



PENGARUH KOMBINASI BAKTERIOFAG DENGAN SENYAWA
PENGINDUKSI (HORMON AUKSIN DAN KITOSAN) TERHADAP
PENGENDALIAN PATOGEN LAYU BAKTERI PADA TANAMAN TOMAT
(*Solanum lycopersicum* L.)

SKRIPSI

Oleh
Angga Aditya Ramadhan
NIM. 131510501247

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017**



PENGARUH KOMBINASI BAKTERIOFAG DENGAN SENYAWA
PENGINDUKSI (HORMON AUKSIN DAN KITOSAN) TERHADAP
PENGENDALIAN PATOGEN LAYU BAKTERI PADA TANAMAN TOMAT
(*Solanum lycopersicum* L.)

SKRIPSI

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

Oleh

Angga Aditya Ramadhan
NIM. 131510501247

PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2017

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas segala karunia dan limpahan rahmat dalam penyelesaian karya ilmiah ini sehingga dapat terselesaikan dengan lancar.
2. Baginda Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umat manusia dari zaman jahiliah ke dalam zaman yang terang benderang akan akhlak dan ilmu.
3. Ayahanda Yonik Hartono, Ibunda Siti Munawaroh, beserta keempat adik saya yang selalu memberikan semangat serta doa tiada putus.
4. Dosen-dosen saya di Fakultas Pertanian, yang telah memberikan ilmu dan motivasi selama perjalanan studi saya.
5. Almamaterku tercinta Universitas Jember.

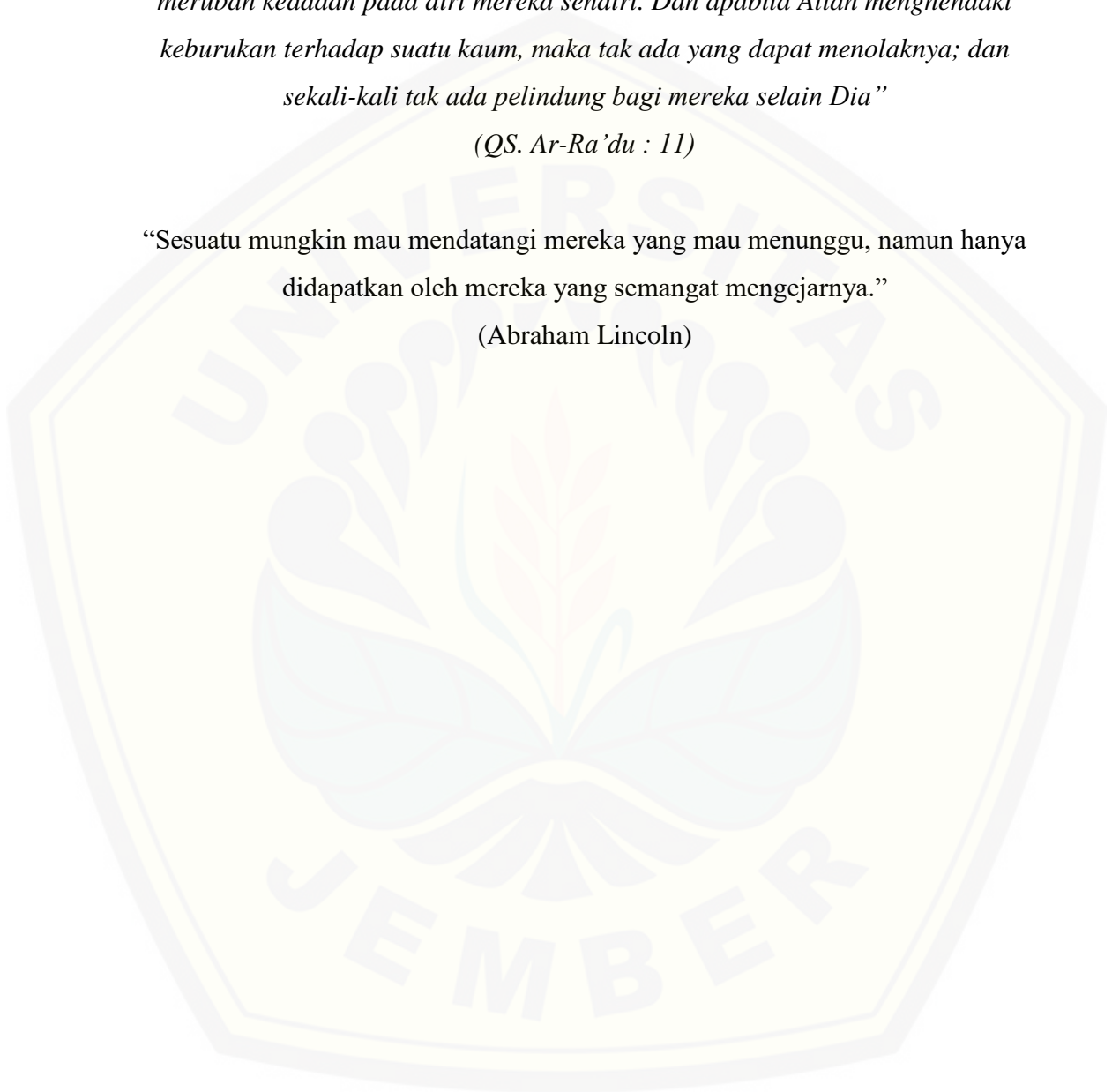
MOTTO

“Sesungguhnya Allah tidak merubah keadaan suatu kaum sehingga mereka merubah keadaan pada diri mereka sendiri. Dan apabila Allah menghendaki keburukan terhadap suatu kaum, maka tak ada yang dapat menolaknya; dan sekali-kali tak ada pelindung bagi mereka selain Dia”

(QS. Ar-Ra’du : 11)

“Sesuatu mungkin mau mendatangi mereka yang mau menunggu, namun hanya didapatkan oleh mereka yang semangat mengejarnya.”

(Abraham Lincoln)



PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Angga Aditya Ramadhan

NIM : 131510501247

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Kombinasi Bakteriofag dengan Senyawa Penginduksi (Hormon Auksin dan Kitosan) Terhadap Pengendalian Patogen Layu Bakteri pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)” adalah benar-benar hasil karya sendiri kecuali jika pengutipan substansi disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isi sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 21 Desember 2017
yang menyatakan,

Angga Aditya Ramadhan
NIM. 131510501247

SKRIPSI

PENGARUH KOMBINASI BAKTERIOFAG DENGAN SENYAWA
PENGINDUKSI (HORMON AUKSIN DAN KITOSAN) TERHADAP
PENGENDALIAN PATOGEN LAYU BAKTERI PADA TANAMAN TOMAT
(*Solanum lycopersicum* L.)

Oleh :

Angga Aditya Ramadhan
NIM. 131510501247

Pembimbing :

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, SP., MP. Ph.D.
NIP. 198011092005011001
Pembimbing Anggota : Nanang Tri Haryadi, SP., M.Sc.
NIP. 198105152005011003

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Pengaruh Kombinasi Bakteriofag dengan Senyawa Penginduksi (Hormon Auksin dan Kitosan) Terhadap Pengendalian Patogen Layu Bakteri pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.) ” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Kamis
Tanggal : 21 Desember 2017
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Utama,

