



**POTENSI FLAGELABAKTERI *Ralstonia solanacearum* SEBAGAI
PEMICU KETAHANAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) TERINDUKSI**

SKRIPSI

Oleh

**DIQITA NAVIRI FAUZYA
NIM.121510501066**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

HALAMAN JUDUL



**POTENSI FLAGELABAKTERI *Ralstonia solanacearum* SEBAGAI
PEMICU KETAHANAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) TERINDUKSI**

SKRIPSI

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

Oleh

**DIQITA NAVIRI FAUZYA
NIM.121510501066**

**PROGRAM STUDI AGROTEKNOLOGI
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

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 zam yang terang benderang akan akhlak dan ilmu.
3. Ayahanda Soetjipto, Ibunda Ribut Sunaryati serta seluruh keluarga yang telah memberikan motivasi.
4. Almamaterku tercinta Universitas Jember

Ucapan terimakasih pula saya sampaikan kepada:

1. Bapak Hardian Susilo Addy, SP., M.P., Ph.D serta Ibu Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D yang telah bersedia menjadi Dosem Pembimbing Utama serta Dosen Pembimbing Anggota.
2. Kawan- kawan mahasiswa Agroteknologi 2012

MOTTO

“Fa inna ma’al ‘usri yusra. Inna ma’al ‘usri yusra” yang artinya

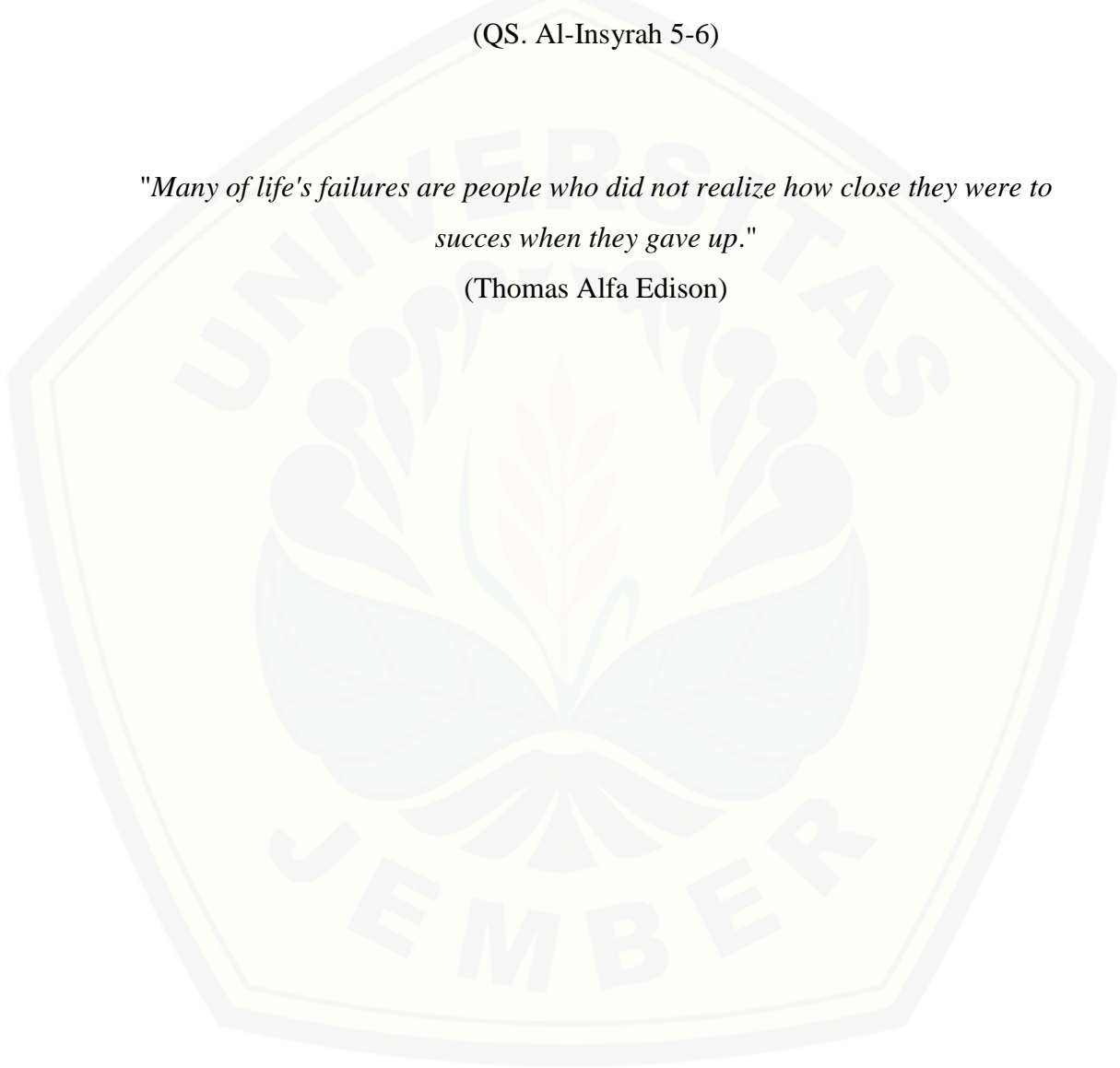
Karena sesungguhnya setelah kesulitan ada kemudahan.

Sesungguhnya setelah kesulitan ada kemudahan.

(QS. Al-Insyrah 5-6)

*"Many of life's failures are people who did not realize how close they were to
succes when they gave up."*

(Thomas Alfa Edison)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Diqita Naviri Fauzya

NIM : 121510501066

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Potensi Flagela Bakteri *Ralstonia solanacearum* sebagai Pemicu Ketahanan Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Terinduksi** “ adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan substansi disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada instansi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isisnya 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,
yang menyatakan.

Diqita Naviri Fauzya
NIM. 121510501066

SKRIPSI

**POTENSI FLAGELABAKTERI *Ralstonia solanacearum* SEBAGAI
PEMICU KETAHANAN TEMBAKAU (*Nicotiana tabacum*) TERINDUKSI**

Oleh :

Diqita Naviri Fauzya
NIM. 121510501066

Pembimbing :

Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy., SP., MP., Ph.D
NIP. 19801109 200501 1 001

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

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Potensi Flagela Bakteri *Ralstonia solanacearum* sebagai Pemicu Ketahanan Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Terinduksi** “ karya Diqita Naviri Fauzya telah diuji dan disahkan pada:

Hari :
Tanggal :
Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,

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

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

Dosen Penguji 1,

Dosen Penguji II,

Dr. Suhartiningsih Dwi. N, S.P., M.Sc.
NIP. 19730325 200312 2 002

Ir. Abdul Majid, MP.
NIP. 19670906 199203 1 004

Mengesahkan

Dekan,

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

RINGKASAN

Potensi Flagela Bakteri *Ralstonia solanacearum* sebagai Pemicu Ketahanan Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Terinduksi, Diqita Naviri Fauzya, 121510501066 halaman 46; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit yang menyerang tanaman yang tersebar luas di daerah tropika dan sub tropika. *R. solanacearum* memiliki flagella, yang monotrik. Flagella berfungsi sebagai (1) alat gerak, (2) alat indra, (3) alat bantu menangkap makanan. Oleh karena itu tujuan penelitian untuk mengetahui efektifitas suspensi flagella *R. solanacearum* dalam menginduksi ketahanan tembakau terhadap penyakit layu bakteri. Identifikasi patogen dengan teknik PCR pada tanaman terong asal Kabupaten Jember menunjukkan bahwa, isolate memiliki fragmen *phcA* dengan ukuran 1228 bp dan memiliki fragmen *fliC* dengan ukuran 400 bp. *R. solanacearum* bergerak menggunakan flagella hal ini ditunjukkan dengan semakin besar diameter koloni pada media konsentarsi agar 0,4% dibandingkan dengan konsentarsi agar 2%. Deteksi protein flagella *R. solanacearum* menunjukkan pita protein berukuran 30 kDa. Sel bakteri *R. solanacearum* pada pengenceran 10^9 sampai 10^7 cfu/ml yang diinokulasikan pada daun tembakau mampu bereaksi hipersensitif pada 24 jam setelah inokulasi dengan mengalami nekrosis. Pada inokulasi kombinasi flagella konsentarsi 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan konsentarsi bakteri 10^9 cfu/ml dan 10^7 cfu/ml, flagella dapat menekan tersebarnya bakteri pada konsentarsi 10^8 cfu/ml dan 10^7 cfu/ml. Tembakau yang diinokulasi dengan flagella dan kombinasi flagella dengan bakteri aktivitas peroksidase lebih tinggi sedangkan kandungan total fenol rendah dibandingkan dengan tembakau yang diinokulasi dengan bakteri. Hasil ini menunjukkan bahwa penekanan kejadian penyakit *R. solanacearum* oleh flagella *R. solanacearum* terjadi melalui mekanisme pengimbasan ketahanan tanaman.

