



**PEMANFAATAN LOGAM Ni DAN Zn UNTUK MENURUNKAN  
SIFAT VIRULENSI *Ralstonia solanacearum* MELALUI  
MEKANISME *QUORUM QUENCHING***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**Muhammad Sholehuddin  
NIM. 131510501022**

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



**PEMANFAATAN LOGAM Ni DAN Zn UNTUK MENURUNKAN  
SIFAT VIRULENSI *Ralstonia solanacearum* MELALUI  
MEKANISME *QUORUM QUENCHING***

**SKRIPSI**

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

Oleh

**Muhammad Sholehuddin  
NIM. 131510501022**

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

## PERSEMBAHAN

Dengan memanjatkan puji syukur kehadiran Allah Subhanahu wa ta'ala, skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Drs. Budi Hartono dan Ibu Dwi Ratna Sulistijani, S.H., kuhaturkan terimakasih tak terhingga atas segala pengorbanan, kasih sayang, dukungan, bimbingan serta do'a yang selalu dipanjatkan yang mungkin tidak dapat terbalaskan dengan apapun;
2. Kakak-kakak dan adik-adikku, Mbak Laily, Mas Ghani, Faris, Aida, Aat, Opang dan Ading yang selalu menemani dan mendukung saya;
3. Bapak Ibu guru saya yang telah mendidik saya dari jenjang TK, SD, SMP, SMA dan Bapak Ibu dosen pada jenjang perkuliahan. Tanpa bapak ibu guru dan dosen, saya mungkin hanyalah jasad yang tak berarti apa-apa..

**MOTTO**

خَيْرُ النَّاسِ أَنْفَعُهُمْ لِلنَّاسِ

“Sebaik-baik manusia adalah orang paling bermanfaat bagi orang lain”

(HR. Thabrani)

Tak ada satupun langkah tanpa makna  
yang tak bermakna hanya dia yang tak berani melangkah  
Yakinlah ada Allah disetiap langkahmu



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Muhammad Sholehuddin

NIM : 131510501022

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul: **“Pemanfaatan Logam Ni dan Zn Untuk Menurunkan Sifat Virulensi *Ralstonia solanacearum* Melalui Mekanisme *Quorum Quenching*”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali disebutkan sumbernya dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakkan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 18 Januari 2018  
Yang menyatakan

Muhammad Sholehuddin  
NIM. 131510501022

**SKRIPSI**

**PEMANFAATAN LOGAM Ni DAN Zn UNTUK MENURUNKAN  
SIFAT VIRULENSI *Ralstonia solanacearum* MELALUI  
MEKANISME *QUORUM QUENCHING***

Oleh

**Muhammad Sholehuddin  
NIM. 131510501022**

**Pembimbing:**

Pembimbing Utama

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

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “**Pemanfaatan Logam Ni dan Zn Untuk Menurunkan Sifat Virulensi *Ralstonia solanacearum* Melalui Mekanisme *Quorum Quenching***” telah diuji dan disahkan pada:

Hari : Senin

Tanggal : 29 Januari 2018

Tempat : Fakultas Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama,

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

Dosen Penguji Utama,

Dosen Penguji Anggota,

Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D.  
NIP. 195212171980032001

Dr. Ir. Sugeng Winarso, M.Si.  
NIP. 196403221989031001

Mengesahkan

Dekan,

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

## RINGKASAN

**Pemanfaatan Logam Ni dan Zn Untuk Menurunkan Sifat Virulensi *Ralstonia solanacearum* Melalui Mekanisme *Quorum Quenching*.** Muhammad Sholehuddin, 131510501022. Program Studi Agroteknologi; Fakultas Pertanian; Universitas Jember.

Penyakit layu yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* merupakan salah satu penyakit utama yang sulit dikendalikan. *R. solanacearum* yang digunakan dalam penelitian ini diisolasi dari tanaman terong dan termasuk dalam ras 1 biovar 3. *R. solanacearum* mampu memproduksi ekstrapolisakarida dan enzim pendegradasi dinding sel seperti endoglukanase ketika populasi bakteri telah mencapai *quorum sensing*. Mekanisme *quorum sensing* mampu dihambat dengan sebuah mekanisme yang disebut *quorum quenching*. Di samping itu, terdapat beberapa penelitian yang menunjukkan bahwa ion Ni dan Zn mampu menghambat *quorum sensing* pada beberapa bakteri. Oleh karena itu diduga bahwa Ni dan Zn mampu menghambat *quorum sensing* pada bakteri *R. solanacearum*.

Uji produksi EPS dilakukan dengan pendekatan sentrifugasi. Hasil uji menunjukkan bahwa ion Ni dan Zn mampu mengurangi jumlah produksi EPS sebanyak 40% dibandingkan dengan kontrol. Uji aktifitas enzim endoglukanase dilakukan dengan pendekatan *spot assay* pada media padat yang mengandung selulosa. Hasil uji menunjukkan bahwa ion Ni dan Zn mampu menghambat aktifitas enzim endoglukanase. Aktifitas dari enzim endoglukanase diindikasikan dengan munculnya *plaque* transparan pada media yang ditetesi bakteri. Semakin tinggi konsentrasi logam yang diaplikasikan menunjukkan semakin rendah aktifitas enzim, sedangkan aktifitas enzim pada perlakuan kontrol tetap terjadi.

Aktifitas flagella diamati dengan cara mengamati diameter dari pertumbuhan bakteri pada media padat CPGA, lalu protein flagela diisolasi dan diamati menggunakan elektroforesis SDS page. Kemampuan gerak *R. solanacearum* berkurang secara signifikan ketika bakteri telah memasuki kerapatan *quorum sensing*. Perlakuan Ni dan Zn mampu mempertahankan kemampuan gerak



bakteri yang ditunjukkan dengan diameter koloni bakteri yang tumbuh dan munculnya protein flagela (31 kDa) pada elektroforesis SDS page.