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

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

Dosen Penguji I,

Dosen Penguji II,

Dr. Ir. Rachmi Masnilah, M.Si.
NIP. 196301021988022001

Prof. Dr. Ir. Suharto, M.Sc.
NIP. 196001221984031002

Mengesahkan

Dekan,

Ir. Sigit Soeparjono, MS., Ph.D.
NIP. 19600506 198702 1 001

RINGKASAN

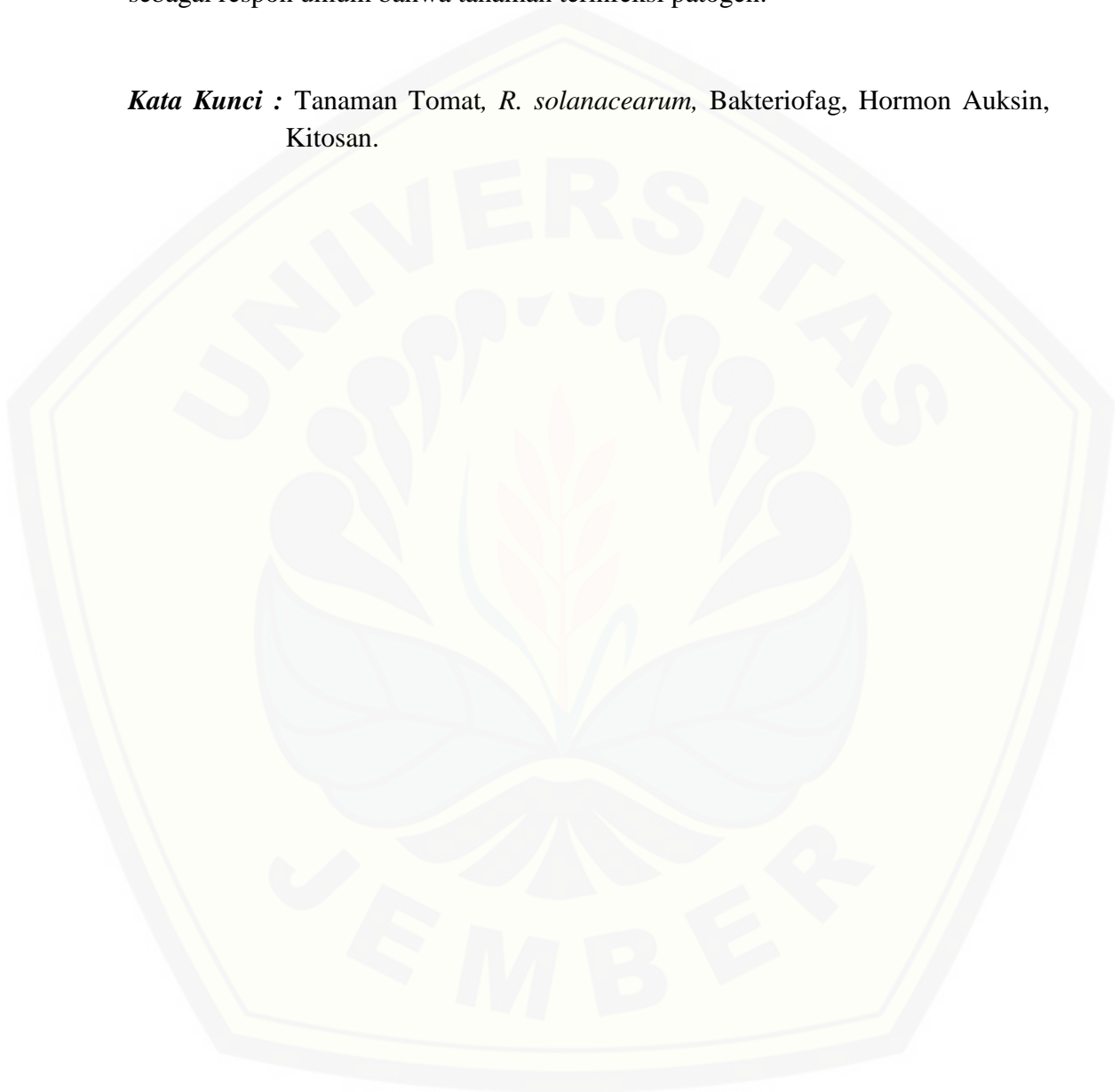
Pengaruh Kombinasi Bakteriofag dengan Senyawa Penginduksi (Hormon Auksin dan Kitosan) Terhadap Pengendalian Patogen Layu Bakteri pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.); Angga Aditya Ramadhan, 131510501247; 2017 : 30 halaman; Program Studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Tanam tomat merupakan salah satu komoditas hortikultura yang bernilai ekonomis tinggi. Salah satu faktor penghambat dalam budidaya tanaman tomat yaitu adanya serangan patogen *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri. *R. solanacearum* merupakan patogen penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman tomat yang memiliki kisaran inang cukup luas. Agen pengendali hayati yang dapat digunakan untuk mengendalikan layu bakteri tersebut salah satunya dengan memanfaatkan peran bakteriofag yang dapat dikombinasikan dengan senyawa penginduksi (Hormon Auksin dan Kitosan). Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui tentang pengaruh aplikasi kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi dalam pengendalian patogen layu bakteri pada tanaman tomat.

Isolat bakteri yang digunakan adalah *R. solanacearum* DT3 isolat virulen yang dibuktikan berdasarkan pada hasil klarifikasi isolat melalui karakter morfologi pada media CPGA yang mengandung TZC, uji reaksi hipersensitif pada daun tembakau serta berdasarkan pendekatan molekular dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer PhcA dan primer FliC. Agens hayati bakteriofag mampu diisolasi dengan ditunjukkan munculnya *plaque* pada pengujian dengan metode *plaque assay* yang kemudian diberi nama isolate ϕ A-DT3. Kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi hingga 7 hari setelah inkubasi memunculkan *plaque* pada uji dengan menggunakan metode *spot assay* menunjukkan bahwa bakteriofag mampu stabil dalam larutan kombinasi. Stabilitas kombinasi tersebut diketahui mampu mengendalikan infeksi bakteri *R. solanacearum* pada pengujian *in vivo*. Pengamatan senyawa ketahanan peroksidase hasil *in vivo* pada tanaman dengan aplikasi larutan kombinasi mengalami penurunan meskipun diinokulasikan dengan *R. solanacearum*. Lebih lanjut,

peningkatan aktivitas senyawa peroxidase memiliki hubungan terhadap peningkatan jumlah total fenol tanaman. Kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi diketahui tidak menginduksi respon ROS pada tomat yang muncul sebagai respon umum bahwa tanaman terinfeksi patogen.

Kata Kunci : Tanaman Tomat, *R. solanacearum*, Bakteriofag, Hormon Auksin, Kitosan.



SUMMARY

The Effect of Bacteriophage Combination with Inducted Compound (Auxin Hormones and Chitosan) to Control the Bakterial Wilt Disease on Tomato Plants (*Solanum lycopersicum* L.). Angga Aditya Ramadhan, 131510501247; 2017 : 30 Pages; Agrotechnology Department Agriculture Faculty Jember University.

Tomato plant is one of horticulture commodities with high economies value. One of the retarder factors in tomatoes cultivation is the attack of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* pathogens. *Ralstonia solanacearum* is pathogen that caused bacterial wilt disease in tomato plants which one have large host range. Biological control agents that can be used to control bacterial wilt disease is the harness of bacteriophage role which it can be combined with inducted compounds (Auxin hormones and Chitosan). This research conducted to study the effect of bacteriophage combination with inducted compound to control the bacteria wilt disease on tomato plants.

Bacterial isolate that used in this research is *Ralstonia solanacearum* strain DT3 virulent isolate that proven based on result of clarification test through morphology character in CPGA media that contain TZC, hypersensitive test reaction in tobacco leaf and based on molecular approach with Polymerase Chain Reaction (PCR) mode using PhcA and FliC primary. Biological Agents bacteriophage capable to isolate and it shown by appearing of plaque on test with plaque assay methods, then named it ϕ A-DT3 isolate. Combination of bacteriophage and inducted compounds until 7 days after incubation is shown by plaque on test using spot assay methods and the result shown that the bacteriophage could be stable in combination compounds. Stabilities of the combination is known that the combination can control the infection of *Ralstonia solanacearum* bacteria in in vivo test. Observation of peroxidase compound resistance of in vivo in plants by application of combined solution run into reduction although inoculated with *Ralstonia solanacearum*. Furthermore, enhancement activity of peroxidase compound has correlation to increase of total amount fenol in plant. Combination of bacteriophage and inducted compounds known that it is not inducing ROS response in Tomato plant that appear as a common response that mean plants was infected by pathogen.

Key words : Tomato plant, *Ralstonia solanacearum*, Bacteriophage, Auxin hormones, Chitosan.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Pengaruh Kombinasi Bakteriofag dengan Senyawa Penginduksi (Hormon Auksin dan Kitosan) Terhadap Pengendalian Patogen Layu Bakteri pada Tanaman Tomat (*Solanum lycopersicum* L.)”**. Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama, dan Nanang Tri Haryadi, SP., M.Sc selaku Dosen Pembimbing Anggota untuk waktu, bimbingan serta kesabaran selama penyusunan skripsi ini.
2. Dr. Ir. Rachmi Masnilah, M.Si serta Prof. Dr. Ir. Suharto, M.Sc. selaku Dosen Penguji yang telah meluangkan waktu dan perhatiannya untuk memberikan ilmu serta bimbingannya.
3. Ir. Hartadi, MS. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan pengarahan selama masa perkuliahan.
4. Yonik Hartono dan Siti Munawaroh selaku kedua orang tua yang selalu memberikan nasehat serta doanya selama ini.
5. Keluarga *Phage Team*, *Chorus Rusticarum*, IMAGRO dan Agroteknologi E13 yang telah memberikan dukungan serta pengalaman yang sangat berharga.
6. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang turut serta membantu dalam penyelesaian penulisan skripsi ini.

Karya Ilmiah (Skripsi) ini masih sangat jauh dari sempurna, oleh sebab itu segala bentuk kritikan dan saran untuk perbaikan karya ini sangat penulis harapkan.

Jember, 21 Desember 2017

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	ix
PRAKARTA	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Budidaya Tanaman Tomat.....	4
2.2 <i>R. solanacearum</i> sebagai Patogen pada Tanaman Tomat.....	4
2.3 Bakteriofag pada Bakteri <i>R. solanacearum</i>	5
2.4 Induksi Ketahanan Tanaman	6
2.5 Reaksi Oksidatif Spesies (ROS)	9
2.6 Hipotesis	10
BAB 3. METODE PENELITIAN	11
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	11
3.2 Persiapan Penelitian	11
3.2.1 Pembibitan	11