SUMMARY

Potential Flagella Bakteri *Ralstonia solanacearum* as Trigger Tobacco Security (*Nicotiana tabacum*) Induced, Diqita Naviri Fauzya, 121510501066 halaman 46; Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Bacterial-wilt-disease caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the diseases that attack plants which are widespread in tropical and subtropical regions. *R. solanacearum* has flagella, which is monotric. Flagella have some functions such as (1) motion device, (2) sensory device, and (3) food catching device. Therefore, the purpose of the study was to investigate the effectiveness of *R. solanacearum* flagella suspension in inducing tobacco resistance against bacterial-wilt-disease. Pathogen identification by PCR technique in an eggplant from Jember District showed that isolate had a *phcA* fragment with size 1228 bp and had a *fliC* fragment with size 400 bp. *R. solanacearum* moves using flagella is indicated by the larger diameter of the colony on the concentration medium for 0.4% compared to the 2% agar concentration. Detection of the *R. solanacearum* flagella protein showed a protein band of 30 kDa. *R. solanacearum* bacterial cell at dilution 10^9 to 10^7 CFU / ml inoculated on tobacco leaf was able to react hypersensitivity at 24 h after inoculation with necrosis. In the inoculation of 0.02 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ and 0.1 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ concentration of 0.028 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ and 0.05 $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ concentration of bacteria with 10^9 CFU / ml and 10^7 CFU / ml, the flagella was able to suppress the spread of bacteria at concentrations of 10^8 CFU / ml and 10^7 CFU / ml. Inoculated tobacco with flagella and flagella combination with bacteria have peroxidase activity which is higher, while the total phenol content was low, compared with inoculated tobacco with bacteria. These results indicated that the suppression of *R. solanacearum* disease by *R. solanacearum* flagella occurred through the mechanism of plant crop resilience.

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat 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 “Potensi Flagelabakteri *Ralstonia solanacearum* sebagai Pemicu Ketahanan Tembakau (*Nicotiana tabacum*) Terinduksi” dengan baik. . Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan Strata Satu (S1) sebagai sarjana pertanian di Fakultas Pertanian Universitas Jember.

Penyelesaian Karya Ilmiah Tertulis (Skripsi) ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih atas semua dukungan dan bantuan kepada :

1. Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D dan Ibu Prof. Dr. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, M.S., Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Dosen Pembimbing Anggota yang telah memberikan arahan dan motivasi dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini;
2. Dr. Suhartiningsih Dwi Nurcahyanti, SP., MSc. Dan Ir. Abdul Majid, MP. selaku Dosen Penguji Utama dan Dosen Penguji Anggota yang telah meluangkan waktu dan arahan dalam penyusunan karya tulis ilmiah ini;
3. Dr. Sigit Prastowo, MP. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
4. Kedua Orang Tua ku, Ibu Ribus Sunaryati dan Ayah Soetjipto, serta Adik ku Gading Paradikma Alfarizi yang tidak pernah lelah selalu mendukung dan mendo'akan demi kelancaran dalam penelitian dan menuntut ilmu;
5. Sahabat saya Firda Dwi Jayanti, Amalia Warniasih, Indika Selviana dan Puri Nur Aini yang telah memberi dukungan agar saya segera menyelesaikan penulisan karya tulis ilmiah ini;
6. Winda P., Mangifera, Wahyu Cipta Y., Arie Rahmawari, Febrian Eka, Guruh Surastomo, Alm Alike, Angga, Udin, *Phage Team* yang tidak bias

saya sebutkan satu persatu dan CDAST *team* yang telah membantu dalam penelitian saya dan membantu penyusunan karya tulis ini.

7. Dita, Zainul, Hety, Feri, Ana, dan seluruh teman-teman kost yang telah memberi dukungan agar saya segera menyelesaikan penelitian saya dan membantu penyusunan karya tulis ini.
8. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang turut serta membantu dalam penyelesaian karya tulis ini.

Penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan sehingga diharapkan adanya kritik dan saran untuk perbaikan selanjutnya. Penulis berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

Jember,

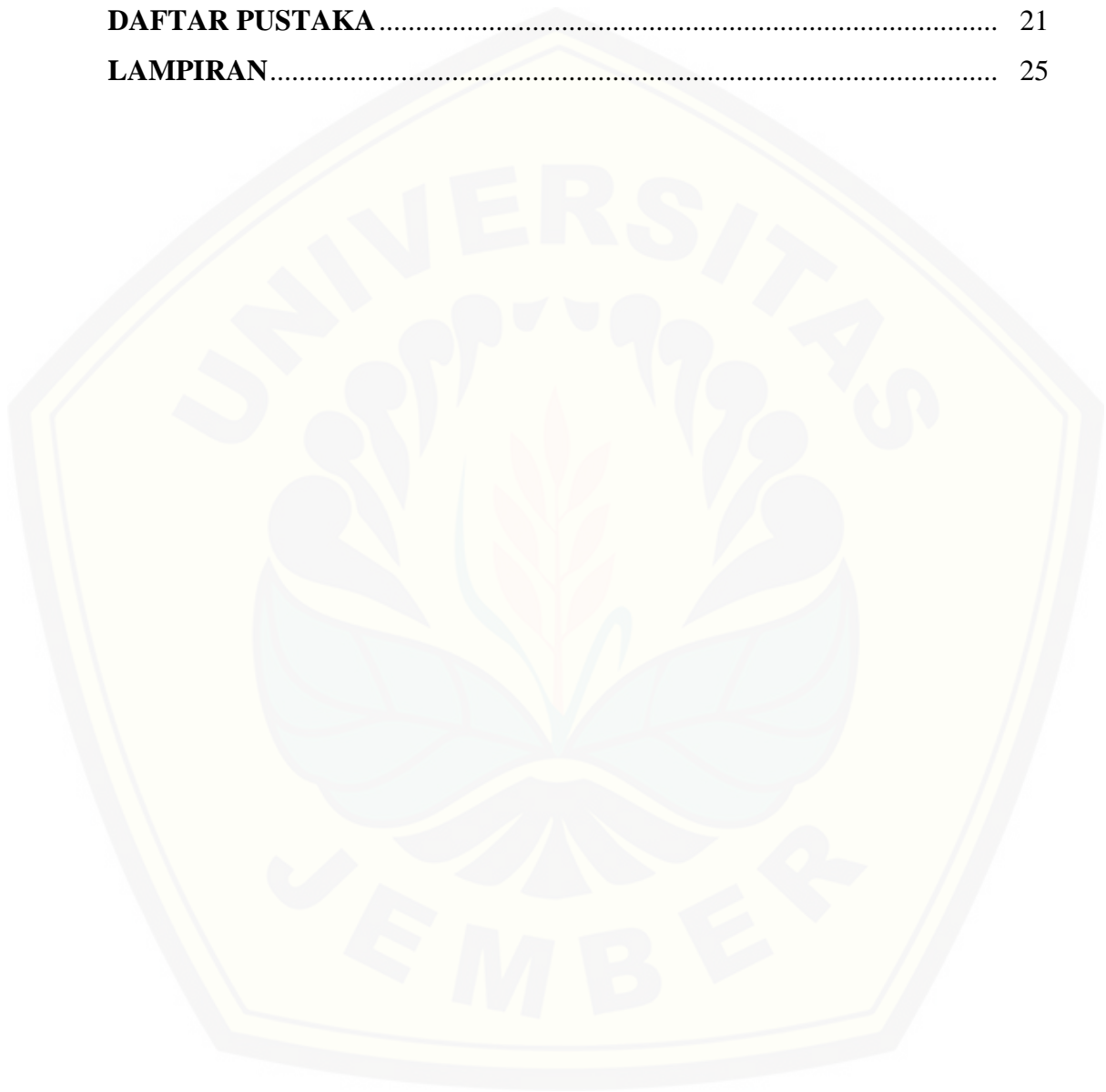
Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan	2
1.4 Manfaat	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 <i>Ralstonia Solanacearum</i> Penyebab Penyakit Layu Bakteri	4
2.2 Deskripsi dan Kalsifikasi Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i>	5
2.3 Induksi Ketahanan	5
2.3.1 Induksi ketahanan SAR.....	6
2.3.2 Induksi ketahanan ISR	6
2.4 Flagella Bakteri <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	8
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	8
3.2 Alat dan Bahan	8
3.2.1 Alat.....	8
3.2.2 Bahan	8

3.3 Persiapan Penelitian.....	8
3.3 Pelaksanaan Riset	8
3.3.1 Isolasi <i>R. Solanacearum</i>	8
3.3.2 Ekstraksi DNA Bakteri.....	9
3.3.3 Deteksi gene <i>fliC</i> dan <i>phcA</i> pada isolat <i>R. Solanacearum</i>	9
3.3.4 Visualisasi Hasil PCR.....	10
3.3.5 Deteksi Aktivitas Pergerakan <i>R. solanacearum</i> dengan Flagella.....	10
3.3.6 Isolasi Flagella <i>R. solanacearum</i>	10
3.3.6.1 Kultur <i>R. solanacearum</i>	10
3.3.6.2 Ekstraksi flagella dan Analisis Kandungan Protein Terlarut	10
3.3.7 Profil Protein Flagellin <i>R.solanacearum</i> dengan SDS- PAGE	11
3.3.8 Pengaruh Infiltrasi Flagella Terhadap Reaksi Hipersensitif...	11
3.3.9 Analisis Senyawa Ketahanan	12
3.3.9.1 Analisis Peroksidase dan Analisis Kandungan Protein Terlarut	12
3.3.9.2 Analisis total fenol	12
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	13
4.1 Hasil.....	13
4.1.1 Pengambilan Sampel.....	13
4.1.2 Identifikasi genom <i>R.solanacearum</i> dengan primer <i>phcA</i> dan <i>fliC</i>	14
4.1.3 Pergerakan Flagella Bakteri <i>R. solanacearum</i>	14
4.1.4 Deteksi protein flagella <i>R.solanacearum</i> dengan SDS-PAGE	15
4.1.5 Pengaruh Infiltrasi Fleglla terhadap Timbulnya Gejala Nekrosis pada Tanaman Tembakau.....	16
4.1.6 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Ketahanan Tanaman	17
4.1.6.1 Kandungan Aktifitas Peroksidase.....	17
4.1.6.2 Analisis Total Fenol	17