Bisa disimpulkan bahwa ion Ni dan Zn bisa menurunkan sifat virulensi bakteri dengan cara memperpanjang fase planktonik tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Hal ini menunjukkan bahwa Ni dan Zn bisa menjadi agen *quorum quenching* yang bisa menghambat mekanisme *quorum sensing* bakteri *R. solanacearum*.



## SUMMARY

**Utilization of Ni and Zn Metals to Reduce the Virulence of *Ralstonia solanacearum* by Quorum Quenching Mechanism.** Muhammad Sholehuddin, 131510501022. Agrotechnology Studies program; Faculty of Agriculture; University of Jember.

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of important disease which is difficult to control. *R. solanacearum* isolated from eggplant belong to race 1 biovar 3 was used in this experiment. *R. solanacearum* is able to produce extrapollysaccharides (EPS) and cell wall degrading enzyme while the population of the bacteria reach the quorum sensing. The quorum sensing mechanism can be inhibited by another mechanism named quorum quenching. On the other hand, there was some research showed that metal ions such as Ni and Zn is able to inhibit quorum sensing in some bacteria. Therefore, it was hypothesized that the use of Ni and Zn ions can inhibit quorum sensing in *R. solanacearum*.

EPS production test conducted by centrifugation principle. The result of the test shows that Ni and Zn ions was able to reduce the amount of EPS production by 40% compared by control. The endoglucanase activity test conducted by spot assay method on the solid medium containing cellulose. The result showed that Ni and Zn also able to inhibit the activity of endoglucanase enzyme which is indicated by the transparent plaque on the spotted solid medium. The higher concentration of the ions showed a lower activity of the enzyme while the activity of the endoglucanase on the control medium still presence.

The flegella motility was observed by the diameter of the bacterial growth on CPGA solid medium then the flagella isolated and observed by SDS page electrophoresis. The flagella motility stalled while the *R. solanacearum* population reach the *quorum sensing*. The use of Ni and Zn ions maintain the flagella motility. It is showed by the growth appearance difference on the solid medium and by the appearance of the protein flagella (31 kDa) on the SDS page.

It was concluded that Ni and Zn ions were able to decrease the virulence factor by extend the planktonic phase without any effect to the bacterial growth. It

means that Ni and Zn is can be the quorum quenching agent which can interrupt the quorum sensing mechanism of *R. solanacearum*.



## PRAKATA

Puji syukur kehadirat ALLAH S.W.T. yang senantiasa melimpahkan rahmat dan maghfirah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah yang berjudul “Pemanfaatan Logam Ni dan Zn Untuk Menurunkan Sifat Virulensi *Ralstonia solanacearum* Melalui Mekanisme *Quorum Quenching*”. Penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu penyusunan karya ilmiah tertulis ini, yaitu:

1. Hardian Susilo Addy, SP., MP., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Utama yang telah memberikan bimbingan dan dukungan dalam penyusunan karya tulis ini.
2. Prof. Ir. Wiwiek Sri Wahyuni, MS., Ph.D. dan Dr. Ir. Sugeng Winarso., M.Si. selaku Dosen Penguji 1 dan Dosen Penguji 2 yang telah memberikan evaluasi, saran dan masukan demi kesempurnaan karya tulis ini.
3. Dr. Ir. Parawita Dewanti, MP. selaku Dosen Pembimbing akademik yang telah memberikan bimbingan, dukungan dan nasihat selama proses perkuliahan.
4. Prof. Dr. Bambang Sugiarto, M.Agr.Sc selaku Ketua CDAST yang telah membantu dan memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST.
5. Rekan kerja, Guruh Surastomo, Agnes Rezkyta Herwang Dani, Angga Aditya, Gerda Permata Aji, Ifa Sulistiyorini dan Bakteriofag team, serta keluarga besar CDAST yang selalu membantu, menemani dan memberi masukan.
6. Teman-teman seperjuangan di Program Studi Agroteknologi 2013, Imagro, LPMP Plantarum dan Formatani.

Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun dari pembaca guna penyempurnaan karya ilmiah tertulis ini. Akhirnya penulis berharap, semoga tulisan ini dapat bermanfaat. Terima kasih.

Jember, 18 Januari 2018

**Penulis**

DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PEMBIMBING</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>SUMMARY</b> .....	x
<b>PRAKATA</b> .....	xi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>2.1. Latar Belakang</b> .....	1
<b>2.2. Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>2.3. Tujuan</b> .....	3
<b>2.4. Manfaat</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1. <i>Ralstonia solanacearum</i></b> .....	4
2.1.1. Karakteristik <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	4
2.1.2. <i>Quorum Sensing</i> pada <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	5
2.1.3. Struktur dan Fungsi Gen <i>phcA</i> .....	6
2.1.4. <i>Quorum Quenching</i> .....	7
<b>2.2. Potensi Logam Zinc (Zn) dan Nickel (Ni) Sebagai Agen</b> <b><i>Quorum Quenching</i></b> .....	7
2.2.1. Zinc.....	8
2.2.2. Nickel (Ni).....	9
<b>2.3. Hipotesis</b> .....	9