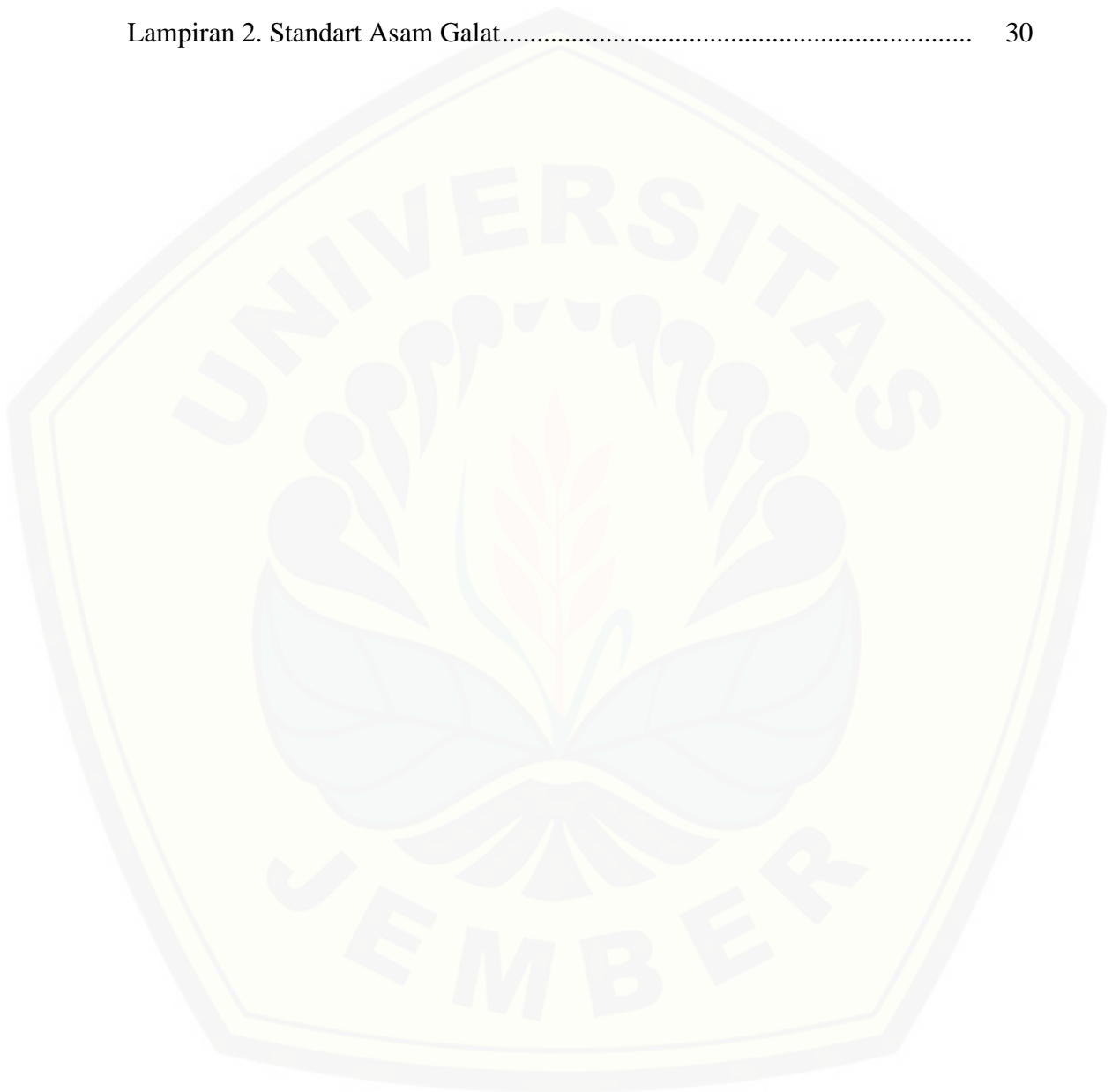
3.2.2 Penanaman dan Perawatan Tanaman.....	11
3.2.3 Peremajaan dan Perbanyakkan Bakteri <i>R. solanacearum</i> ...	11
3.2.2 Persipan Bahan Penginduksi.....	12
3.3 Pelaksanaan Riset	13
3.3.1 Rancangan Percobaan.....	13
3.3.2 Prosedur Penelitian	13
3.2.2 Variabel Pengamatan	16
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	17
4.1 Hasil.....	17
4.1.1 Klarifikasi Isolat Bakteri Patogen dan Bakteriofag.....	17
4.1.2 Uji Kelarutan Kitosan dan Stabilitas Bakteriofag dalam Larutan Kombinasi.....	18
4.1.3 Uji Efikasi Kombinasi Bakteriofag dan Senyawa Penginduksi secara <i>Invivo</i>	20
4.2 Pembahasan	22
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	26
5.1 Kesimpulan	26
5.2 Saran	26
DAFTAR PUSTAKA	27
LAMPIRAN	31

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Bakteriofag ϕ RP15 pada Bakteri <i>R.solanacearum</i>	6
Gambar 2.2 Struktur Senyawa 3-indole butyric acid	8
Gambar 2.3 Struktur Formula dari Kitin dan Kitosan	8
Gambar 2.4 Tempat Produski ROS pada Tanaman	9
Gambar 4.1.1 Klarifikasi Isolat Bakteri DT3.....	17
Gambar 4.1.2 Purifikasi Bakteriofag Hasil Isolasi dengan Metode <i>Plaque Assay</i> (A) dan <i>Plaque Tunggal</i> ϕ A-DT3 (B).....	18
Gambar 4.1.3 Uji Kelarutan Kitosan dalam Asam Asetan 1%	19
Gambar 4.1.4 Uji Stabilitas Bakteriofag dalam Larutan Kombinasi	20
Gambar 4.1.5 Hasil pengujian Invitro pada 3 hari setelah Inokulasi.....	22
Gambar 4.1.6 Rata-Rata Aktivitas Senyawa Peroxidase pada Tanaman disetiap Perlakuan pada Uji Invivo	21
Gambar 4.1.7 Total Fenol pada Tanaman disetiap Perlakuan	22

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Pengujian Kerapatan Bakteriofag hasil Isolasi.....	30
Lampiran 2. Standart Asam Galat.....	30



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Kementerian Pertanian (2014) produksi tanaman tomat di Indonesia sejak tahun 1990 – 2013 mengalami fluktuatif produksi namun cenderung meningkat. Secara umum produksi tomat di dalam negeri masih tergolong rendah yaitu sekitar 6,3 ton/ha jika dibandingkan dengan Negara-negara tetangga seperti Taiwan 21 ton/ha, Saudi Arabia 13,4 ton/ha dan India 9,5 ton/ha. Kebutuhan pasar akan buah tomat terus meningkat hal ini tidak lepas dari peranan tomat sebagai salah satu komoditas hortikultura yang sangat penting utamanya untuk bahan pangan (Kusuma dan Mimik, 2015). Selama masa pertumbuhannya tanaman tomat yang termasuk dalam famili *Solanaceae* ini banyak mendapatkan gangguan patogen salah satunya adanya serangan patogen *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri (Saputra dkk., 2015).

Menurut Ahmed *et al.* (2013) *R. solanacearum* merupakan patogen penyebab penyakit layu bakteri sebelumnya disebut *Pseudomonas solanacearum* termasuk dalam patogen tular tanah yang memiliki kisaran inang cukup luas dimana dapat menyerang lebih dari 450 spesies tanaman dari 54 famili tanaman (Doolotkeldieva and Saykal, 2016). Berbagai cara dapat dilakukan untuk mendeteksi dan mengidentifikasi keberadaan patogen *R. solanacearum* salah satunya menggunakan metode pengujian berbasis asam nukleat. Pengujian berbasis asam nukleat yang dapat digunakan dalam mendeteksi patogen tersebut dapat menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mengandalkan primer spesifik yang ditargetkan pada *sequence* patogen (Rahmawati, 2016). Beberapa primer telah dikembangkan untuk mendeteksi strain-strain penyebab layu bakteri seperti menggunakan primer PhcA dan primer FliC melalui metode PCR terhadap patogen *R. solanacearum*. Munculnya bakteri resistensi dan keinginan untuk mengurangi penggunaan produk kimia dalam pengendalian patogen tanaman dibutuhkan pengembangan agen pengendali hayati salah satunya menggunakan bakteriofag yang secara umum dapat membunuh bakteri dengan sifat spesifik target (Frampton *et al.*, 2012).

Bakteriofag yang termasuk dalam kingdom virus serta memiliki kemampuan dapat menginfeksi bakteri tertentu secara spesifik diketahui hanya terdiri atas mantel protein dan asam nukleat yang dapat berupa DNA atau RNA. Menurut Addy *et al.* (2016) menunjukkan bahwa bakteriofag yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* tidak dapat menginfeksi bakteri *Xanthomonas campestris*, sehingga kespesifikan bakteriofag tersebut berpotensi sebagai agen hayati dalam mengendalikan patogen tanaman khususnya bakteri. Pengendalian biologis memanfaatkan agen pengendali hayati yang melibatkan bakteriofag menawarkan alternatif ramah lingkungan serta dapat di kombinasikan dengan senyawa penginduksi seperti hormon auksin dan kitosan.

Menurut Kumar *et al.* (2014) hormon tanaman telah banyak dipelajari secara ekstensif dimana hormon berperan dalam regulasi berbagai aspek dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Auksin merupakan salah satu hormon yang pada dasarnya sudah tersedia secara alami pada tumbuhan, namun pemberian secara eksogenus pada tanaman dapat meningkatkan kemampuan berakar, mempercepat proses pertumbuhan akar, meningkatkan jumlah dan kualitas akar (Patma dkk, 2013). Senyawa kitosan sebagai salah satu senyawa penginduksi dilaporkan berfungsi untuk merangsang sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi pathogen. Banyak penelitian dilakukan pada sifat antimikroba dari kitosan dan ditemukan bahwasanya pelapisan kitosan yang dilarutkan dalam asam asetat memiliki efek penghambatan pada golongan bakteri gram negatif (Caballero *et al.*, 2005). Kondisi tersebut mendorong dilakukannya penelitian lanjut terkait kombinasi pemanfaatan bakteriofag dengan senyawa penginduksi terhadap pengendalian penyakit layu bakteri *R. solanacearum* pada tanaman tomat.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah isolat bakteri yang digunakan merupakan bakteri patogen *R. solanacearum*?
2. Bagaimana hasil isolasi bakteriofag dan stabilitas bakteriofag dalam kombinasi senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan)?