4.2 Pembahasan	16
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	20
5.1 Kesimpulan	20
5.2 Saran	20
DAFTAR PUSTAKA	21
LAMPIRAN	25



DAFTAR GAMBAR

Judul Gambar	Halaman
Gambar 3.1 Cara inokulasi.....	13
Gambar 3.2 Posisi daun tembakau yang diinokulasi dengan air steril, flagella,bakteri, dan kombinasi flagella+bakteri untuk uji ketahanan tanaman.....	13
Gambar 4.1 Identifikasi bakteri pada tanaman terong.....	16
Gambar 4.2 Hasil Visualisasi PCR koloni dengan primer <i>phcA</i> dan <i>fliC</i>	17
Gambar 4.3 Diameter koloni pada media CPG padat dengan konsentrasi 2% agar dan 0,4% agar	18
Gambar 4.4 Visualisasi protein flagellin pada SDS-PAGE 12,5%.....	19
Gambar 4.5 Daun yang menunjukkan gejala nekrosis.....	20

BAB 1.PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salah satu kendala dalam budidaya tanaman tembakau yaitu serangan dari penyakit, penyakit yang biasanya menyerang pada pertanaman tembakau ini adalah layu bakteri. Penyakit ini biasanya disebabkan oleh *Pseudomonas solanacearum* saat ini penyakit ini biasa disebut *Ralstonia solanacearum*. Penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit yang menyerang tanaman paling berbahaya yang tersebar luas di daerah tropika dan sub tropika.

R. solanacearum adalah patogen yang memiliki kisaran inang yang cukup luas, yaitu lebih dari 200 spesies dari 53 famili (Setyari *et al.*, 2013). Penyakit tersebut masih menjadi kendala pada tanaman pertanian di Indonesia, terutama pada tanaman tembakau, tomat, kentang, cabai, kacang tanah, jahe serta pisang (Machmud, 1986). Bakteri *R. solanacearum* memiliki flagella, dimana tipe flagella bakteri *R. solanacearum* adalah monotrik. Hal ini disebabkan bakteri *R. solanacearum* memiliki satu bagian flagella. Flagella bakteri *R. solanacearum* disusun oleh tiga bagian: filamen, hook (sudut), dan basal body (bagian dasar). Bagian dasar menancap pada membran plasma, disusun oleh suatu tangkai serta satu atau dua rangkaian cincin yang mengelilinginya dan berhubungan dengan membran plasma, peptidoglikan, dan pada bakteri Gram-negatif berhubungan dengan membran luar pembungkus sel. Didalam flagella terdapat flagellin dimana flagellin adalah protein dari flagella. Flagellin dapat digunakan sebagai penginduksian respon pertahanan. Akan tetapi, belum ada data mengenai kemampuan flagella dalam menginduksi pertahanan tanaman tembakau.

Pada saat ini pengendalian penyakit tanaman lebih ditekankan dengan varietas tahan. Tidak hanya menggunakan varietas tahan, pengendalian penyakit tanaman juga dapat dilakukan dengan penginduksian ketahanan tanaman. Induksi respon pertahanan ini termasuk dalam mekanisme pengendalian patogen dengan memanfaatkan material biologi (kontrol biologi). Mekanisme induksi ketahanan ini umumnya dapat dicirikan dengan meningkatkan pembentukan senyawa

penginduksi seperti asam salisilat, siderofor dan lipopolisakarida oleh tanaman (Bakker *et al.*, 2007).

Baru-baru ini pengendalian menggunakan agensi hayati sedang dikembangkan. Tidak hanya menggunakan agensi hayati saja, saat ini pengendalian juga dapat dilakukan dengan menginduksi ketahanan tanaman. Mekanisme induksi ketahanan umumnya dapat dicirikan dengan meningkatkan pembentukan senyawa penginduksi seperti asam salisilat, siderofor dan lipopolisakarida oleh tanaman (Bakker *et al.*, 2007). Induksi ketahanan ada dua macam yaitu *Systemic Acquired Resistance* (SAR) dan *Induced Systemic Resistance* (ISR). Ketahanan tanaman terinduksi dapat dipicu dengan melakukan penambahan bahan kimia tertentu, mikroorganisme non patogen, dan patogen avirulen (Nasahi, 2010). Flagellin dapat digunakan dalam melakukan penginduksian respon pertahanan (Zipfel 2009). Sebab didalam flagella terdapat flagellin yang dapat menimbulkan respon pertahanan pada tanaman (Bakker *et al.*, 2007). Flagella bakteri *Pseudomonas fluorescens* spp sebelumnya telah digunakan dalam menginduksi ketahanan ISR (Peter *et al.*, 2007).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah suspensi flagella *Ralstonia solanacearum* dapat menginduksi ketahanan tembakau terhadap penyakit layu bakteri?

1.3 Tujuan

Untuk mengetahui efektifitas suspensi flagella *Ralstonia solanacearum* dalam menginduksi ketahanan tembakau terhadap penyakit layu bakteri.

1.4 Manfaat

Penelitian ini yaitu dapat memberikan informasi tentang manfaat flagella *Ralstonia solanacearum* sebagai salah satu penginduksi ketahanan tanaman terhadap *Ralstonia solanacearum*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Ralstonia Solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri

R. solanacearum merupakan penyebab penyakit layu bakteri yang dapat membuat kerugian yang sangat besar bagi para petani. *R. solanacearum* merupakan bakteri dengan gram negative yang semula dikenal sebagai *Pseudomonas solanacearum*. *R. solanacearum* ini termasuk dalam kelompok beta *Proteobacteria*. *R. solanacearum* merupakan patogen penting pada beberapa tanaman. Bakteri ini menyerang pada akar tanaman melalui luka yang disebabkan oleh nematode ataupun munculnya akar lateral. Tanaman penting yang menjadi inang *R. solanacearum* adalah tomat, tembakau, pisang, kentang, kacang tanah, dan sebagainya (Poussier *et al.*, 2003).

R. solanacearum ini dikenal dengan bakteri yang memiliki banyak ras dan memiliki virulensi yang berbeda-beda. *R. solanacearum* dibagi menjadi 5 ras berdasarkan kisaran inang : ras 1 menyerang tanaman tembakau, tomat, dan Solanaceae lainnya; ras 2 menyerang tanaman pisang (triploid) dan Heliconia; ras 3 menyerang tanaman kentang; ras 4 menyerang tanaman jahe, dan ras 5 menyerang tanaman murbei (Nasrun *et al.*, 2007). Bakteri layu yang disebabkan oleh *R. solanacearum* ini juga dapat dikelompokkan ke dalam biovar, dimana pengelompokan secara biovar ini berdasarkan kemampuan bakteri dalam mengoksidasi 6 jenis karbohidrat (disakarida, laktosa, maltosa, alkohol, manitol, dan sorbitol (Gunawan, 2006)

Gejala awal yang dapat dilihat apabila tanaman terserang layu bakteri akibat *R. solanacearum* yaitu daun-daun muda mengalami kelayuan, daun-daun yang tua menguning dan batang tanaman yang sakit cenderung lebih banyak membentuk akar adventif sampai setinggi bunga (Semangun 2007). Akan tetapi gejala secara umum yang terlihat akibat serangan *R. solanacearum* yaitu tanaman seperti kekurangan air, daun muda yang berada di pucuk menjadi layu serta bagian bawah pada daun yang tua menguning. Gejala ini disebabkan karena *R. solanacearum* menyerang pembuluh xylem (Setyari *et al.*, 2013).

2.2 Deskripsi dan Klasifikasi Bakteri *Ralstonia solanacearum*

R. solanacearum merupakan bakteri aerobik, memiliki bentuk batang yang berukuran $1,5 \times 0,5 \mu\text{m}$, merupakan bakteri gram negative, tidak memiliki spora dan tidak berkapsul. Bakteri ini bergerak menggunakan satu bulu getar (*Flagella*). Sel tunggal *R. solanacearum* memiliki ukuran yang bervariasi, ukuran ini dipengaruhi oleh kondisi pertumbuhan (Suryadi dan Sri, 2009). *R. solanacearum* yang virulen menunjukkan bentuk koloni tidak beraturan, berlendir warna merah muda pada bagian tengahnya, dan dikelilingi oleh lender berwarna putih susu kotor dengan elevasi dari permukaan koloni sedikit konveks. Sedangkan koloni yang nonvirulen memiliki warna merah tidak berlendir, bulat, dan elevasi agak menonjol (Gunawan, 2006; Aini, 2007).

