36(1):39-56.
- Israhmadini, U. 2008. *Identifikasi dan karakterisasi bakteri laut penghasil selulose dengan metode 16S rRNA*. Jurusan Biologi FMIPA. Universitas Negeri Jakarta : Jakarta
- Jones, J.B., L.E. Jackson. B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte, and M.T. Momol. 2007. *Bacteriophages for plant disease Control*. Annual. Rev. Phytopathol 45:245-262.
- Jung, K.M., Lee, M.H., Shim, J.K., Seo, S.T., Shrestha, R., Cho, M.S., Hahn, J.H., and Park, D.S. 2007. PCR-based spesifik detection of *Ralstonia solanacearum* by amplification of cytochrome c1 signal peptide sequences. *J. Microbiol. Biotechnol* 17(11):1765-1771.
- Kakoma, K. 2009. *Isolation and characterisation of bacteriophages and their potential use for the control of bacterial infections in Poultry*. Faculty of Natural and Agricultural. Sciences Department of Microbial. Biochemical and Food Biotechnology. University of the Free State. Bloemfontein 9300. South Africa.
- Kantor Deputi Menegristek Bidang Pendayagunaan dan Pemasyarakatan Ilmu Pengetahuan dan Teknologi. 2000. *TTG budidaya pertanian*. <http://www.ristek.go.id>. [08 November 2013].
- Khasanah, U. 2009. *Pengaruh konsentrasi NAA dan kinetin terhadap multiplikasi tunas pisang (Musa paradisiaca L. cv. Raja Bulu) secara in vitro*. Skripsi. Surakarta : Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Sebelas Maret.
- Lembar Informasi Pertanian. 2003. *Cara pengendalian penyakit darah pada tanaman pisang di Sumatera Selatan*. Departemen Pertanian, BPTP Sumatera Selatan. Agdex :231/604.

- Liestiany, E., Fikri, E. N., Susilowati, dan D.H., Endang. 2012. Kemampuan *Pseudomonas* kelompok fluorescen dari Kabupaten Tabalong menekan pertumbuhan *Ralstonia solanacearum* secara *in vitro*. *Agripeat* 13 (1): 8-15.
- Lucy, F.L., dan Boezi J.A. 1966. Characterization of bacteriophage gh-1 for *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriophage* 96(6):1821-1827.
- Maghirang, R.G. 1993. Development of biovar specific DNA probes for *P.solanacearum*. ACIAR. *Unpublished report*.
- Merril, C.R., Scholl, D. and Adhya, S.L. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery* 2:489-497.
- Momol MT, Jones JB, Olson SM, Obradovic A, Balogh B, King P. 2002. *Integrated management of bacterial spot on tomato in Florida. Rep. PP110*, EDIS, Inst. Food Agric. Sci., Univ. Florida.
- Nasir, N., Jumjunidang, Riska. 2005. Distribusi penyakit layu fusarium dan layu bakteri *Ralstonia* pada lokasi sumber bibit dan sekolah lapang pengendalian hama terpadu pisang di Sumatera Barat. *J. Hort.* 15(3):215-222.
- Nasrun, Christanti, Arwiyanto, T., Mariska, I. 2007. Karakteristik fisiologis *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri nilam. *Jurnal Litri* 13(2):43-48.
- Nuronyah, T., Putra, S.R. 2012. Identifikasi spesies isolat bakteri S1 dengan metode analisa sekuen fragmen gen 16s rDNA. *Jurnal Teknik Pomits* 1(1):1-6.
- Ozawa, H., Tanaka, H., Ichinose, Y., Shiraishi, T., & Yamada, T. 2001. Bacteriophage P4282, a parasite of *Ralstonia solanacearum*, encodes a bacteriolytic protein important for lytic infection of its host. *Mol. Genet. Genom.* 265(1): 95-101.
- Prahardini P.E.R., Yuniarti, dan Krismawati. 2010. Karakterisasi varietas unggul pisang mas kirana dan agung semeru di Kabupaten Lumajang. *Bul. Plasma Nutfah* 16 (2):126-133.
- Pratiwi R.H., Budiarti S. 2010. *Karakterisasi fage litik dari limbah cair rumah tangga terhadap enteropathogenic Escherichia coli resisten antibiotik*. Seminar Nasional Biologi. Yogyakarta:Fakultas biologi. UGM.
- Rustam. 2007. Uji metode inokulasi dan kerapatan populasi Blood Disease Bacterium pada tanaman pisang. *J. Hort.* 17(4):387-392.

- Schonfeld J., Heuer H., Van Elsas J. D., and Smalla K., 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. *Appl. Environ Microbiol* 69(12): 7248–7256.
- Seal, S.E., L.A. Jackson, J.P.W. Young, and M.J. Daniels. 1993. Differentiation of *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, *Pseudomonas pickettii* and *blood disease bacterium* by partial 16S rRNA sequencing: Construction of oligonucleotide primers for sensitive detection by polymerase chain reaction. *J. General Microbiol.* 139(7):1587-1594.
- Supriadi. 1999. Karakterisasi kultur dan patogenitas isolat *Pseudomonas celebensis* penyebab penyakit darah pada tanaman pisang. *J. Hort.* 9(2):129-136.
- Supriadi. 2011. Penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*): dampak, bioekologi, dan peranan teknologi pengendaliannya. *Pengembangan Inovasi Pertanian* 4(4):279-293.
- Supriadi, E.R. Boa, dan S. J. Eden-Green. 1989. *Determinasi dan identifikasi bakteri pembuluh kayu cengkeh*. 13hlm. Prosiding Simposium Hasil Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri, Bogor, 25-27 Juli 1989.
- Suryadi, Y., dan Machmud, M. 2002. Kragaman genetik strain *Ralstonia solanacearum* berdasarkan karakteristik menggunakan teknik berbasis asam nukleat. *Buletin AgroBio* 5(2):59-66.
- Susianto, G., Farid, M.M., Dhany, N.R., and Addy, H.S. 2014. Host range for bacteriophages that infect bacterial blight patogen on soybean. *Procedia Environmental Sciences* 20 :760-766.
- Taghavi, M., A.C. Hayward, L.I. Sly, and M. Fegan. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *B. solanacearum*, *P. syzygii* and the blood disease bacterium of banana based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:10-15.
- Tanaka, H., Negishi, H., & Maeda, H. 1990. Control of tobacco bacterial wilt by an avirulent strain of *Pseudomonas solanacearum* M4S and its bacteriophage. *Annals. Phytopathological Society of Japan*, 56(2): 243-246.
- Tasteyre, A., Barc, M. C., Collignon, A., Boureau, H., and Karjalainen. 2001. Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun* 69(12):7937-7940.

Toyoda, H., Kakutani, K., Ikeda, S., Goto, S., Tanaka, H., & Ouchi, S. (1991). Characterization of deoxyribonucleic acid of virulent bacteriophage and its infectivity to host bacterium, *Pseudomonas solanacearum*. *J. Phytopathol.*, 131(1): 11-21.

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

Yuwono. 2005. *Biologi Molekuler*. Jakarta: Erlangga.