3. Apakah kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) mampu mengendalikan bakteri *R. solanacearum* pada tanaman tomat?
4. Bagaimana pengaruh kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) terhadap respon kimiawi tanaman terhadap infeksi *R. solanacearum* DT3?

1.3 Tujuan

1. Untuk mengetahui isolat bakteri yang digunakan merupakan bakteri *R. solanacearum* penyebab layu bakteri pada tanaman tomat.
2. Untuk mengetahui hasil isolasi bakteriofag dan stabilitas bakteriofag dalam kombinasi senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan).
3. Untuk mengetahui kemampuan kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) terhadap pengendalian bakteri *R. solanacearum* pada tanaman tomat.
4. Untuk mengetahui pengaruh kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) terhadap respon kimiawi tanaman terhadap infeksi *R. solanacearum*.

1.4 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini yaitu dapat memberikan hasil kombinasi agens pengendali hayati memanfaatkan peran bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) dalam mengendalikan patogen layu bakteri pada tanaman tomat.

BAB 2 TINJAUAN PUSATAKA

2.1 Budidaya Tanaman Tomat

Tanaman tomat termasuk tanaman dari family *Solanaceae* dari marga (genus) *Lycopersicum* yang banyak dibudidayakan oleh petani sebagai tanaman komersil. Iklim merupakan salah satu faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap budidaya tanaman tomat. Beberapa faktor iklim tersebut diantaranya cahaya matahari, suhu, maupun curah hujan. Tanaman tomat termasuk kedalam kelompok tanaman berhari netral yang memerlukan penyinaran matahari minimal selama delapan jam per hari. Selama pertumbuhannya tanaman tomat menghendaki suhu udara siang hari 24°C. Kisaran suhu udara yang ideal dan berpengaruh terhadap perkembangan buah tomat adalah suhu 24°C - 28°C. Selain itu curah hujan yang ideal selama pertumbuhan tanaman tomat berkisar antara 750-1.250 mm per tahun (Pitojo, 2005).

Keadaan tanah merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi secara langsung perkembangan tanaman tomat selain kondisi iklim. Tanaman tomat tumbuh optimal mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi yang mencapai ketinggian 1250 m dpl dan tumbuh optimal di dataran tinggi >750 mdpl (Kusuma dan Mimik, 2015). Pada hakekatnya tanaman tomat sesuai dengan kondisi tanah yang gembur, berdrainase dan beraerasi baik serta mengandung banyak humus. Kondisi pH tanah optimal bagi tanaman tomat diantara 6,0-7,0. Budidaya tanaman tomat dalam pot dapat dilakukan dengan menggunakan media top soil dan kompos dengan perbandingan 2 :1 (Abidin dkk, 2014).

2.2 *R. solanacearum* sebagai Patogen pada Tanaman Tomat

Ralstonia solanacearum merupakan patogen tular tanah penyebab penyakit layu bakteri yang bersifat gram-negatif, berbentuk batang dan diketahui mampu menyerang kurang lebih 200 famili tanaman *solanaceae*. Ras 1 bakteri *R. solanacearum* yang dapat menyerang tanaman tomat maupun tembakau, memiliki kisaran inang yang sangat luas dan endemik di daerah tropis, subtropik dan hangat dengan suhu optimum 35°C (Shabhaz *et al.*, 2015). Bakteri *R. solanacearum*

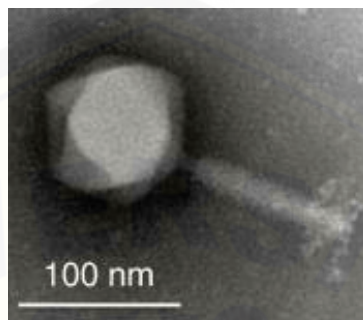
biasanya menyerang pada bagian akar tanaman melalui luka yang disebabkan oleh nematoda atau melalui lubang alami. Bakteri *R. solanacearum* tersebut kemudian berkoloni diruang antar sel seperti pada bagian korteks dan pembuluh parenkim dan akhirnya memasuki jaringan xylem hingga tersebar sampai pada bagian batang dan daun tanaman (Ahmed *et al.*, 2013). Menurut Addy *et al.* (2012) *R. solanacearum* dapat tumbuh pada media agar CPG (*Cassamino Acid Pepton Glucose*) yang mengandung 0,1% cassamino acid, 1% pepton, dan 0,5% glukosa dan diinkubasi selama 24-48 jam pada 28°C. Sebuah koloni tunggal *R. solanacearum* yang virulen menunjukkan koloni berwarna merah muda atau merah berpendar dengan karakteristik bagian tengahnya berwarna merah dengan bagian sampingnya berwarna putih pada media 0,005 % TZC (Tetrazolium Chloride) (Ahmed *et al.*, 2013)

Menurut Suryadi dkk (2008) identifikasi patogen layu bakteri secara konvensional biasanya meliputi kegiatan isolasi dan pemurnian patogen diikuti uji reaksi fisiologi dan biokimia serta uji patogenesis pada tanaman inang. Akhir akhir ini banyak dikembangkan teknik bersifat biologi molekuler untuk mendeteksi keberadaan agen penyebab layu bakteri seperti *R. solanacearum* menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Keberhasilan dalam identifikasi menggunakan metode PCR bergantung pada DNA sampel, enzim Taq polymerase, kondisi siklus PCR serta primer yang digunakan. Pita DNA dengan ukuran 400 bp pada karakterisasi patogen layu bakteri yang diamplifikasi dengan primer *FliC* menunjukkan bakteri *R. solanacearum* dimana primer tersebut dirancang spesifik untuk memberikan produk tunggal dengan panjang 400 bp setelah di amplifikasi dengan metode PCR (Jung *et al.*, 2007)

2.3 Bakteriofag pada Bakteri *R. solanacearum*

Bakteriofag pada bakteri *R. solanacearum* saat ini sudah banyak dilaporkan dan dapat dikelompokkan menjadi enam jenis bakteriofag diantaranya ϕ RSS phages, ϕ RSM phages, ϕ RSB phages, ϕ RSA phages, ϕ RSL phages, and ϕ RSC phages yang memiliki karakteristik dan klasifikasi yang berbeda (Yamada, 2012). Berdasarkan beberapa hasil photomicrographs ukuran rata-rata bakteriofag

panjangnya ± 100 nm dengan lebar 6-9 nm (Murugaiyan *et al.*, 2010). Bakteriofag termasuk dalam kingdom virus yang dapat menginfeksi bakteri tertentu secara spesifik. Berdasarkan penelitian Addy *et al.* (2012) bakteriofag yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* tidak dapat menginfeksi bakteri *X. campestris*.



Gambar 2.1 Bakteriofag ϕ RP15 pada bakteri *R. solanacearum* (Mihara *et al.*, 2016).

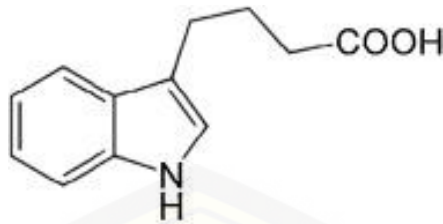
Pemanfaatan bakteriofag sebagai agens pengendalian hayati dan perlindungan tanaman saat ini berkembang dengan cepat serta memiliki potensi besar untuk menggantikan penggunaan bahan kimia dalam mengendalikan patogen. Bakteriofag ϕ RSM3 yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* digunakan sebagai agen pengendali hayati telah diketahui mampu mengendalikan penyakit layu bakteri pada tanaman tomat. Hal tersebut ditunjukkan dengan aplikasi ϕ RSM3 pada tanaman tomat terinfeksi menunjukkan tidak adanya gejala tanaman menjadi layu. Dosis efektif untuk penjegahan serangan layu bakteri yang disebabkan oleh *R. solanacearum* pada tomat sekitar 10^5 PFU/ml (Addy *et al.*, 2012). Bakteriofag dalam menginfeksi inangnya terbagi atas dua siklus hidup yaitu siklus litik dan siklus lisogenik sebagai usaha dalam memperbanyak diri (Hanumantappa *et al.*, 2013). Infeksi bakteriofag terhadap bakteri target biasanya menghasilkan replikasi partikel bakteriofag dimana diikuti oleh lisisnya sel bakteri sehingga partikel baru dari bakteriofag dapat keluar sel dan menginfeksi bakteri lain secara spesifik (Kalpage and Costa, 2014).

2.4 Induksi Ketahanan Tanaman

Induksi ketahanan tanaman merupakan suatu proses stimulasi resistensi tanaman inang terhadap serangan patogen tanpa introduksi gen-gen baru. Induksi

ketahanan tanaman menyebabkan kondisi fisiologis yang mengatur sistem ketahanan menjadi aktif atau menstimulasi mekanisme resistensi alami yang dimiliki oleh tanaman inang dengan pengaplikasian bahan penginduksi eksternal (Hoerussalam dkk, 2013). Selanjutnya menurut Gusnawati dkk (2014) ada dua bentuk ketahanan terinduksi yang umum diantaranya *Systemic Acquired Resistance* (SAR) yang dicirikan dengan terjadinya akumulasi senyawa ketahanan tanaman seperti senyawa fenol, peroksidase, asam salisilat, asam jasmonik dan senyawa lainnya yang menghasilkan *related-protein* (PR-protein) dalam tanaman (Mahadiptha dkk, 2017). Sedangkan ketahanan terinduksi berikutnya yaitu *Induced Systemic Resistance* (ISR) sebagai repon pertahanan tanaman melalui mekanisme perubahan fisiologis seperti modifikasi struktural dinding sel dan reaksi biokimia pada tanaman inang akibat adanya aplikasi agen biotik non-patogenik seperti *Rizobakteria*. Bahan penginduksi yang dimaksud pada penelitian ini yaitu pengaplikasian formulasi agens hayati bakteriofag dengan senyawa penginduksi hormon auksin dan kitosan.