2.3 Induksi Ketahanan

Induksi ketahanan tanaman merupakan salah satu pengendalian penyakit tanaman yang sedang dikembangkan saat ini. Induksi ketahanan tanaman didefinisikan sebagai proses ketahanan aktif yang tergantung pada penghalang fisik atau kimia tanaman inang. Peningkatan ketahanan tanaman secara terinduksi dapat melalui proses SAR (*Systemic Acquired Resistance*) atau ISR (*Induced Systemic Resistance*) yang melibatkan berbagai jenis gen, enzim dan protein. Baik SAR maupun ISR sama-sama penting peranannya untuk meningkatkan ketahanan tanaman. Ketahanan tanaman terinduksi dapat dipicu dengan melakukan penambahan bahan-bahan kimia tertentu, mikroorganisme non patogen, dan patogen avirulen.

2.3.1 Induksi ketahanan SAR

Mekanisme ketahanan tanaman SAR terjadi setelah adanya infeksi patogen secara local pada tanaman, kemudian tanaman terinfeksi dan tanaman mengaktifkan gen-gen yang berperan dalam ketahanan (*Pathogenesis-related genes; PR*) dimana gen tersebut memproduksi senyawa-senyawa kimia untuk pertahanan tanaman, seperti asam salisilat (SA).

2.3.2 Induksi Ketahanan ISR

Mekanisme ketahanan tanaman ISR terjadi bukan karena infeksi patogen, tetapi infeksi mikroba non patogen pada perakaran (Pieterse, 2002; Supriadi dan Rosita, 2012). Respon dari pada tanaman terhadap infeksi dari mikroba non-patogen, maka tanaman akan memproduksi senyawa-senyawa pertahanan tanaman seperti jasmonat (JA) dan senyawa etilen (ET). Beberapa penelitian telah menjelaskan bahwa faktor yang dapat memicu ISR seperti senyawa kimia (siderofor, antibiotik dan ion Fe) yang dihasilkan oleh rizobakteria dan komponen sel bakteri seperti dinding sel mikroba, flagella, filli, membran lipopolisakarida (LPS) yang dapat berperan sebagai elicitor dalam menginduksi ketahanan secara sistemik. Flagella merupakan salah satu komponen yang dapat memicu ketahanan induksi dari suatu tanaman. Sebab didalam flagella terdapat flagellin yang dapat menimbulkan respon pertahanan pada tanaman (Bakker *et al.*, 2007). Mekanisme dari induksi ketahanan ini bersifat sistemik, berspektrum luas dan tahan lama (Supriadi dan Rosita, 2012). Akan tetapi tergantung dari pada senyawa yang digunakan dalam induksi ketahanan, kondisi dari tanaman itu serta lingkungan tumbuh tanaman tersebut (Walters et al. 2005). Keberhasilan dari induksi ketahanan bervariasi dari 20% hingga 85% (Walters et al. 2005).

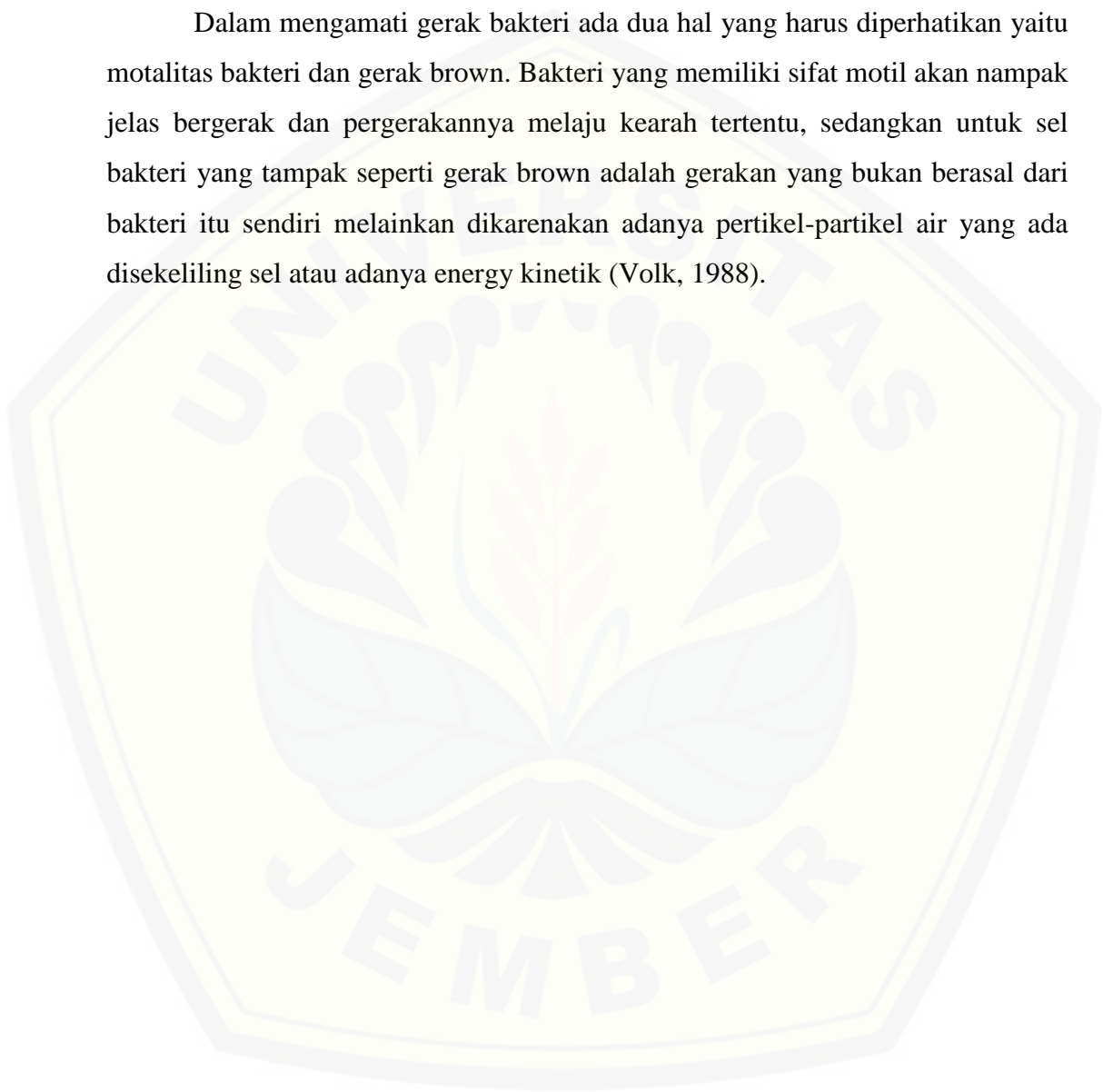
2.4 Flagella Bakteri *Ralstonia solanacearum*

Flagella merupakan bulu-bulu cambuk yang dimiliki oleh beberapa jenis bakteri, letak flagella berbeda-beda tergantung kepada spesiesnya. *R. solanacearum* memiliki flagella. Flagella berfungsi sebagai alat gerak, selain sebagai alat gerak flagela juga dapat digunakan untuk mengetahui keadaan lingkungan atau dapat juga digunakan sebagai alat indra dan alat bantu untuk menangkap makanan.

Flagella tersusun atas 3 bagian yaitu pangkal yang merupakan bagian yang berhubungan dengan membrane plasma, hook, serta filament yang memiliki bentuk seperti benang-benang yang panjangnya sampai beberapa kali lebih panjang dari tubuh bakteri. Gelendong spiral ini tersusun atas protein yang disebut dengan flagellin. Flagellin bakteri merupakan komponen protein utama flagella,

sehingga flagella dapat menimbulkan respon pertahanan pada tanaman (Peter *et al*, 2007). Flagella bakteri sebelumnya telah digunakan dalam penelitian induksi ketahanan ISR dengan menggunakan *Pseudomonas fluorescens* (PF) (Peter *et al*, 2007).

Dalam mengamati gerak bakteri ada dua hal yang harus diperhatikan yaitu motilitas bakteri dan gerak brown. Bakteri yang memiliki sifat motil akan nampak jelas bergerak dan pergerakannya melaju kearah tertentu, sedangkan untuk sel bakteri yang tampak seperti gerak brown adalah gerakan yang bukan berasal dari bakteri itu sendiri melainkan dikarenakan adanya partikel-partikel air yang ada disekeliling sel atau adanya energy kinetik (Volk, 1988).