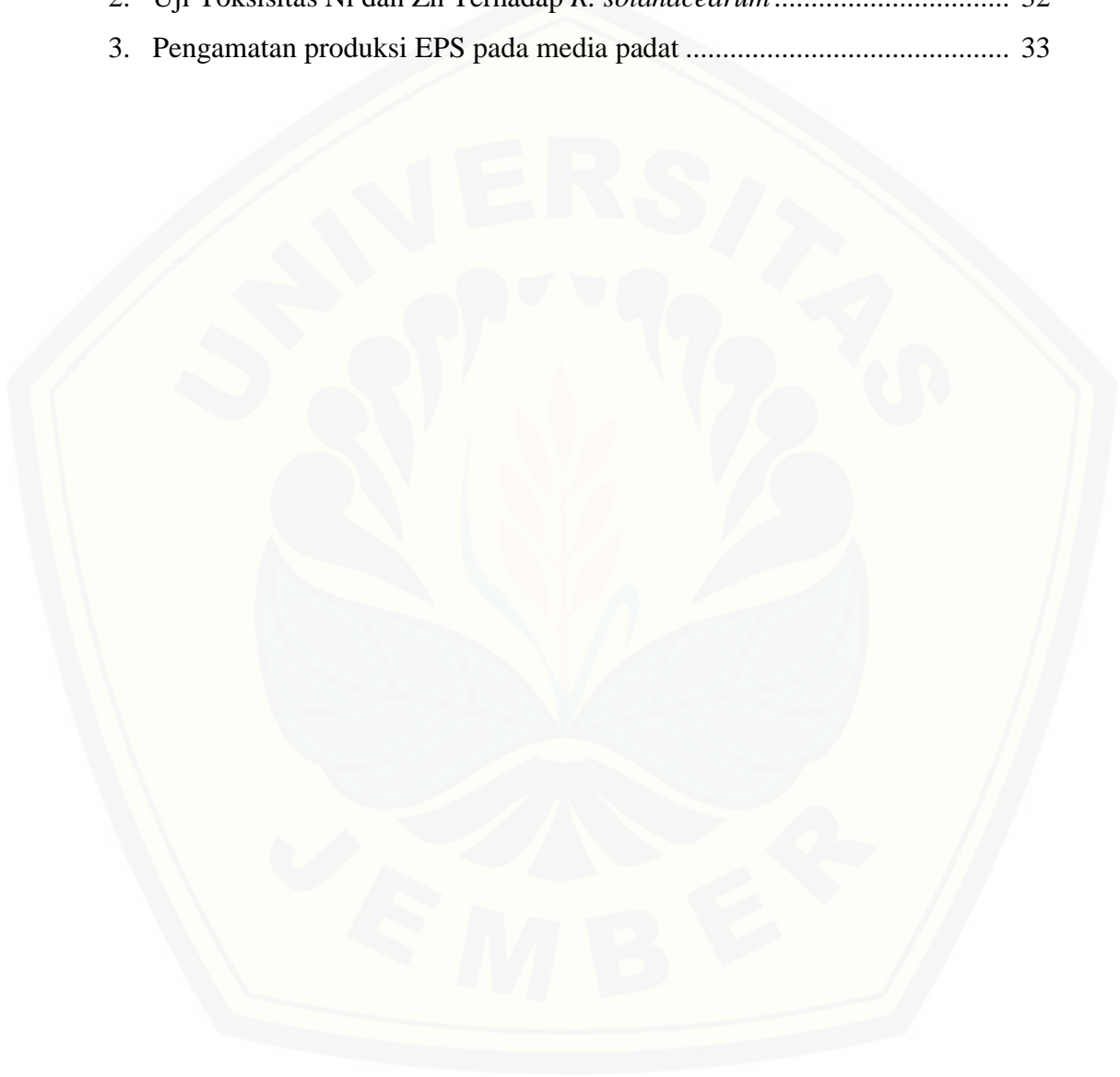
<b>BAB 3. METODE PENELITIAN</b> .....	10
<b>3.1. Waktu dan Tempat</b> .....	10
<b>3.2. Persiapan Penelitian</b> .....	10
3.2.1. Pembuatan Larutan Logam Ni dan Zn .....	10
3.2.2. Peremajaan <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	10
<b>3.3. Pelaksanaan Riset</b> .....	11
3.3.1. Prosedur Penelitian.....	11
3.3.1.1. Pengujian Pengaruh Ni dan Zn Terhadap Pertumbuhan Bakteri.....	11
3.3.2. Variabel Pengamatan.....	11
3.3.2.1. Pengamatan Produksi EPS (Ekstrapolisakarida). 11	
3.3.2.2. Pengamatan Produksi Enzim Pendegradasi Dinding Sel (enzim endoglukanase) .....	12
3.3.2.3. Pengamatan Pengaruh Ni dan Zn terhadap pertumbuhan <i>R. solanacearum</i> pada media agar. 13	
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	15
<b>4.1. Hasil</b> .....	15
4.1.1. Peremajaan dan uji virulensi <i>Ralstonia solanacearum</i> .....	15
4.1.2. Pengujian Pengaruh Ni dan Zn Terhadap Pertumbuhan Bakteri.....	16
4.1.3. Pengujian Pengaruh Ni dan Zn Terhadap Produksi EPS (Ekstrapolisakarida).....	17
4.1.4. Pengamatan Produksi Enzim Pendegradasi Dinding Sel (enzim endoglukanase).....	18
4.1.5. Pengaruh Ni dan Zn terhadap pertumbuhan <i>R. solanacearum</i> pada media agar.....	19
<b>4.2. Pembahasan</b> .....	21
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....	27
<b>5.1. KESIMPULAN</b> .....	27
<b>5.2. SARAN</b> .....	27
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	28

**DAFTAR GAMBAR**

4.1	Penampakan morfologis koloni <i>Ralstonia solanacearum</i> berusia 24 jam pada media padat CPGA mengandung TZC 0,005% .....	15
4.2	Kurva peningkatan populasi bakteri <i>R. solanacearum</i> pada media cair CPG murni dan CPG mengandung berbagai konsentrasi NiCl <sub>2</sub> (A) dan ZnSO <sub>4</sub> (B) dengan waktu inkubasi 48 jam. ....	16
4.3	NiCl <sub>2</sub> dan ZnSO <sub>4</sub> menurunkan produksi ekstrapolisakarida secara kuantitatif (mg/ml kultur berusia 4 hari) .....	17
4.4	Penampakan zona bening pada media CPGA (A), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 30 ppm (B), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 40 ppm (C), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 50 ppm (D), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 75 ppm (E), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 100 ppm (F), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 125 ppm (G) sebagai indikasi terdegradasinya selulosa pada media akibat aktifitas enzim endoglukanase setelah ditambahkan cat <i>congo red</i> 0,1% tanpa asam asetat. ....	18
4.5	Penampakan zona bening pada media CPGA (A), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 30 ppm (B), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 40 ppm (C), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 50 ppm (D), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 75 ppm (E), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 100 ppm (F), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 125 ppm (G) sebagai indikasi terdegradasinya selulosa pada media akibat aktifitas enzim endoglukanase setelah ditambahkan cat <i>congo red</i> 0,1% dan ditambahkan asam asetat 5% .....	19
4.6	Penampakan pertumbuhan bakteri pada media padat CPGA (A), CPGA + ZnSO <sub>4</sub> 125 ppm (B), CPGA + NiCl <sub>2</sub> 50 ppm (C).....	18
4.7	Hasil elektroforesis protein flagella <i>R. solanacearum</i> dengan beberapa perlakuan logam pada usia kultur 18 jam .....	22