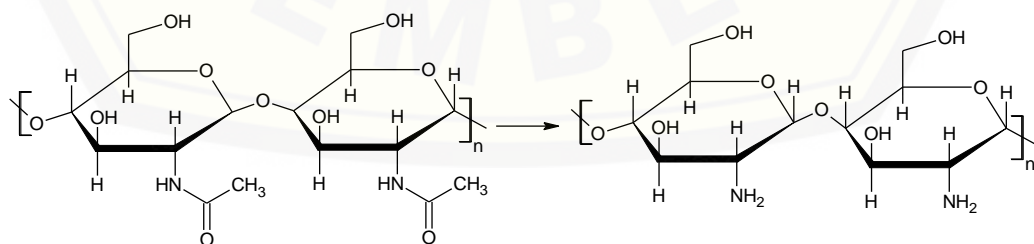
Menurut Kumar *et al.* (2014) hormon tanaman telah banyak dipelajari secara ekstensif dimana hormon berperan dalam regulasi berbagai aspek dalam pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Proses pembelahan sel, pemanjangan sel dan diferensiasi sel diketahui terdapat keterlibatan dari hormon dalam mengatur proses tersebut. Auksin merupakan kelompok senyawa hormon tanaman termasuk IBA (*Indole Butyric acid*) yang berperan dalam beberapa aspek perkembangan tanaman seperti dominasi apikal, pembentukan akar lateral, dan perkembangan rambut akar (Denance *et al.*, 2013). Penelitian beberapa ahli menjelaskan bahwasanya hormon auksin secara langsung maupun tidak langsung mempunyai peran terhadap respon regulasi resistensi tanaman terhadap serangan patogen. IBA merupakan golongan hormon auksin yang diaplikasikan pada tanaman dimana umumnya dengan konsentrasi hormon auksin mencapai 1,01 – 10 mg/l air, namun apabila pengaplikasian hormon auksin diberikan melebihi kadar optimum yang dibutuhkan oleh tanaman maka dapat menghambat pertumbuhan tanaman (Munarti dan sunarti, 2014).



Gambar 2.2 Struktur senyawa 3-Indole butyric acid (Sheikhian and Bina, 2016)

Kitosan merupakan derajat deasetilasi kitin yang mencapai sekitar 50% dalam larutan asam. Kitosan dengan struktur kimia β -1, 4-glucosamine yang terdiri dari unit berulang monomer dari gula amino, glukosamin dan N-asetil-D-glucosamin (Bittelli *et al.*, 2006) berpotensi sebagai senyawa pengendali *R. solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman tomat (Borines *et al.*, 2015). Aplikasi kitosan dapat dilakukan dengan memurnikan sampel lalu dilarutkan dalam asam asetat dan kemudian disharing menggunakan membran berpori dengan diameter 0,45 mm. Kitosan dilaporkan berfungsi untuk merangsang sistem ketahanan tanaman terhadap infeksi pathogen (Boonreung and Suchada, 2013).

Kitin merupakan senyawa polisakarida alami yang keberadaannya banyak ditemukan kedua setelah selulosa. Kitin berpotensi sebagai senyawa pengendali patogen dalam namun konsentrasi yang rendah diperlukakannya penambahan konsentrasi melalui aplikasi kitosan. Kitosan dengan konsentrasi 300 ppm yang dilarutkan dalam 1% asam asetat menghasilkan zona hambat yang jelas dalam uji aplikasi in vitro terhadap bakteri *R. solanacearum* (Borines *et al.*, 2015).



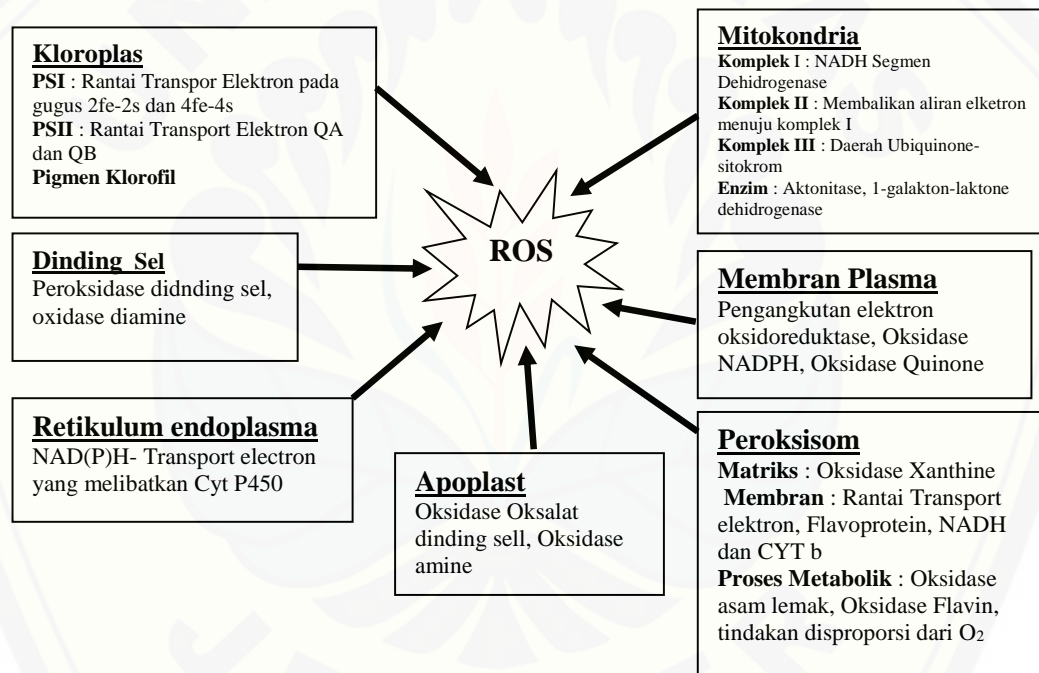
Chitin

Chitosan

Gambar 2.3 Struktur formula dari kitin dan kitosan (Dennis *et al.*, 2016)

2.5 Reactive Oxygen Species (ROS)

Reaksi oksidatif spesies merupakan kelompok radikal bebas, reaktif molekuler dan ion yang berasal dari O_2 . Diperkirakan sekitar 1% O_2 yang digunakan oleh tanaman dapat dialihkan untuk memproduksi ROS yang terjadi pada bagian subselular. Selama proses metabolisme sel tanaman menghasilkan reaksi oksidatif spesies baik termasuk radikal superoksida (O_2^-), hydrogen peroksida (H_2O_2), radikal hidroksil (OH) dan oksida nitral (NO). Dalam kondisi cekaman baik abiotik maupun biotik tanaman mampu menghasilkan reaksi oksidatif spesies yang terutama terdiri dari H_2O_2 . Produksi ROS merupakan salah satu peristiwa awal yang terjadi ketika adanya serangan patogen (Brien *et al.*, 2012).



Gambar 2.4 Tempat produksi ROS pada tanaman (Bastas, 2013)

Tanaman pada umumnya menghasilkan ROS diakibatkan adanya konfirmasi elektron ke O_2 dari kegiatan transport elektron dari kloroplas, mitokondria maupun membran plasma atau sebagai produk sampingan dari jalur metabolik selular tanaman. Cekaman lingkungan seperti cekaman kekeringan, salinitas, keracunan logam dan radiasi UV-B serta serangan patogen yang berdampak pada terganggunya metabolik selular tanaman. ROS disinyalir memainkan peran ganda dimana dapat berlaku sebagai reaksi yang dapat merusak biomolekul sel pada

konsentrasi tinggi (Sharma *et al.*, 2012) dan dapat berlaku sebagai mediator beberapa respon tanaman akibat cekaman dalam konsentrasi rendah. ROS diproduksi di beberapa tempat (Gambar 2.5.1) pada tanaman seperti pada mitokondria, kloroplas, membrane plasma, peroksisom, retikulum endoplasma dan dinding sel (Bastas, 2013).

Menurut Torres (2006) berapa enzim telah terlibat dalam produksi ROS dalam mengenali adanya serangan patogen pada tanaman. ROS aktif sebagai pertahanan pertama bagi tanaman dalam mencegah infeksi patogen menyebar ke arah yang lebih luas. Respon ketahanan tanaman berhubungan dengan diproduksinya ROS dan dapat membunuh patogen secara langsung dengan mengaktifkan reaksi hipersensitif (HR) ataupun berkontribusi dalam memperkuat dinding sel. Oksigen (O_2) dapat berubah bentuk menjadi ion superoksida dan hidrogen peroksida, tahapan selanjutnya akan menjadi gugus fenol (OH). Avirulen dari patogen berhasil diakui terjadi melalui tindakan resistensi tanaman yang dibentuk dari sistem kekebalan tubuh tanaman (Bastas, 2013).