BAB 3. BAHAN DAN METODE

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Divisi Biomolekuler dan Bioteknologi *Center for Development of Advanced Sciences and Tecnology* (CDAST) Universitas Jember. Penelitian dimulai pada bulan Juli 2016-September 2017.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: kamera digital, gelas ukur, pisau steril, pinset, petridish, tabung reaksi, mikropipet, tip, tabung appendorf, autoklaf, laminar air flow, jarum ose, cutter, aluminium foil, kapas, tissue, vortex, lemari pendingin, inkubator, rak tabung reaksi, rak appendorf, filter membran 0,25 μm , erlenmeyer, gelas ukur, timbangan, pH meter, alat PCR, *gel doc*, elektroforesis, centrifuge, ultracentrifuge, spektrofotometer, syring, mikroplatereader, falkon, dan alat lain yang mendukung penelitian.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: sample tanaman yang bergejala layu bakteri, media *Cassaminozcid Pepton Glucose* (CPG), glukosa, aquadest, alkohol, gliserol, bahan deteksi *phcA* dan *fliC* dengan PCR, master mix solution (merk kappa), tanaman tembakau, dan bahan lain yang mendukung penelitian.

3.3 Persiapan Penelitian

Menyiapkan media *Cassaminoacid Pepton Glucose* (CPG) dengan ditambah *Tryphenil Tetrazolium Chloride* (TZC) sebagai media tumbuh *R. solanacearum*. Mencari sampel tanaman sakit dari Antirogo, Kabupaten Jember pada tanaman terong. Apabila persiapan penelitian sudah dilaksanakan, maka penelitian siap dilakukan sesuai dengan prosedur

3.4 Pelaksanaan Riset

3.4.1 Isolasi *R. Solanacearum*

Isolat bakteri *R. solanacearum* yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah DT3 yang diperoleh dari tanaman terong berasal dari Antirogo, Jember. Akar tanaman terong di desinfeksi permukaannya dengan 70% alkohol dan dibilas 2 kali dengan air steril dan ditumbuhkan pada media YPGA (*Yeast Peptone Glucose Agar*) dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah diinkubasi mengamati koloni, koloni yang tumbuh digoreskan pada media CPG (*Cassaminoacid Peptone Glucose*) dan diinkubasi selama 48 jam. Isolat ini kemudian diperbaharui dengan cara menumbuhkan isolat *R. solanacearum* pada media cair CPG dan digojok selama satu malam. Sebanyak 700 µl suspensi bakteri diambil dengan micropipet kemudian dituangkan pada *ependorf* dengan ukuran 1500 µl dan ditambahkan gliserol sebanyak 300 µl kemudian divortek. Stok bakteri ini dapat digunakan dan disimpan pada suhu -80°C. Cara memperbanyak isolat *R. solanacearum* dilakukan dengan CPG cair dan streak plate pada media CPG padat .

3.4.2 Ekstraksi DNA Bakteri

Kultur bakteri yang ditumbuhkan pada media cair yang berumur 24 jam diambil sebanyak 1500 µl dan disentrifuge selama 20 menit pada 4°C dengan kecepatan 12.000 rpm. Supernatan dibuang, pelet ditambah dengan *Phenol : Chloform : Isoamyl – 25 : 24 : 1* (PCI) dan TE buffer dengan perbandingan 1:1, kemudian dihomogenkan dengan vortek dan diinkubasi pada -20°C selama 60 menit, setelah diinkubasi disentrifuge selama 15 menit kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan diambil dan ditambah 10% 3M sodium asetat serta etanol dingin 97% sebanyak 2,5 x volume sampel, vortek hingga homogen dan diinkubasi pada suhu -20°C selama 60 menit hingga DNA terpresipitasi. Setelah itu disentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C. Supernatan dibuang, pelet dicuci dengan 500 µl 70% etanol kemudian dihomogenkan dan disentrifuge pada kecepatan 12.000 rpm dengan suhu 4°C selama 5 menit. setelah itu pelet dikering anginkan dan disesuspensi dengan 50 µl

TE buffer dan divortex hingga homogen dan disimpan pada suhu 4°C. Pelet ini adalah DNA yang akan digunakan pada PCR.

3.4.3 Deteksi gene *fliC* dan *phcA* pada isolat *R. Solanacearum*

Untuk mengetahui isolate bakteri yang diperoleh adalah *R. Solanacearum*, maka dilakukan identifikasi dengan menggunakan teknik PCR dengan primer *fliC* dan *phcA*. Campuran yang digunakan dalam proses PCR (20µl) dengan menggunakan primer *fliC* dengan ukuran sekitar 400 bp menggunakan pasangan primer *fliC* R: 5'GGCGGCCTTCAGGGAGGTC 3' dan primer *fliC* F : 5'GAACGCCAACGGTGCGAACT 3' terdiri atas 7µl ddH₂O, 1 µl Primer R, 1 µl primer F, 1 µl sample DNA, 10 µl 2×PCR mix (kappa). Untuk primer *phcA* dengan ukuran sekitar 1228 bp menggunakan pasangan primer *phcA* R: 5' GCC CGG TAC CTT TGT TAT GCA CTG AAA CGA AAA 3' dan *phcA* F: 5' CGC GTC TAG AAC TCA TCC TCC TTT TCT GCA TC 3' terdiri atas 7µl ddH₂O, 1 µl Primer R, 1 µl Primer F, 1 µl sample DNA, 10 µl 2×PCR mix (Kappa). Amplikasi DNA dilakukan pada kondisi berikut: Pre-denaturasi suhu 95°C selama 5 menit, Denaturasi pada suhu 95°C selama 30 detik, Anneling pada suhu 55°C selama 30 detik, Elongasi pada suhu 72°C selama 40 detik, Final extension pada suhu 72°C selama 3 menit dengan 30 siklus.

3.4.4 Elektroforesis Hasil PCR

Hasil PCR dielektroforesis pada gel agarose 1% dengan bufer 1×TBE. Setelah itu dimasukkan 2µl marker (Gene-Aid) dan 5 µl sample DNA ke dalam lubang sumur sample. Arus listrik dialirkan 100 volt selama 30 menit. Gel kemudian direndam dalam bufer TBE yang mengandung *Etidium Bromide* selama 10-15 menit dan divisualisasi sinar ultraviolet dengan menggunakan alat UV Gel Documentation System Major Science. Visualisasi hasil elektroforesis DNA bakteri dilakukan dengan proses perendaman gel agarose pada *Etidium Bromide* (EtBr).

3.4.5 Deteksi Aktivitas Pergerakan *R. solanacearum* dengan Flagella

Bakteri yang telah diremajakan kemudian di deteksi aktifitas pergerakan flagella, dengan melihat pergerakan bakteri pada media CPG agar dengan konsentrasi 2% dan 0,4% agar per 100 ml CPG, pada suhu 28°C selama 24 jam. Tujuan deteksi aktivitas pergerakan flagela adalah untuk melihat adanya pergerakan yang dilakukan oleh bakteri.

3.4.6 Isolasi Flagella *R. solanacearum*

3.4.6.1 Kultur *R. solanacearum*

Kultur *R. solanacearum* yang telah dideteksi pergerakan flagella kemudian dikulturkan pada media CPG cair. Kultur *R. solanacearum* diambil 2000 µl kemudian ditumbuhkan pada media CPG cair 400 ml dan inkubasi pada dengan suhu 28°C selama 12-20 jam.

3.4.6.2 Ekstraksi flagella dan Analisis Kandungan Protein Terlarut

Kultur yang telah diinkubasi selama 12-20 jam pada suhu 28°C kemudian dicentrifuge pada 10.000 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang, pelet ditambah buffer fosfat dicentrifuge pada 10.000 rpm 4°C selama 10 menit, supernatan dibuang pelet ditambah dengan bufer fosfat 0,01 M dan dicukur dengan tekanan jarum berukuran 22-gauge kemudian dicentrifuge pada 12.000 rpm 4°C selama 10 menit. Supernatan diambil kemudian dicentrifuge pada 40.000 rpm 4°C selama 2 jam. Supernatan dibuang dan pelet yang berisi flagella ditambah dengan bufer fosfat. Pelet yang diperoleh mengandung protein terlarut.

Analisis kandungan protein terlarut menggunakan metode Bradford (1976). Sebanyak 5 µl suspensi flagella ditambah dengan 995 µl reagen Bradford diinkubasi 15 menit. Warna yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 595 nm.