**DAFTAR LAMPIRAN**

1. Pembuatan Larutan Logam  $\text{NiCl}_2$  dan  $\text{ZnSO}_4$ . ..... 32
2. Uji Toksisitas Ni dan Zn Terhadap *R. solanacearum* ..... 32
3. Pengamatan produksi EPS pada media padat ..... 33





## BAB 1. PENDAHULUAN

### 2.1. Latar Belakang

*Ralstonia solanacearum* merupakan bakteri penyebab penyakit layu yang banyak menyerang berbagai tanaman (Suryadi dan Machmud, 2002). Bakteri *R. solanacearum* mampu menginfeksi akar melalui luka yang terjadi secara tidak langsung ataupun luka karena tusukan nematoda akar. (Ratmawati, 2013). Bakteri *R. solanacearum* memiliki kisaran inang yang cukup luas, yaitu lebih dari 200 spesies dari 53 famili yang berbeda di dunia mampu terserang oleh patogen ini (Setyari *et al.*, 2013).

Tanaman penting yang menjadi inang bakteri *R. solanacearum* yaitu tomat, tembakau, pisang, kentang, kacang tanah, dan sebagainya (Poussier *et al.*, 2003). Patogen ini dapat menurunkan produksi, serta menimbulkan kematian cukup besar pada tanaman sehingga kerugian hasil mencapai 60 – 80% (Nasrun *et al.*, 2007). Penggunaan pestisida yang berlebih menimbulkan dampak negatif bagi lingkungan, kesehatan, sosial dan ekonomi. Salah satu dampak penggunaan pestisida yang berlebih ialah timbulnya resistensi OPT (BPTS, 2013).

*R. solanacearum* memiliki dua sifat yang berbeda yang ditentukan oleh tingkat kerapatan bakteri. Ketika bakteri berada pada kerapatan dibawah  $1 \times 10^7$  CFU/ml, bakteri bersifat planktonik, sedangkan ketika bakteri mencapai kerapatan  $1 \times 10^7$  CFU/ml, bakteri akan berubah sifat menjadi patogenik yang berbahaya bagi tanaman (Mori, 2015). Ekspresi dari faktor virulensi *R. solanacearum* dikendalikan berdasarkan kondisi lingkungan, keberadaan sel inang, dan kerapatan populasi bakteri melalui mekanisme *quorum sensing* (Schell, 2000).

*Quorum sensing* merupakan mekanisme komunikasi antar sel yang terjadi antar bakteri. *Quorum sensing* memicu bakteri melakukan respon ataupun perubahan aktifitas fisiologis berdasarkan tingkat kerapatan populasi bakteri (Umesha dan Shivakumar, 2013). Menurut (Tinaz, 2013) banyak penelitian yang menemukan bahwa banyak dari bakteri patogenik menggunakan mekanisme *quorum sensing* sebagai pemicu dalam memproduksi faktor-faktor patogenesis

dan virulensi dari bakteri. Sistem ini berpotensi untuk dikembangkan dan menjadi pengganti antibiotik untuk mengendalikan patogen.

Eksresi gen penyebab virulensi pada bakteri *R. solanacearum* dikendalikan oleh *quorum sensing* melalui jaringan pengatur yang sangat kompleks, dimana jaringan tersebut diatur oleh aktifitas protein aktifator PhcA (Clough *et al.*, 1997). Gen *phcA* secara langsung maupun tidak langsung menyandi beberapa faktor virulensi seperti EPS, enzim pendegradasi dinding sel, dan pergerakan bakteri. Aktifitas gen *phcA* diatur oleh mekanisme *quorum sensing* sebagai respon dari kerapatan bakteri yang melibatkan molekul *autoinducer* spesifik 3-OH-PAME (Genin *et al.*, 2005).

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa beberapa bentuk logam termasuk besi dan zinc (Zn) mampu mengendalikan aktifitas metabolisme bakteri dan produksi biofilm dengan cara menghambat mekanisme *quorum sensing*. Penghambatan mekanisme *quorum sensing* ini disebut *quorum quenching* (Jin, 2014). Beberapa penelitian juga telah membuktikan bahwa nickel (Ni) mampu menghambat *quorum sensing* tanpa mempengaruhi perkembang-biakan bakteri dengan cara menghambat sintesis acyl-homoserine lactone (AHL). AHL merupakan molekul yang berperan sebagai autoinducer universal sebagai senyawa komunikasi antar bakteri dalam mekanisme *quorum sensing* (Leticia, 2014).

Berdasarkan latar belakang tersebut, perlu dilakukan penelitian mengenai molekul logam yang dapat menghambat mekanisme *quorum sensing* dari *R. solanacearum*, sehingga molekul tersebut bisa digunakan untuk mempengaruhi perubahan sifat *R. solanacearum* dari planktonik menjadi patogenik. Beberapa literatur menyebutkan bahwa molekul logam zinc (Zn) dan nickel (Ni) dapat mempengaruhi mekanisme *quorum sensing* tanpa menghambat pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu perlu diteliti mengenai kemampuan logam Ni dan Zn dalam mempertahankan sifat planktonik dan menunda perubahan sifat *R. solanacearum* menjadi patogenik.