2.6 Hipotesis

Aplikasi kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) dapat mengendalikan tanaman tomat dari serangan bakteri *R. solanacearum*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2017 sampai dengan selesai di Fakultas Pertanian, Universitas Jember dan Laboratorium Divisi Biologi Molekul dan Bioteknologi CDAST (*Center for Development of Advanced Sciences and Technology*) Universitas Jember.

3.2 Persiapan Penelitian

3.2.1 Pembibitan

Benih tomat yang digunakan pada penelitian yaitu benih dengan varietas *Chung*. Persiapan benih dilakukan dengan sterilisasi benih tomat dengan menggunakan alkohol dan NaClO. Benih dimasukkan pada *beaker glass* kemudian disemprot alkohol 70 % sebanyak 3 kali kemudian dicuci menggunakan aquadest sebanyak 3 kali. Proses berikutnya yaitu merendam benih menggunakan NaClO (5,25%) selama 5 menit lalu dibilas kembali menggunakan aquadest sebanyak 3 kali. Benih tanaman tomat disemaikan pada media tanam tanah dan kompos dengan komposisi 2:1 (Abidin dkk, 2014).

3.2.2 Penanaman dan Perawatan Tanaman

Penanaman dilakukan saat bibit berumur 14 hari dipindahkan dalam pot kecil dengan media yang sama yaitu media tanam tanah dan kompos dengan komposisi 2 : 1. Perawatan dilakukan dengan melakukan penyiraman setiap hari dan melakukan pemupukan unsur makro pada tanaman tomat terdiri dari pupuk Urea 15 g/tanaman, pupuk SP-36 27 g/tanaman dan pupuk KCL 25 g/ tanaman (Cahyono, 2008). Dosis tersebut bergantung pada kesuburan tanah sebagai media tumbuh tanaman.

3.2.3 Peremajaan dan Perbanyak Bakteri *R. solanacearum*

Isolat bakteri *R. solanacearum* diremajaan dengan mengambil isolat bakteri koleksi menggunakan jarum ose untuk digoreskan pada media padat CPG

(*Cassamino Acid Pepton Glucose*) yang mengandung 0,1% cassamino acid, 1% pepton, dan 0,5% glukosa dan diinkubasi selama 24-48 jam pada 28°C (Addy *et al.*, 2012). Perbanyakan bakteri dilakukan dengan menumbuhkan *R. solanacearum* dalam tabung reaksi yang berisikan media cair CPG dan diinkubasi selama 24-48 jam hingga mencapai kerapatan optik pada panjang gelombang 600 nanometer (*Optical Density/OD₆₀₀*) = 1.

3.2.4 Persiapan Bahan Kombinasi

Kitosan (Sigma-Aldrich) dilarutkan sebanyak 0,015 g dalam 50 ml larutan asam asetat 1% (300 ppm) dalam *beaker glass* 100 ml. Larutan asam asetat dilakukan perlakuan konsentrasi pH di mulai dari perlakuan pH 3 hingga pH 7. Larutan kitosan di *magnetic stirrer* pada suhu 40°C selama 60 menit (Trisnawati dkk, 2013). Pengujian kelarutan kitosan dalam pelarut asam asetat 1% dilakukan dengan menggunakan teknik *spot assay*. *Spot assay* dilakukan dengan mengambil suspensi bakteri *R. solanacearum* sebanyak 350 µl dengan usia kultur 24 jam, kemudian ditambahkan pada *Top Agar* 0,3% yang masih hangat (Sekitar suhu 50°C) lalu dituangkan pada permukaan media CPG dalam cawan Petri (*Metode double layer*) dan ditunggu sampai media padat. Sebanyak 5 µl larutan kitosan dengan perlakuan pH pelarut asam asetat dispotkan pada permukaan media CPG dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Kelarutan kitosan dalam pelarut asam asetat diamati dengan terbentuknya *plaque*.

Larutan stock IBA dengan konsentrasi 100 mg/L dibuat dengan cara menimbang sebanyak 100 mg bubuk murni IBA dan dimasukkan dalam tabung erlemeyer 1000 ml. Bubuk murni IBA dilarutkan dengan menggunakan 5 ml KOH 1 N yang diteteskan sedikit demi sedikit dengan pipet tetes secara perlahan hingga bubuk benar benar larut. IBA yang telah larut ditambahkan dengan 1000 ml akuadest dan digojok hingga homogen lalu disesuaikan pH hingga mencapai pH 7,5 sampai 7,8 (Gayakvad *et al.*, 2014) . Setelah homogen larutan IBA dapat dilakukan pengenceran hingga konsentrasi 5 ppm yang akan digunakan pada pengujian selanjutnya (Cato *et al.*, 2013).

3.3 Pelaksanaan Riset

3.3.1 Rancangan Percobaan

Pengujian kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi secara *invivo* pada tanaman tomat dilakukan dengan menggunakan 10 perlakuan dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali, sehingga jumlah keseluruhan percobaan terdiri dari 30 percobaan. Sebagai ringkasan desain pengujian dengan keterangan TNT (Tanaman Tomat), BRS (Bakteri *R. solanacearum*), KITO (Kitosan), IBA (Hormon Auksin) dan ϕ (Bakteriofag) disajikan sebagai berikut :

1. TNT + BRS (Kontrol Positif)	6. TNT + BRS + IBA (H+1)
2. TNT + Air (Kontrol Negatif)	7. TNT + BRS + ϕ
3. TNT + BRS + KITO	8. TNT + BRS + ϕ (H+1)
4. TNT + BRS + KITO (H+1)	9. TNT + BRS + KITO + IBA + ϕ
5. TNT + BRS + IBA	10. TNT + BRS + KITO + IBA + ϕ (H+1)

3.3.2 Prosedur Penelitian

1. Klarifikasi Bakteri patogen sebagai *R. solanacearum* dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Metode PCR yang digunakan pada penelitian menggunakan koloni tunggal yang diambil dari media selektif tanpa melakukan ekstraksi DNA. Koloni tunggal bakteri diambil dengan ujung pipet steril dan ditambahkan langsung ke dalam campuran PCR sebagai cetakan untuk amplifikasi DNA (Umesha and Chandan, 2012). Volume total yang digunakan dalam satu kali amplifikasi sebanyak 10 μ l yang terdiri dari master mix 5 μ l, primer forward 1 μ l, primer reverse 1 μ l, dan ddH₂O 3 μ l. Primer PhcA yang digunakan PhcA-F : 5' GCC CGG TAC CTT TGT TAT GCA CTG AAA CGA AAA C 3' dan PhcA-R : 5' CGC GTC TAG AAC TCA TCC TCC TTT TCT GCA TC 3', sedangkan primer FliC yang digunakan dengan FliC-F : 5' GGC GGC CTT CAG GGA AGG TC 3' dan FliC-R : 5' GAA CGC CAA CGG TGC GAA CT 3'. Amplifikasi dilakukan pada kondisi 5 menit Pre-Denaturasi pada suhu 95°C, Denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, Annealing pada suhu 56°C selama 30 detik, elongasi pada suhu 72°C selama 40

detik dan final extension pada suhu 72°C selama 3 menit. Hasil proses PCR selanjutnya di elektroforesis menggunakan marker *Gene-aid* pada gel agarose 1 % dengan TBE *buffer* selama 30 menit dengan daya 100 volt. Gel agarose yang selanjutnya direndam pada EtBr 20% dan divisualisasikan dengan *gel doc*. Variable pengamatan ditunjukkan dengan munculnya pita DNA pada gel agarose dengan ukuran sesuai dengan target primer yang digunakan.

2. Isolasi dan Purifikasi Bakteriofag

Bakteriofag didapatkan dari tanah pada lahan tempat isolasi bakteri *R. solanacearum* DT3 di daerah Jember. Sebanyak 10 g tanah dan 4 ml kultur bakteri usia 24 jam ditambahkan pada 100 ml media CPG. Suspensi digojok selama 24-48 jam, kemudian disentrifuge pada kecepatan 7000 rpm 4°C selama 10 menit dan difiltrasi dengan membrane filter kerapatan pori 0,2 µm (Steradisc, Krabo Co). Pengamatan hasil isolasi bakteriofag dapat dilakukan menggunakan metode *plague assay* yang dilakukan mengikuti Askora *et al.*, (2009) dengan cara menambahkan 100 µl suspensi bakteriofag hasil filtrasi kedalam 250 µl suspensi bakteri *R. solanacearum* yang telah diperbanyak sebelumnya pada saat usia 24 jam dan diinkubasi selama 2 jam pada pelakuan suhu ruang. Selanjutnya suspensi tersebut dicampurkan dengan media *Top Agar* yang masih hangat (suhu sekitar 50°C) lalu dituangkan pada permukaan media agar CPG dalam cawan petri dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Parameter pengamatan yang diamati adalah munculnya *plaque* (Zona Bening).

Bakteriofag asal *plaque* tunggal diperbanyak dan dimurnikan dengan kultur pada media CPG kemudian digojok selama 24-48 jam. Pemisahan sel bakteri dengan partikel bakteriofag dilakukan dengan sentrifuge kecepatan 7000 rpm selama 10 menit dan supernatant difiltrasi dengan menggunakan membrane filter kerapatan pori 0,2 µm (Steradisc, Krabo Co). Partikel bakteriofag kemudian disimpan pada suhu 4°C hingga digunakan pada pengujian selanjutnya (Addy *et al.*, 2012).