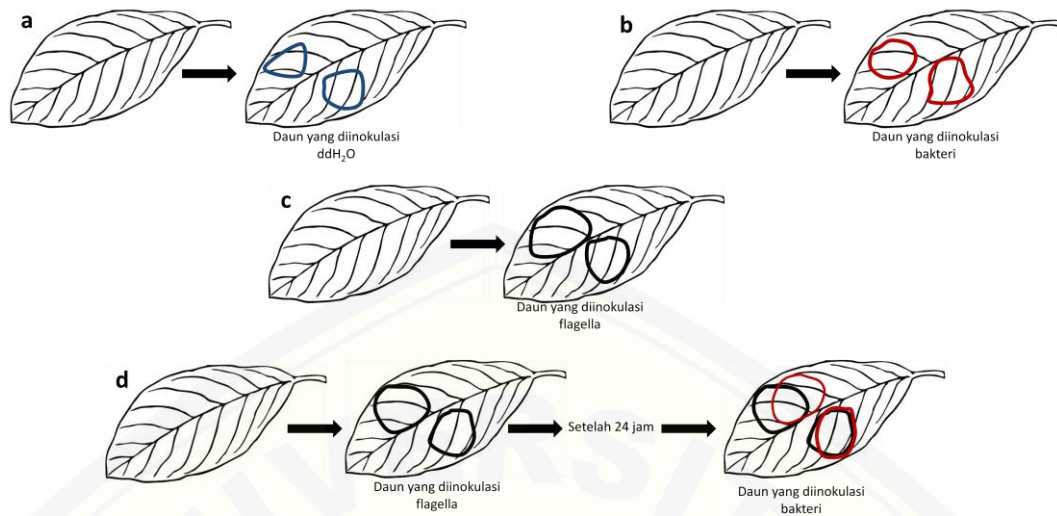
3.4.7 Profil Protein Flagellin *R. solanacearum* pada SDS-PAGE

Sampel flagella ditambah buffer loading dengan perbandingan 2 : 1, kemudian didenaturasi pada air mendidih selama 5 menit. Sampel yang sudah

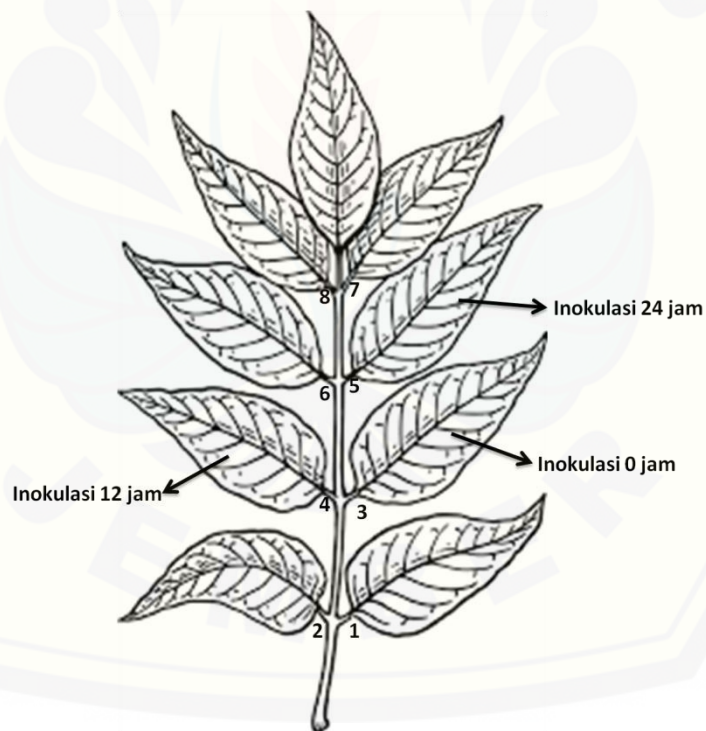
didenaturasi dimasukkan ke dalam sumur gel sebanyak 10-20 μl dan dielektroforesis pada 70 volt selama 2,5 - 3 jam. Langkah-langkah yang dilakukan yaitu pembuatan *separating gel* dan *stacking gel*. *Separating gel* dibuat dengan konsentrasi akrilamida 12.5% dengan stok akrilamida 30% 3125 μl , 2750 μl Tris-HCl pH 8.8, 75 μl SDS 10 %, 75 μl ammonium persulfat (APS) dan 625 μl N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), ddH₂O 1505 μl dan *stacking gel* dibuat dengan stok akrilamida 30% 450 μl , 380 μl 1 M Tris-HCl pH 6.8, 30 μl SDS 10 %, 30 μl APS, 5 μl (TEMED) dan ddH₂O 2110 μl . Hasil pemisahan protein selanjutnya di cat dengan *Commassie Brilliant Blue* (CBB) 1% (Fatchiyah *et al*, 2011).

3.4.8 Pengaruh Infiltrasi Flagella Terhadap Reaksi Hipersensitif

Pengujian reaksi hipersensitif pada tanaman tembakau umur 6 minggu, pada posisi daun nomor 2,3 dan 4 dari daun paling bawah, dengan menyuntikan suspense flagella pada konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah 24 jam diinokulasi kembali dengan bakteri pada kerapatan 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml dan 10^5 cfu/ml (pada perlakuan kombinasi). Pada perlakuan lain dilakukan inokulasi suspense flagella saja pada konsentrasi 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dan bakteri pada kerapatan 10^9 cfu/ml, 10^8 cfu/ml, 10^7 cfu/ml, 10^6 cfu/ml dan 10^5 cfu/ml, kemudian diinkubasi 24 jam.



Gambar 3.1 Cara inokulasi, air steril (a), flagella (b), bakteri (c) dan inokulasi flagella serta inokulasi kedua dengan bakteri dilakukan setelah 24 jam inokulasi flagella (d)



Gambar 3.2 Posisi daun tembakau yang diinokulasi (a) pada 0 jam inokulasi lalu diamati peroksidase dan total fenol, (b) pada 12 jam setelah inokulasi lalu diamati peroksidase dan total fenol, dan (c) pada 24 jam setelah inokulasi lalu diamati peroksidase dan total fenol

3.4.9 Analisis Senyawa Ketahanan pada Daun Tembakau

3.4.9.1 Analisis Peroksidase dan Analisis Kandungan Protein Terlarut

Analisis peroksidase dilakukan dengan mengambil sample daun tembakau dari hasil uji HR selama 0 jam, 12 jam dan 24 jam setelah inokulasi bakteri tanaman sehat, Flagella 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, RS 1 bakteri kerapatan 0,01 CFU/ml, RS 2 bakteri kerapatan 0,0001 CFU/ml, flagella+RS 1 (kombinasi flagella 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan konsentrasi bakteri 0,01 CFU/ml), dan flagella+RS2 (kombinasi flagella 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dengan konsentrasi bakteri 0,0001 CFU/ml). Sebanyak 1 gram daun dipotong kecil dan dihaluskan dengan mortal, kemudian ditambah dengan pasir laut (*seasand*) secukupnya dan bufer fosfat 0,1 M (pH 6,5) (sampel dan bufer fosfat = 1:2). Hasil ekstraksi dimasukkan kedalam appendof dan dicentrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm pada suhu 4°C, supernatan dipindah ke appendof baru. Supernatant yang didapat mengandung protein terlarut, sedangkan pelet mengandung protein tidak terlarut

Penentuan aktivitas peroksidase dengan mengambil hasil gerusan sampel sebanyak 5 μl supernatan diambil ditambah dengan 150 μl pirogalol 0,05 M; dan 25 μl H₂O₂ 1%. Kemudian kandungan peroksidase (unit/mg protein) diukur pada mikroplate reader dengan panjang gelombang λ 420 nm selama 20 detik dengan interval waktu pengukuran 3 menit.

3.4.9.2 Analisis total fenol

Penentuan kandungan total fenol ekstrak ditentukan melalui uji Folin Ciocalteu (Conde, *et al.*, 1997) dengan sedikit modifikasi. Analisis ini menggunakan sample yang sama untuk analisis peroksidase diambil sebanyak 200 μl , ditambah dengan 100 μl reagen Folin Ciocalteus 50%, 750 μl ddH₂O dan diinkubasi 3 menit. Setelah diinkubasi ditambah dengan 300 μl Na₂CO₃ 2% dan divortek kemudian diinkubasi kembali selama 10 menit pada suhu 28°C. Selanjutnya dipanaskan dalam suhu 45°C selama 20 menit, dan kandungan total fenol (mg/g) diukur pada panjang gelombang λ 755 nm.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

1. Isolat layu bakteri yang diambil dari tanaman terong asal Kabupaten Jember secara visual dan karakteristik adalah *R. solanacearum*, dan diperkuat dengan hasil identifikasi menggunakan PCR dengan primer *phcA* menunjukkan target teramplifikasi fragmen DNA 1228 bp dan *fliC* menunjukkan target teramplifikasi fragmen DNA 400 bp.
2. Pita protein flagellin pada SDS-PAGE *R. solanacearum* ditunjukkan pada 30 kDa.
3. Inokulasi flagella *R. solanacearum* pada tembakau dapat menekan penyebaran *R. solanacearum* pada kerapatan bakteri 10^8 cfu/ml hingga 10^7 cfu/ml dengan konsentrasi flagella terbaik 0,1 µg/µl.
4. Analisis aktivitas peroksidase dan kandungan total fenol menunjukkan bahwa penekanan kejadian penyakit *R. solanacearum* oleh flagella *R. solanacearum* terjadi melalui mekanisme pengimbasan ketahanan tanaman.

5.2 Saran

Perlunya dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan konsentrasi flagella yang lebih tinggi sehingga nantinya didapatkan konsentrasi yang optimum untuk menghambat *R. solanacearum*.