## 2.2. Rumusan Masalah

Bakteri *R. solanacearum* merupakan bakteri penyebab layu pada banyak tanaman di dunia. Perubahan sifat dari planktonik menjadi patogenik pada *R. solanacearum* dikendalikan oleh keberadaan gen *phcA* melalui mekanisme *quorum sensing*. Aktifitas gen *phcA* dapat diatur dengan memotong komunikasi antar bakteri melalui *quorum quenching* menggunakan molekul logam. Untuk itu dapat dirumuskan masalah dari penelitian ini adalah bagaimana kemampuan logam Ni dan Zn dalam mempertahankan sifat planktonik *R. solanacearum*?

## 2.3. Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan logam Ni dan Zn dalam mempertahankan sifat planktonik *R. solanacearum*.

## 2.4. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memperoleh pembuktian mengenai kemampuan logam Ni dan Zn dalam mempertahankan sifat planktonik *R. solanacearum*, sehingga logam Ni dan Zn ini nantinya bisa menjadi bahan alternatif untuk mengendalikan patogen.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. *Ralstonia solanacearum*

#### 2.1.1. Karakteristik *Ralstonia solanacearum*

*R. solanacearum* merupakan bakteri yang bersifat gram negatif. Bakteri ini berbentuk batang dengan ukuran  $0,5 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$ , dapat bergerak dengan satu atau beberapa flagela, aerobik, dapat mereduksi nitrat dan memproduksi amonia. *R. solanacearum* diklasifikasikan menjadi Ras berdasarkan perbedaan kisaran inang dan Biovar berdasarkan sifat biokimia (penggunaan sumber karbon) (Aini, 2007). Secara umum, koloni virulen dan non virulen bakteri *R. solanacearum* berbeda. Pada media TZC, bakteri yang virulen menunjukkan bentuk koloni tidak beraturan, berlendir warna merah muda dibagian tengah, dan dikelilingi oleh lendir berwarna putih susu kotor dengan elevasi dari permukaan koloni sedikit konveks. Koloni yang non virulen berwarna merah, tidak berlendir, bulat, dan elevasi agak menonjol (Gunawan, 2006).

Ada beberapa cara untuk mendeteksi dan mengidentifikasi keberadaan patogen *R. solanacearum*. Cara tersebut diantaranya pengujian secara tradisional, melalui uji serologi, dan pengujian berbasis asam nukleat (Denny, 2007). Pengujian secara tradisional bisa dilakukan dengan memotong batang tanaman yang terserang penyakit kemudian dicelupkan pada air. Permukaan batang yang telah dipotong khususnya pada jaringan pembuluh akan mengeluarkan lendir yang berwarna putih susu (Suryadi *et al.*, 2009). Pengujian berbasis asam nukleat digunakan untuk mendeteksi *R. solanacearum* dengan mengandalkan primer PCR yang ditargetkan ke sequence nukleotida patogen. PCR dapat mendeteksi baik sel-sel yang hidup ataupun mati, karena DNA dapat tetap utuh untuk waktu yang lama setelah kematian sel. (Denny, 2007).

*R. solanacearum* masuk dan menginfeksi melalui luka-luka di bagian akar, termasuk luka yang disebabkan nematoda atau organisme lain. Selanjutnya bakteri masuk ke jaringan tanaman bersama unsur hara dan air secara difusi dan menetap di pembuluh xilem dalam ruang antar sel (Nawangsih, 2006). Bakteri memperbanyak diri di dalam pembuluh xilem (Agrios, 2005), dan merusak sel-sel

tanaman yang ditempatinya tersebut sehingga pengangkutan air dan zat-zat makanan terganggu oleh massa bakteri dan sel-sel pembuluh xilem yang hancur (Nawangsih, 2006). Hancurnya sel-sel tanaman tersebut karena bakteri mengeluarkan enzim penghancur dinding sel tanaman yang mengandung selulosa dan pektin yang dikenal dengan nama enzim selulase dan pektinase. Akibat dari serangan ini, proses translokasi air dan nutrisi menjadi terganggu, sehingga tanaman menjadi layu dan mati (Agrios, 2005).

#### 2.1.2. *Quorum Sensing* pada *Ralstonia solanacearum*

Sudah diketahui secara luas bahwa bakteri dalam berkomunikasi dengan bakteri lainnya menggunakan molekul *autoinducer* sebagai sinyal. Molekul ini diproduksi dan dilepaskan ke lingkungan oleh bakteri itu sendiri. Molekul ini kemudian diidentifikasi oleh bakteri sebagai indikasi tingkat kerapatan populasi bakteri. Melalui sistem ini bakteri melakukan beberapa aktifitas sebagai respon dari tingkat kerapatan bakteri itu sendiri (Eberhard *et al.*, 1981). Beberapa spesies bakteri menggunakan mekanisme *quorum sensing* untuk meregulasi beberapa aktifitas biologis bakteri seperti produksi antibiotik, produksi faktor-faktor virulensi, produksi biofilm, dan beberapa metabolit sekunder lainnya (Kievit and Iglewski, 2000).