3. Stabilitas Bakteriofag dalam Larutan Kombinasi Senyawa Penginduksi

Pengujian stabilitas bakteriofag dapat dilakukan dengan teknik *spot assay*. Pembuatan kombinasi senyawa penginduksi dengan cara mencampurkan bakteriofag dengan kerapatan 10^5 CFU/ml dengan larutan kitosan konsentrasi 200 ppm dan hormon auksin dengan konsentrasi 5 ppm. Kombinasi tersebut kemudian di *magnetic stirrer* hingga homogen dan diukur pH larutan dengan pH 7,0 serta diinkubasi dengan perbandingan suhu 28°C dan 37°C . *Spot assay* dilakukan dengan mengambil suspensi bakteri *R. solanacearum* sebanyak 350 μl dengan usia kultur 24 jam, kemudian ditambahkan pada *Top Agar* 0,3% yang masih hangat (Sekitar suhu 50°C) lalu dituangkan pada permukaan media CPG dalam cawan Petri (*Metode double layer*) dan ditunggu sampai media padat. Sebanyak 7 μl suspensi kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi dispotkan pada permukaan media CPG dan diinkubasikan pada suhu 28°C selama 24-48 jam. Stabilitas bakteriofag dalam larutan kombinasi diamati dengan terbentuknya *plaque*.

4. Uji Pengaruh Kombinasi Bakteriofag dan Senyawa Penginduksi terhadap Penyakit Layu Bakteri secara *Invivo*

Aplikasi kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi dilakukan pada tanaman tomat umur 1 bulan dalam tabung reaksi. Perlakuan tanaman dilakukan dengan perlakuan pada bagian akar tanaman sebanyak 3x menggunakan gunting steril. Aplikasi senyawa kitosan dilakukan dengan mengaplikasikan pada media cair tanaman tomat sebanyak 200 mg/L (Borines *et al.*, 2015), sedangkan senyawa hormon Auksin (IBA) diaplikasikan menggunakan konsentrasi 5 mg/L (Cato *et al.*, 2013). Sedangkan aplikasi bakteriofag untuk pengujian tersebut menggunakan kerapat bakteriofag 10^5 PFU/ml (Addy *et al.*, 2012). Parameter pengamatan ditentukan secara fisiologis yang bersifat kualitatif dengan membandingkan gejala yang ditimbulkan pada tanaman uji umur 7 hsi. Selain itu dilakukan pengamatan terhadap senyawa Peroksidase dan fenol total tanaman sebagai respon umum tanaman terinfeksi patogen.

3.3.3 Variabel Pengamatan

1. Analisa Aktivitas Hidrogen Peroksidase (H_2O_2)

Daun tanaman hasil pengamatan uji *in vivo* diambil sebanyak 0,5 g pada semua perlakuan untuk dilakukan ekstraksi. Ekstraksi daun tanaman dilakukan dengan menggerus sampel hingga menjadi bubuk menggunakan nitrogen cair kemudian menambahkan dengan larutan penyangga fosfat 0,1 M sebanyak 1 ml. Sentrifuge sampel dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit kemudian diambil supernatan sebagai sampel pada pengujian berikutnya. Sebanyak 5 μ l hasil ekstraksi daun tanaman pada semua perlakuan dalam pengujian ditambahkan masing-masing dengan 150 μ l pirogallol 0,05 M dan dicampur ke dalam *well* microplate reader. Selanjutnya ditambahkan 25 μ l H_2O_2 1 %. Nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 420 nm setiap 20 detik sekali 2 menit, dengan menggunakan blanko campuran larutan yang sama tetapi tanpa ekstrak jaringan tanaman. Sebagai ganti ekstrak jaringan tanaman, ke dalam larutan blanko ditambahkan larutan penyangga fosfat (Iriyanto, 2017).

2. Analisa Kandungan Fenol Total

Pengujian kandungan fenolik total menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* yang absorbansinya diukur pada panjang gelombang 755 nm (Samin dkk, 2012). Langkah pertama yakni sampel daun hasil ekstraksi sebelumnya diambil sebanyak 200 μ l, kemudian ditambahkan 100 μ l reagent Folin-Ciocalteu 50%. Selanjutnya ditambahkan 750 μ l ddH₂O dan diinkubasi 3 menit. Selanjutnya, ditambahkan dengan 300 μ l ml Na_2CO_3 2% dan divorteks kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu 28°C serta dipanaskan ke dalam suhu 45°C selama 20 menit. Absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang 755 nm dengan menggunakan spektrofotometer.

BAB 5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Isolat bakteri yang digunakan merupakan bakteri *R. solanacearum* penyebab layu bakteri pada tanaman tomat.
2. Diperoleh bakteriofag ϕ A-DT3 yang mampu menginfeksi *R. solanacearum* serta tetap stabil dalam kombinasi senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) hingga 7 hari pengamatan setelah kombinasi.
3. Keberadaan bakteriofag ϕ A-DT3 dalam kombinasi senyawa penginduksi (hormon auksin dan kitosan) penting dalam keberhasilan larutan kombinasi untuk mengendalikan tanaman tomat yang diinokulasikan dengan bakteri *R. solanacearum*.
4. Kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi tidak menginduksi respon kimiawi pada tanaman tomat yang muncul sebagai respon umum bahwa tanaman terinfeksi patogen.

5.2 Saran

Penelitian selanjutnya diharapkan dapat melakukan dalam skala lapang untuk mengetahui kemampuan kombinasi bakteriofag dengan senyawa penginduksi dalam pengendalian patogen *R. solanacearum* pada tanaman tomat.

DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, A. Z., H. K. Emmy., dan H, Yusuf. 2014. Respon pertumbuhan dan produksi beberapa varietas tomat (*Lycopersicum esculentum* L.) dataran rendah terhadap pemberian pupuk kandang ayam. *Agroekoteknologi*, 2 (4) : 1401-1407.
- Addy , S, H., A, Askora., T, Kawasaki., M, Fujie., and T, Yamada. 2012. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. *Plant Disease*, 96 (8) : 1204-1209.
- Addy, H, S., N, F, Azizi., and P, A, Mihadjo. 2016. Detection of bacterial wilt pathogen and isolation of its bacteriophage from banana in lumajang area, indonesia. *Agronomy*, 2016 : 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5164846>.
- Ahmed, N, N., R, Islam., M, A, Hossain., M, B, Meah and M, M, Hossain. 2013. Determination of races and biovars of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease of potato. *Agricultural Science*, 5 (6) : 86-93.
- Bastas, K, K. 2014. Importance of reaction oxygen spesies in plants-pathogens interaktion. *Selcuk J Agr Food Sci*, 28 (1) : 11-21.
- Bittelli, M., M, Flury., G, S, Campbell., and E, J, Nichols. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. *Agricultural and Forest Meteorology*, 107 : 167-175.
- Boonreung, C., and S, Boonlertnirun. 2013. Efficiency of chitosan for controlling dirty panicle disease in rice plants. *Agricultural and Biological Science*, 8 (5) : 380 – 385.
- Borines, L, M., R, M, Sagarino., R, B, Calamba., A, A, Contioso., J, G, Jansalin., and C, L, Calibo. 2015. Potential of chitosan for the control of tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al. *Annals of Tropical Research* 37 (2) : 57-69.
- Brien, J, A., A, Daudi., V, S, Butt., G, P, Bolwell. 2012. Reactive oxygen spesies and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 263 (3) : 765-779.
- Caballero, M. E. L., M, C, G, Guillen.,M, P, Mateos., and P, Montero. 2005. A chitosan-gelatin blend as a coating for fish patties. *Food Hydrocolloid*, 19 (1) : 303-311.
- Cahyono, B. 2008. *Tomat : Usaha Tani dan Penanganan Pasca Panen*. Yogyakarta : Kanisius.