DAFTAR PUSTAKA

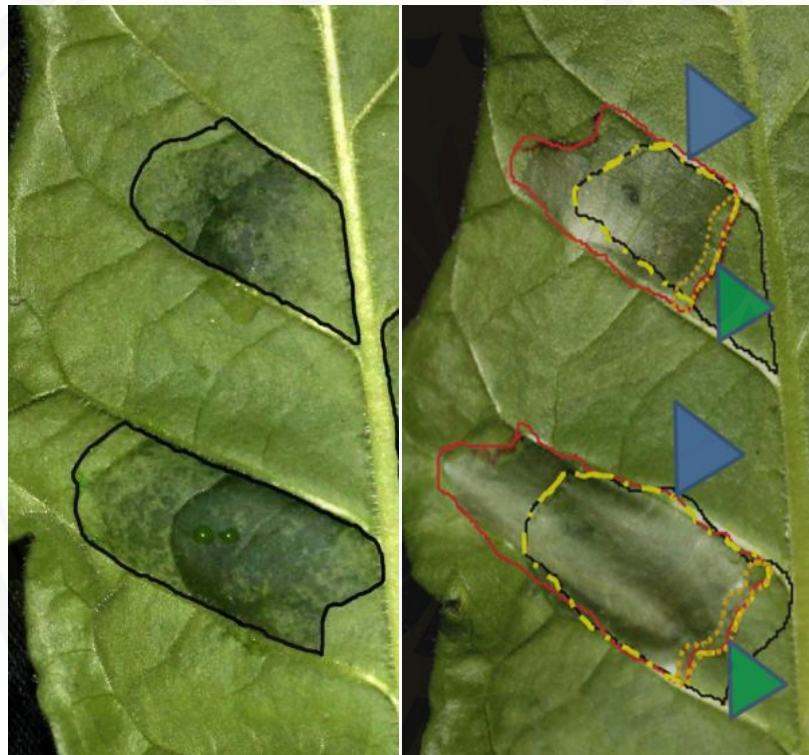
- Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology, 5th ed.* Elsevier Academic Press. California.
- Aini, E.N. 2007. "Efektifitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp. dalam Menghambat *Ralstonia solanacearum* pada Cabai." Tidak Diterbitkan. Skripsi. Jember: Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- 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.
- Bakker, P, A. H. M., Pieterse, C.M.J., dan L. C. van Loon. 2007. Induced Systemic Resistance by *Fluorescent Pseudomonas* spp. *The American Phytopathological Society*. 97 (2):239-243.
- Buddenhagen, I. W. 1961. Bacterial wiltsif banana: history and know distribution. *Tropica Agric.* 38:107-121.
- Conde, E., E. Cadahia, M.C. Garcia-Vallejo, B.F.D. Simon, and J. R. G. Adrados. 1997. Low Molecular Weight Polyphenol in Cork of *Quercus suber*. *J. Agric Food Chem.* (45): 2695-2700.
- Fatchiyah, Estri Laras Arumingtyas, Sri Widyarti dan Sri Rahayu. 2011. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Jakarta: Penerbit Erlangga.
- Gunawan O.S. 2006. Virulesi dan Ras *Ralstonia solanacearum* pada Pertanaman Kentang di Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. *Hort*, 16(3): 211-218.
- Hoerussalam, Aziz P., dan Andi K. 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.
- 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.
- Liestiany, E., Fikri, E.N., Susilowati, dan D.H., Endang. 2012. Kemampuan *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriophage*. 96(6): 1821-1827.
- Machmud M. 1986. Bacterial wilt in Indonesia. In Persley, G.J. (Ed.). *Bacterial Wilt in Asia and Southern Pacific. ACIAR Proc.* 13:30-34.

- Marwan, H. 2014. Pengimbasan ketahanan tanaman pisang terhadap penyakit darah (*Ralstonia solanacearum* phylotipe IV) menggunakan bakteri endofit. *J.HPT Tropika*. 14(2): 128-135.
- Mukaromah, F. 2013. *Karakteristik Penyebab penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tembakau di Probolinggo*. Surabaya: Balai Besar Perbenihan dan Proteksi Tanaman
- Murthy, K. N., Fazilath, Azma., Chitrashree., Srinivas, C. 2016. Induction of Systemic Resistance in Tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescen*. *Plant Sciences*, 5(12): 1799-1811
- Nasahi, C. 2010. *Peran Mikroba dalam Pertanian Organik*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Nasrun, Christanti, Triwidodo, A., dan Ika, M. 2007. Karakteristik Fisiologis *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu Bakteri Nilam. *Jurnal Littri*. 13(2): 43-48.
- Peter, A.H.M., Bekker, Corne, M.J., Pieterse and L. C. van Loon. 2007. Induced Systemic Resistance by Fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 97(2): 239-243.
- Pieterse, C.M.J., A. Leon-Reyes, S. Van der Ent dan S. C M Van Wees. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5,308-316.
- Poussier, S., p. Thoquet, D. T. Demery, S. Barthet, D. Meyer, M. Arlat, and A. Trigalet. 2003. Host plant-dependent Phenotypic Reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to Pathogenic Forms via Alterations in the *phcA* Gene. *Molecular Microbiology*: 1-15.
- Pudjihartati, E., Satriyas, I., dan Sudarsono. 2006. Aktivitas Pembentukan secara Cepat Spesies Oksigen Aktif, Peroksidase, dan Kandungan Lignin Kacang Tanah Terinfeksi *Sclerotium rolfsii*. *Hayati*. 13(4):166-172
- Rahmawati, A. 2015. Isolasi dan cloning fragmen gen *phcA* untuk konstruksi plasmid sebagai bahan mutagenesis pada *R.solanacearum*. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Saravanan, T. , Bhaskaran, R. & Muthusamy, M. 2004. *Pseudomonas fluorescens* Induced Enzymological Changes in Banana Roots (Cv. Rasthali) against Fusarium Wilt Disease. *J. Plant Pathology*. 3(2): 72-80.
- Schonfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D., dan Smalla, K. 2003. Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil on the Basis of PCR

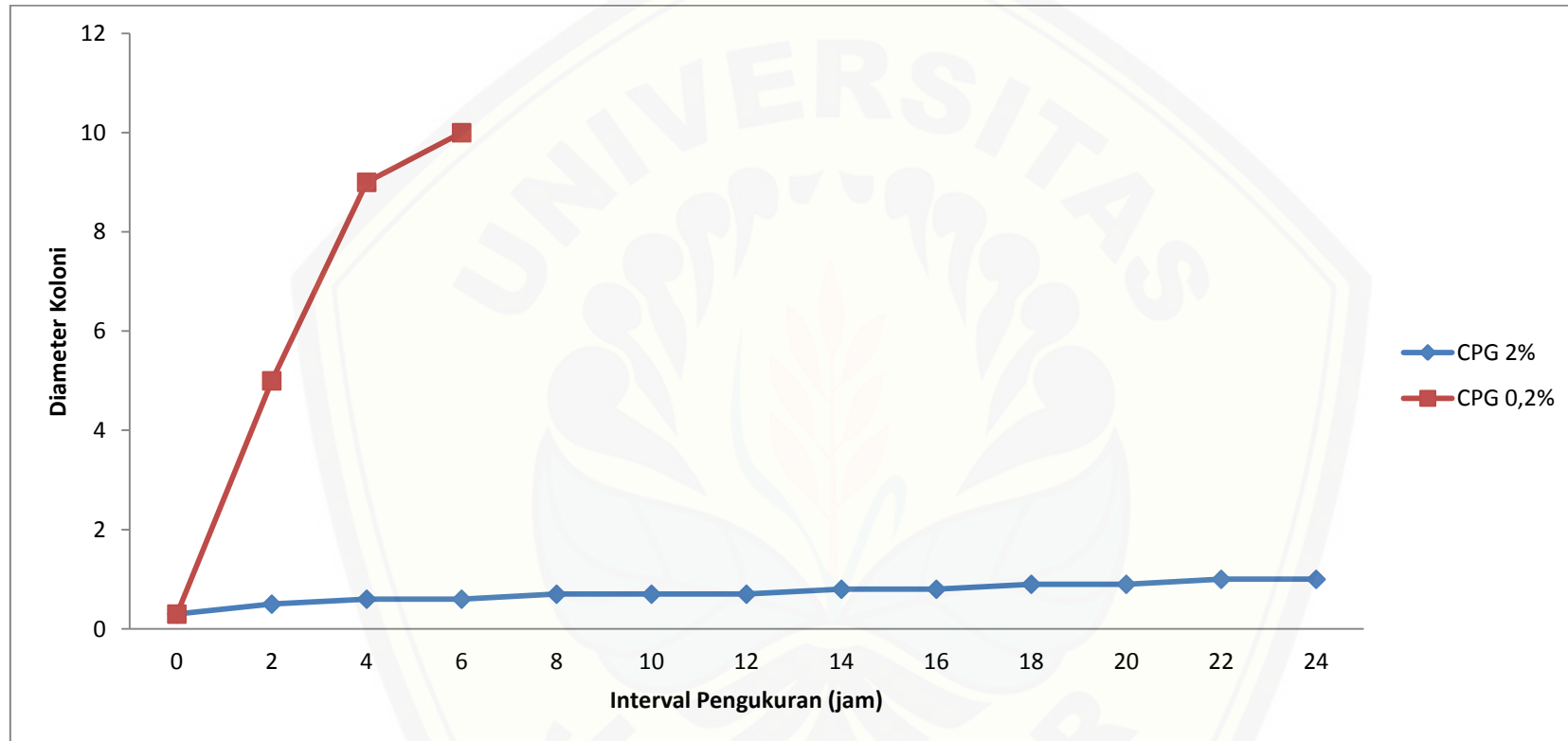
- Amplification of *fliC* Fragments. *Appl. Environ Microbiol.* 65(12): 7248-7256.
- Semangun, H. 2007. *Penyakit 5 Penyakit Tanaman Hortikultura Di Indonesia*. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Setyari, A.R., Aini, L.Q., dan Abadi, A.L. 2013. Pengaruh Pemberian Pupuk Cair Terhadap Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Jurnal HPT*. 1(2): 80-87.
- Shuhufin, M. 2011. Ketahanan morfologi dan biokimia beberapa varietas kedelai yang berasosiasi dengan bakteri fotosintetik *Synechococcus sp.* terhadap serangan hama utama pada musim tanam MK-I. *Skripsi*. Jember: Universitas Jember.
- Supriadi dan Rosita. 2012. *Induksi Ketahanan Tanaman Jahe secara Hayati dan Kimia Terhadap Gangguan Hama dan Penyakit*. Bogor: Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik.
- Taguchi, F., Rena, S., Yoshishige, I., Kazuhiro, T., Tomonori, S., and Yuki, I. 2003. Post-Translational Modification of Flagellin Determines the Specificity of HR Induction. *Plant Cell Physiol.* 44(3): 342-349.
- Tans-Kersten, K., Darby, B., dan Caitilyn, A. 2004. Swimming Motility, a Virulence Trait of *Ralstonia solanacearum*, Is Regulated by FlhDC and the Plant Host Environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 17(6): 686-695.
- Tans-Kersten, K., Huayu, H., and Caitilyn, A. 2001. *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. *Journal of Bacteriology.* 183(12): 2597-3605.
- Volk, Swisley A & Margareth F Whceler. 1988. *Mikrobiologi Dasar*. Jakarta: Erlangga.
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology.* 12. 414-420.