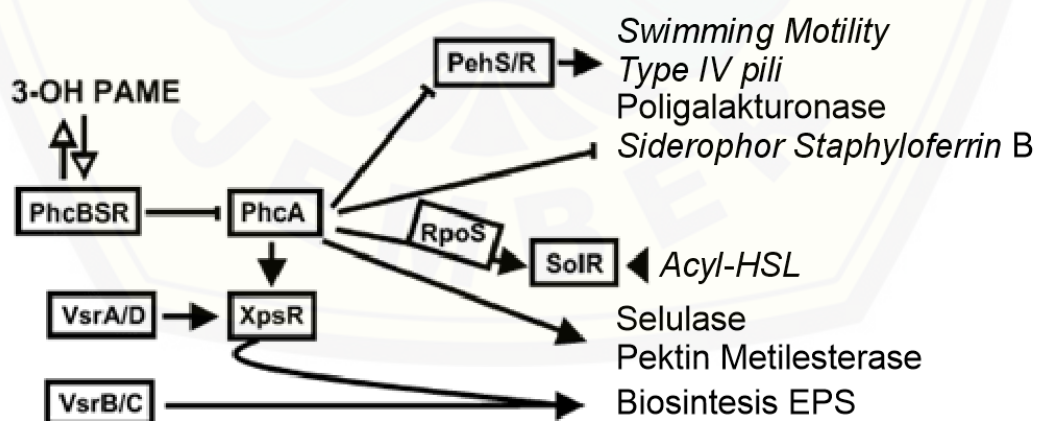
Banyak spesies bakteri memproduksi molekul *autoinducer* universal yang dapat diidentifikasi oleh banyak spesies bakteri. Molekul *autoinducer* universal tersebut adalah N-acyl-homoserine lactones (AHL). Pada kerapatan populasi rendah, AHL yang terproduksi akan larut dan terbawa aliran air dalam tanah. Bersamaan dengan peningkatan kerapatan populasi bakteri, molekul AHL akan terakumulasi hingga konsentrasi tertentu sehingga konsentrasi AHL tersebut akan diidentifikasi oleh reseptor bakteri untuk memicu beberapa aktifitas biologis bakteri (Minogue *et al.*, 2002).

Pada *R. solanacearum*, *autoinducer* 3-OH PAME digunakan sebagai sinyal untuk berkomunikasi antar sesama *R. solanacearum*. Pada konsentrasi 3-OH PAME yang rendah, gen *phcA* dalam bakteri tidak terekspresi sehingga membuat bakteri bersifat planktonik dengan ciri memiliki flagella dan memproduksi

poligalakturonase. Pada konsentrasi tinggi, gen *phcA* akan terekspresi dan memicu bakteri untuk berubah sifat menjadi patogenik yang dicirikan dengan terproduksinya ekstrapolisakarida (EPS), enzim pendegradasi dinding sel (enzim selulase dan enzim pektin metilesterase), dan faktor virulensi lainnya (Genin *et al.*, 2005).

### 2.1.3. Struktur dan Fungsi Gen *phcA*

Tingkat virulensi bakteri *R. solanacearum* ditentukan oleh beberapa factor virulensi. Faktor tersebut antara lain ekstrapolisakarida (EPS), flagel, enzim pendegradasi dinding sel tanaman (CWDEs), faktor virulensi lainnya, dan *autoinducer* dari faktor virulensi (Denny, 2007). Produksi dari faktor virulensi dipicu oleh mekanisme *quorum sensing*. Ketika telah mencapai *quorum sensing*, molekul *autoinducer* 3-OH PAME akan terikat dengan protein sensor (PhcS) sehingga terjadi proses defosforilasi terhadap protein regulator (PhcR). Terjadinya proses defosforilasi terhadap PhcR akan mengakibatkan PhcA (protein aktifator) aktif sehingga memicu terproduksinya faktor-faktor virulensi bakteri seperti EPS dan enzim endoglukanase. Aktifitas PhcA akan menginduksi terjadinya transkripsi gen *XpsR* yang akan bekerjasama dengan *VsrA/D* untuk mensintesis EPS (Gillings and Holmes, 2004).



Gambar 1. Jaringan pengatur faktor virulensi pada bakteri *R. solanacearum* (Genin *et al.*, 2005)

#### 2.1.4. *Quorum Quenching*

*Quorum quenching* merupakan mekanisme penghambatan sistem *quorum sensing* dari bakteri. *Quorum quenching* memiliki potensi besar sebagai pengganti antibiotik untuk mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh bakteri (Chen, 2013). *Quorum quenching* mengendalikan penyakit tidak dengan cara membunuh patogen, melainkan menghambat bakteri untuk berubah sifat menjadi patogenik dan mencegah bakteri untuk memproduksi faktor-faktor virulensi dari bakteri. Oleh karena itu, *quorum quenching* bisa menjadi alternatif pengendalian patogen yang tidak menimbulkan resistensi bakteri terhadap antibiotik, pencemaran lingkungan, dan ketidakseimbangan ekosistem akibat antibiotik (Rasmussen dan Givskov, 2006).

Jin, (2014) memaparkan bahwa beberapa bentuk logam termasuk besi dan zinc (Zn) mampu mengendalikan aktifitas metabolisme bakteri dan produksi biofilm melalui sistem penghambatan *quorum sensing* yang disebut *quorum quenching*. Beberapa penelitian juga telah membuktikan bahwa nickel (Ni) mampu menghambat *quorum sensing* tanpa mempengaruhi perkembang-biakan bakteri dengan cara menghambat sintesis acyl-homoserine lactone (AHL).

## 2.2. Potensi Logam Zinc (Zn) dan Nickel (Ni) Sebagai Agen *Quorum Quenching*

Tabel 1. Ambang batas cemaran logam dalam air irigasi, tanah, dan jaringan tanaman (WHO, 1993).

Unsur	Ambang Batas Kontaminan		
	Dalam Air Irigasi (ppm)	Dalam Tanah (ppm)	Dalam Tanaman (ppm)
As	0.10	20	-
Cd	0.01	3	0.1
Co	0.05	50	50.0
Cr	0.55	100	-
Cu	0.017	100	73.0
Fe	0.50	50000	425.0
Mn	0.20	2000	500.0
Ni	1.40	50	67.0
Pb	0.065	100	0.3
Se	0.02	10	-
Zn	0.20	300	100

### 2.2.1. Zinc

Zinc (Zn) merupakan salah satu unsur esensial yang dibutuhkan tanaman yang fungsinya tidak bisa digantikan oleh unsur lainnya. Fungsi Zn dalam tanaman adalah terlibat dalam beberapa fungsi enzim untuk meningkatkan reaksi-reaksi metabolik, sintesis senyawa-senyawa pertumbuhan tanaman, memproduksi klorofil dan karbohidrat. Tanaman menyerap Zn sebagian besar dalam bentuk kation divalen ( $Zn^{2+}$ ), tetapi pada pH tinggi mungkin diserap sebagai kation monovalen ( $ZnOH^+$ ). Zn juga terikat oleh asam organik selama pengangkutan didalam xilem atau dapat berpindah bebas seperti kation divalen (Havlin *et al.*, 2005)