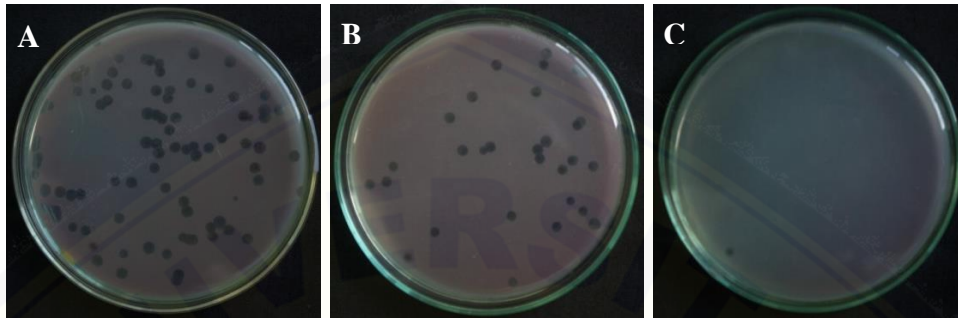
- Cato, S, C., W, R, Macedo., E, P, P, Peres., and P, R, Castro. 2013. Sinergism among auxins, gibberellin and cytokinins in tomato cv. micron-tom. *Horticultura Brasileira*, 31 (4) : 549-553.
- Doolotkeldieva, T., and S, Bobusheva. 2016. Identification of *Ralstonia solanacearum* in kyrgyzstan's potato fields and the possibility of using biocontrol agents against this pathogen. *Environmental and Agricultur Research*, 2 (5) : 146-156.
- Eldin, M, S, M., E, A, Soliman., A, I, Hashem., T, M, Tamen. 2008. Chitosan modified membranes for wound dassing applications : preparations, characterization and bio-evaluation. *Trends Biomater. Artif. Organs*, 22 (3) : 158-168.
- Gayakvad, P., D, B, Jadede., and B, Bhalae. 2014. Effect of foliar application of GA3, ethrel and copper sulphate on flowering behaviour and sex ratio of *Jatropha curcas* L. *Applied and Natural Science*, 6 (1) : 286-289.
- Hanumanthappa, M., M, Palaniswamy., and J, Angayarkanni. 2013. Isolation of lytic bacteriophage against *Ralstonia solanacearum* causing wilting symptoms in ginger (*Zingiber officinale*) and potato (*Solanum tuberosum*) plants. *Biological Sciences*, 2 (11) : 78-84.
- Hoerussalam, P, A., dan A, Khaeruni. 2013. Induksi ketahanan tanaman jagung (*Zea mays* L.) terhadap penyakit bulai melalui seed treatment serta pewarisannya pada generasi s1. *Ilmu Pertanian*, 16 (2) : 42-59.
- Iriyanto, F. E. S. 2017. Aktivitas Nitrate Reduktase dan Peroksidase Pada Tanaman Tebu Varietas BL (*Saccharum officinarum*) Terinfeksi *Sugarcane Mosaic Virus* (SCMV). *Skripsi*. Jember : Universitas Jember.
- Jones, J, B., G, E, Vallad., F, B, Iriarte., A, Obradovic., M, H, Wernsing., L, E, Jackson., B, Balogh., J, C, Hong., M, T, Momol. 2014. Considerations for using bakteriofage for plant disease control. *Bakteriophage*, 2 (4) : 208-214.
- Jung, K, M., M, H, Lee., J, K, Shim., S, T, Seo., R, Whrestha., M, S, Cho., J, H, Hahn., and D, S, Park. 2007. Pcr-based specific detection of *Ralstonia solanacearum* by amplification of cytochrome c1 signal peptide sequences. *Microbiol. Biotechnol*, 17 (11) : 1765-1771.
- Kalpage, M, D and D, M, 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.

- Kumar, R., A, Khurana., and A, K, Sharma. 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Experimental Botany*, 65 (16) : 4561-4575.
- Kusuma, A. H dan M, U, Zuhro. 2015. Pengaruh varietas dan ketebalan mulsa jerami padi pada pertumbuhan dan hasil tanaman tomat (*Lycopersicum Esculentum Mill*). *Agrotechbiz*, 2 (1) : 1-10.
- Lang, J, M., D, H, Gent., and H, Schwartz. 2007. Management of Xanthomonas leaf blight of onion with bakteriofage and a plant activator. 2007. *Plant. Dis*, 91 (7) : 871-878.
- Lee, J and T, H, Park. 2016. Isolation and characterization of bakteriofages infecting *Ralstonia solanacearum* from potato fields. *Res. Plans. Dis*, 22 (4) : 236-242.
- Munarti dan Surti. 2014. Pengaruh konsentrasi IAA dan BAP terhadap pertumbuhan stek mikro kentang secara in vitro. *Pendidikan Biologi*, 1 (1) : 1-8.
- Murthy, K, N., U, Fazilath., Crtrashree., C, Srinivas. 2016. Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. *Plant Sciences*, 5 (12) : 1799-1811.
- Murugaiyan, S., J, Y, Bae., J, Wu., S, D, Lee., H, Y, Um., H, K, Choi., E, Chung., J, H, Lee., and S, W, Lee. 2010. Characterization of filamentous bakteriofage pe226 infecting *Ralstonia solanacearum* strains. *Applied Microbiology*, 110 : 296-303.
- Patma, U., Putri, L., A., dan Siregar, L, A, M. 2013. Respon media tanam dan pemberian auksin asam asetat naftalen pada pembibitan arn (*Arenga pinnata Mer*). *Agroekoteknologi*, 1 (2) : 286-296.
- Rahmawati, A. 2015. Isolasi dan cloning fragmen gen *phcA* untuk konstruksi plasmid sebagai bahan mutagenesis pada *Ralstonia solanacearum*. *Skripsi. Jember : Universitas Jember*.
- Samin, A., B, Nurhayati., dan Yuszda. 2014. Penentuan kandungan fenolik total dan aktivitas antioksidan dari rambut jagung (*Zea Mays L.*) Yang Tumbuh Di Daerah Gorontalo. *Skripsi. Gorontalo : Universitas Gorontalo*.
- Saputra, R., T, Arwiyanto., A, Wibowo. 2015. Uji aktivitas antagonistik beberapa isolate *Bacillus spp.* terdapat pada layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada beberapa varietas tomat dan identifikasinya. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*, 1 (5) : 1116-1122.

- Schonfeld, J., H, Heuer., J, D, Elsas., and K, Smalla. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of pcr amplification of *fliC* fragmentd. *Appl. Environ. Microbiol*, 69 (12) : 7248-7256.
- Shahbaz, M. U., M, Tariq., Irfan., and B, Nasim. 2015. Biochemical and serological characterization of *Ralstonia solanacearum* associated with chilli seeds from Pakistan. *Agricultural and Biology*, 17(1) : 31-40.
- Sharma, P., A, B, Jha., R, S, Dubey., and M, Pessarrakli. 2012. Reactive oxygen spesies, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful condition. *Botany*, 27 page doi:10.1155/2012/217037.
- Tahat, M. M., K, Sijam., and R, Othman. 2012. The potential of endomycorrhizal fungi in controlling tomato bacterial wilt *Ralstonia solanacearum* under glasshaouse conditions. *Biotechnology*, 11 (67) : 13085-13094.
- Torres, M. A., J, D, G, Jones., and J, L, Dengl. 2006. Reactive oxygen spesies signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141 : 373-378.
- Trisnawati, E., D, Andesti., dan A, Saleh. 2013. Pembuatan kitosan dari limbah cangkang kepiting sebagai bahan pengawet buah duku dengan variasi lama pengawetan. *Teknik kimia*, 19 (2) : 17-27.
- Vanitha, S, C., and S, Umesha. Variation in defense related enzyme activities in tomato during the infection with bacterial wilt pathogen. *Plant Interaction*, 3 (4) : 245-253.
- Vellosilo, T., J, Vicente., S, Kulasekaran., M, Hamberg., dan C, Castresana. 2010. Emerging complexity in reactive oxygen spesies production and signaling during the response of plants to pathogens. *Plant Physiology*, 154 (1) : 444-448.
- Xoao, X., W, Lin., K, Li., X, Gao. 2017. Early burs of reactive oxygen spesies positively regulate resistence of eggplant against bakterioal wilt. *Phytopathology* : 1-10 DOI: 10.1111/jph.12604.
- Yu, J, G., J, A Lim., Y, R, Song., S, Heru., G, H, Kim., Y, J, Koh. 2016. Isolation and characterization of bakteriophages against pseudomonas syringe pv. Actinidinae caousing bacterial cancer disease in kiwifruit. *Microbiol. Biotechnol*, 26 (2) : 385-393.

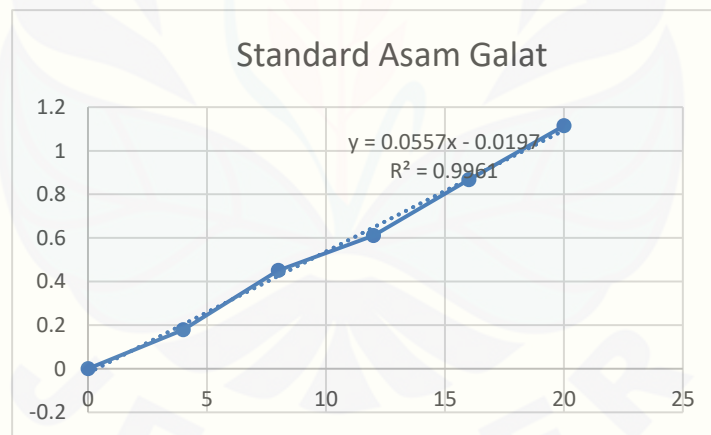
LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengujian Kerapatan Bakteriofag hasil isolasi



Gambar 1. Pengujian Kerapatan Bakteriofag hasil isolasi (A) Pengenceran 10^3 (B) Pengenceran 10^4 (C) Pengenceran 10^5

Lampiran 2. Standar Asam Galat



Gambar 2. Standart asam galat pada pengujian fenol total

Lampiran 3. Hasil Uji *In vivo*

Tabel 1. Hasil pengujian bakteriofag dalam larutan kombinasi secara *in vivo*

No.	Perlakuan	Ulangan	Hasil
1	TNT + BRS (Kontrol Positif)	1	++
		2	++

		3	+
2	TNT + Air (Kontrol Negatif)	1	-
		2	-
		3	-
3	TNT + BRS + KITO	1	+
		2	+
		3	++
4	TNT + BRS + KITO (H +1)	1	+
		2	+
		3	+
5	TNT + BRS + IBA	1	++
		2	++
		3	+
6	TNT + BRS + IBA (H+1)	1	++
		2	+
		3	+
7	TNT + BRS + ϕ	1	-
		2	-
		3	-
8	TNT + BRS + ϕ (H+1)	1	-
		2	-
		3	+
9	TNT + BRS + KITO + IBA + ϕ	1	-
		2	-
		3	-
10	TNT + BRS + KITO + IBA + ϕ (H+1)	1	-
		2	-
		3	-

Keterangan : (-) Tidak menunjukkan gejala layu
 (+) Menunjukkan gejala layu
 (++) Menunjukkan gejala mati tanaman