LAMPIRAN

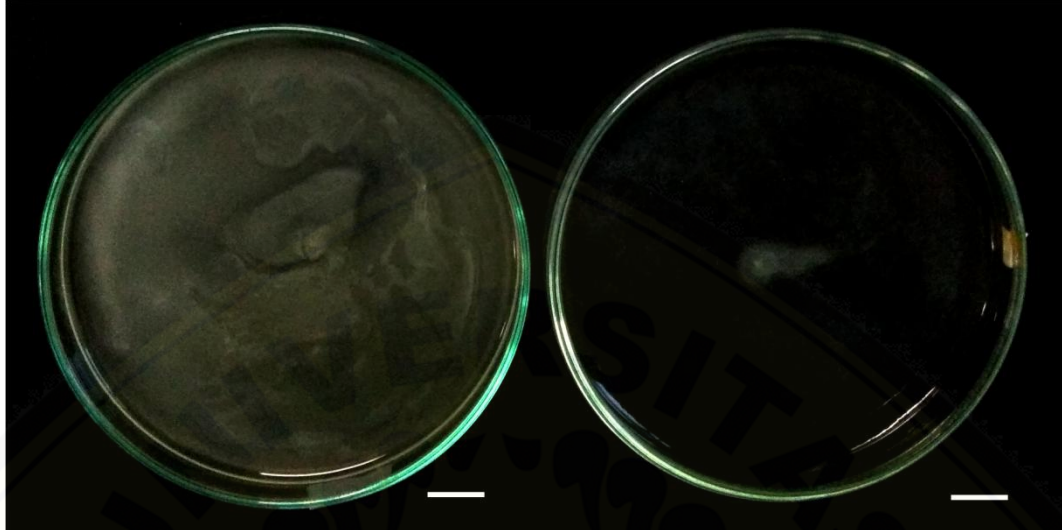
Lampiran 1. Uji patogenisis *R. solanacearum* pada daun tembakau



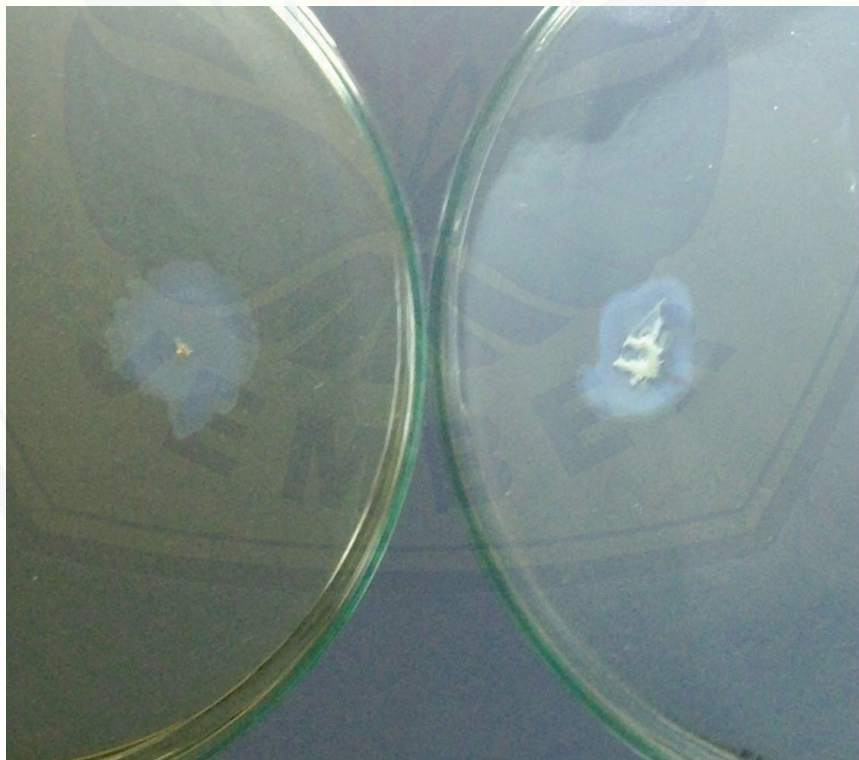
Lampiran 2. Diameter Diameter koloni pada media CPG padat dengan konsentrasi 2% agar dan 0,2%



Lampiran 3. Gambar pergerakan bakteri pada media CPG 0,4% dan 2% agar setelah 24 jam



Lampiran 4. Gambar pergerakan bakteri pada media CPG 2% dan 0,2% agar setelah 4 jam

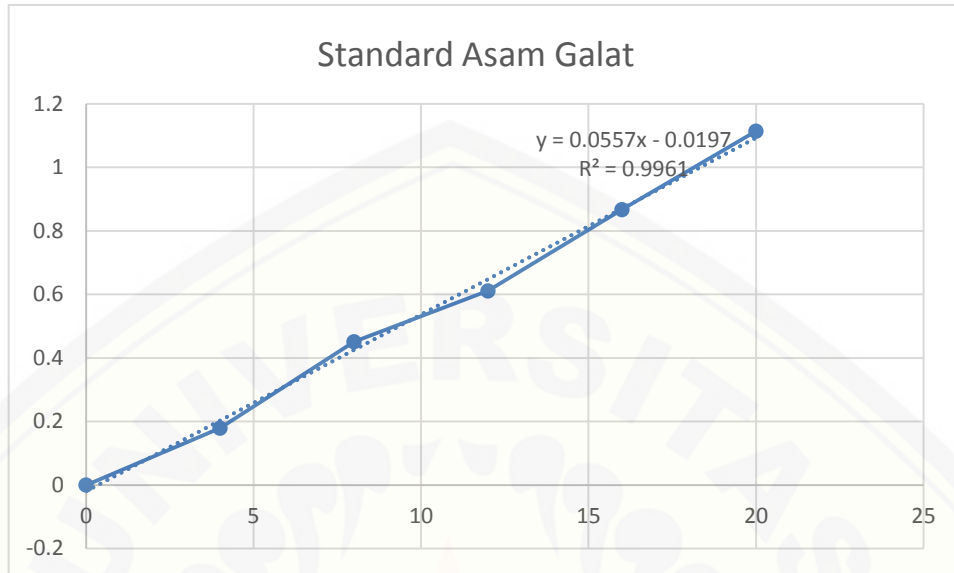


Lampiran 5. Hasil Perhitungan Aktivitas Peroksidase Daun Tanaman Tembakau

Waktu Pengambilan sample	Unit/mg protein						
	Air Steril	Tanaman sehat	Flagella	RS 1	RS 2	Flagella+RS1	Flagella+RS2
0 jam	0.71	0.40	2.40	0.33	0.55	0.84	1.02
12 jam	0.74	0.43	3.04	0.51	0.65	0.73	0.90
24 jam	0.53	0.32	1.10	0.43	0.34	0.69	1.13

Lampiran 6. Hasil Perhitungan Total Fenol Daun Tanaman Tembakau

Waktu Pengambilan sample	mg/g						
	Air seteril	Tanaman sehat	Flagella	RS 1	RS 2	Flagella+RS1	Flagella+RS2
0 jam	29.36	17.12	19.01	20.05	15.76	14.54	14.73
12 jam	36.16	19.71	18.62	26.81	17.04	21.78	13.65
24 jam	21.70	27.60	14.68	22.69	10.17	16.99	20.20

Lampiran 7. Grafik standard Fenol Total yang digunakan**Lampiran 8. Grafik standard Bradford yang digunakan**