Gejala keracunan Zn pada tumbuhan secara umum berupa klorosis pada daun muda, nekrosis pada daun yang akhirnya menyebabkan kematian daun. Pada akar, keracunan Zn akan mengurangi pertumbuhan akar utama maupun lateral (Harmens, 1993). Keracunan Zn akan menyebabkan perubahan pada tingkatan biokimia sel kemudian diikuti perubahan fisiologi pada tingkat individu hingga tingkat komunitas tanaman yang akan mengakibatkan terganggunya proses fotosintesis sehingga pembentukan klorofil menjadi terhambat (Fontes, 1995).

Menurut Vijayarengan dan Mahalakshmi (2013), pupuk Zn dibutuhkan oleh tanaman tomat untuk meningkatkan produksi tanaman tomat. Namun kadar Zn yang berlebihan dapat mengurangi produksi tomat. Tomat yang diberikan Zn dengan konsentrasi 150 ppm menunjukkan produksi yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol. Tomat dengan aplikasi Zn 50 ppm dan Zn 100 ppm menunjukkan hasil produksi yang lebih tinggi dari kontrol. WHO (1993) memberikan ambang batas kandungan Zn yang diperbolehkan dalam tanah pertanian sebesar 300 ppm. Sedangkan kandungan Zn dalam tanaman yang diperbolehkan tidak lebih dari 100 ppm.

Jin *et al.* (2014) menyebutkan bahwa  $Zn^{2+}$  dan ZnO mampu mengurangi produksi faktor virulensi dan pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tanpa mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangbiakan sel. Zn mempengaruhi aktifitas bakteri tersebut pada skala genetik yaitu mempengaruhi aktifitas regulator gen resistensi terhadap cobalt-zinc-cadmium *czcR*.



### 2.2.2. Nickel (Ni)

Pada tanaman tingkat tinggi, Nickel (Ni) adalah unsur yang dibutuhkan oleh tanaman. Ni dibutuhkan dalam proses metabolisme nitrogen. Kekurangan unsur Ni mengakibatkan rendahnya aktifitas enzim pengurai urea dan enzim pengurai nitrat lainnya. Hasilnya adalah terhambatnya sintesis protein dan penurunan kadar nitrogen dalam tanaman (Nadia *et al.*, 2007). Hasil penelitian Karagiannidis *et al.*, (2002) menunjukkan peningkatan produksi biomasa tomat sebesar 160%, peningkatan jumlah buah sebesar 169%, peningkatan berat buah sebesar 150%, dan peningkatan produksi buah sebesar 250% dibandingkan dengan kontrol. Tripathi dan Sadhna-Tripathi (2000) dalam penelitiannya menunjukkan bahwa Ni memberikan dampak positif pada pertumbuhan akar dan batang, luas penampang daun dan biomasa, klorofil, protein, karbohidrat dan gula dalam daun.

Penelitian Nadia *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa aplikasi pupuk Ni hingga konsentrasi 45 ppm mampu meningkatkan produksi biomasa tomat maupun kualitas buah tomat. Namun terjadi penurunan produksi dan kualitas buah tomat pada konsentrasi pupuk sebesar 60 ppm. WHO (1993) memberikan ambang batas kandungan Zn yang diperbolehkan dalam tanah pertanian sebesar 50 ppm.

Ni mampu mempengaruhi pembentukan biofilm pada bakteri *Burkholderia multivorans* dengan cara mempengaruhi sistem *quorum sensing*. Ni mempengaruhi *quorum sensing* dengan cara mempengaruhi produksi N-octanoyl-L-homoserine lactone (C8-HSL) yang merupakan salah satu senyawa *autoinducer* (Leticia *et al.*, 2014).

## 2.3. Hipotesis

Logam Ni dan Zn mampu mempengaruhi perubahan sifat dari planktonik menjadi patogenik pada bakteri *R. solanacearum*

### BAB 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat

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

#### 3.2. Persiapan Penelitian

##### 3.2.1. Pembuatan Larutan Logam Ni dan Zn

Larutan Stok 500 mM ZnSO<sub>4</sub> (Mr: 161) didapatkan dengan cara melarutkan padatan ZnSO<sub>4</sub> (Riedel de Haen, Hanover, Jerman) sebanyak 8,05 gr kedalam 100 ml air murni (H<sub>2</sub>O) dengan rumus  $M = n/v$ . Kemudian dari larutan stok dibuat larutan uji dengan konsentrasi ZnSO<sub>4</sub> 10.000 ppm m/v dengan prinsip pengenceran (1ppm = 1mg/l, 500mM ZnSO<sub>4</sub> = 80.500 ppm),

Larutan Stok 500 mM NiCl<sub>2</sub> (Mr: 129) didapatkan dengan cara melarutkan padatan NiCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Jerman) sebanyak 6,45 gr kedalam 100 ml air murni (H<sub>2</sub>O) dengan rumus  $M = n/v$ . Kemudian dari larutan stok dibuat larutan uji dengan konsentrasi NiCl<sub>2</sub> 10.000 ppm m/v dengan prinsip pengenceran (1ppm = 1mg/l, 500mM NiCl<sub>2</sub> = 64.500 ppm).

##### 3.2.2. Peremajaan *Ralstonia solanacearum*

Bakteri yang digunakan pada penelitian berasal dari stok koleksi Dr. Hardian Susilo Addy, SP., MP. yaitu *R. solanacearum* isolat DT3 yang diisolasi dari tanaman terong yang diketahui merupakan *R. solanacearum* dari Ras 1 Biovar 3. Bakteri kemudian diremajakan dengan cara menumbuhkan sebanyak 40µl isolat DT3 dalam media CPG (*Cassamino Pepton Glucose*) sebanyak 4 ml. Bakteri yang telah ditumbuhkan pada media CPG digojok dengan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 28° C.

Untuk melihat indikasi virulensi bakteri, bakteri *R. solanacearum* ditumbuhkan dengan metode *streak plate* di atas media padat dengan cara mengambil kultur bakteri yang ditumbuhkan pada media cair CPG selama 24 jam

diatas shaker dengan kecepatan 150 rpm. Kemudian kultur diambil dengan jarum ose lalu digoreskan pada media (CPGA + TZC 0,005%). Virulensi bakteri dilihat dari morfologi koloni yang terbentuk.

### **3.3. Pelaksanaan Riset**

#### **3.3.1. Prosedur Penelitian**

##### **3.3.1.1. Pengujian Pengaruh Ni dan Zn Terhadap Pertumbuhan Bakteri**

Pengujian pengaruh Ni dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media cair CPG murni, CPG + NiCl<sub>2</sub> 10 ppm, CPG + NiCl<sub>2</sub> 20 ppm, CPG + NiCl<sub>2</sub> 30 ppm, CPG + NiCl<sub>2</sub> 40 ppm dan CPG + NiCl<sub>2</sub> 50 ppm. Sedangkan pengujian pengaruh Zn dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media cair CPG murni, CPG + ZnSO<sub>4</sub> 50 ppm, CPG + ZnSO<sub>4</sub> 75 ppm, CPG + ZnSO<sub>4</sub> 100 ppm, CPG + ZnSO<sub>4</sub> 125 ppm, dan CPG + ZnSO<sub>4</sub> 150 ppm

Pengamatan pertumbuhan bakteri diamati menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sekali selama 48 jam. Sebelum dilakukan penghitungan nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer, kultur bakteri dipisahkan dengan pelarut dan seluruh metabolit terlarut untuk menghilangkan metabolit terlarut yang bisa mempengaruhi pembacaan nilai absorbansi. Pemisahan dilakukan dengan cara mensentrifugasi kultur cair pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Kemudian pelet diambil dan disuspesikan dengan 1 ml akuades.

#### **3.3.2. Variabel Pengamatan**

##### **3.3.2.1. Pengamatan Produksi Ekstrapolisakarida (EPS)**

Pengamatan produksi EPS secara morfologis dilakukan dengan cara menumbuhkan 2 µL kultur *R. solanacearum* diatas media CPGA murni, CPGA + NiCl<sub>2</sub> 50 ppm, dan CPGA + ZnSO<sub>4</sub> 125 ppm. Kemudian diinkubasi selama 48 jam. Setelah 48 jam, penampakan morfologis koloni diamati dari segi warna putih (lendir putih merupakan senyawa ekstrapolisakarida) yang terbentuk .

Produksi ekstrapolisakarida kemudian diamati secara kuantitatif. Isolasi ekstrapolisakarida (EPS) dilakukan menggunakan metode yang digunakan oleh

Ahmad *et al.* (2017). Sampel kultur berusia 4 hari diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm kemudian disetarakan nilai absorbansinya menggunakan pelarut CPG. Setelah sample divortex selama 1 menit, kemudian sampel disentrifugasi pada kecepatan 4.000 rpm pada suhu 4°C selama 20 menit. Supernatan kemudian diambil lalu disaring menggunakan membran filter dengan ukuran 0,22µm (kurabo). Kemudian supernatan yang telah disaring dicampurkan kedalam acetone 4°C dengan volume 4x volume supernatan. Inkubasi selama 12 jam pada suhu 4°C agar terjadi proses presipitasi. Kemudian dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan EPS (hasil presipitasi) dengan pelarutnya. Biomassa (pelet) yang dihasilkan kemudian dikeringkan menggunakan *dry block* pada suhu 55°C selama 2 jam. Berat tabung eppendorf berisi biomassa kemudian ditimbang dan dikurangi dengan berat tabung kosong untuk mendapatkan jumlah EPS dalam mili gram pada setiap satuan volume sampel.

#### 3.3.2.2. Pengamatan Produksi Enzim Pendegradasi Dinding Sel (enzim endoglukanase)

Metode pengamatan mengadopsi metode yang digunakan oleh Guererro *et al.* (2015). Pengamatan aktifitas enzim endoglukanase yang mampu mendegradasi selulase dilakukan diatas media padat CMC (*Carboxymethylcellulose*) yang mengandung selulosa sebanyak 0,2%. Kemudian kultur bakteri ditumbuhkan diatas media dengan cara meneteskan kultur berusia 24 jam sebanyak 2µl keatas media. Kemudian inkubasi pada suhu 28°C selama 4 hari. Untuk mengetahui aktifitas enzim endoglukanase media diberi pewarna *Congo red* (0.1%) setelah koloni bakteri dibersihkan sambil digojok diatas shaker dengan kecepatan 40 rpm selama 15 menit. Menurut Burianova *et al.*, (1991) untuk memperjelas zona bening yang terbentuk, keatas media bisa ditambahkan asam asetat 5% sebanyak 5ml selama 3 menit.

### 3.3.2.3. Pengamatan pengaruh Ni dan Zn terhadap pertumbuhan *R. solanacearum* pada media agar

Pengamatan penampakan pertumbuhan koloni *R. solanacearum* pada media agar dilakukan pada media CPGA dengan konsentrasi glukosa diturunkan sebanyak 50% dan konsentrasi agar sebanyak 0.8%. Kultur berusia 24 jam kemudian diteteskan sebanyak 2  $\mu$ l pada media agar dengan berbagai konsentrasi logam. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan untuk melihat aktifitas dari flagella bakteri yang ditunjukkan dengan lebar diameter dari koloni. Untuk mengkonfirmasi perbedaan aktifitas flagella, dilakukan uji dengan pendekatan SDS page terhadap produksi flagella pada masing-masing perlakuan.

Pengamatan perbedaan produksi flagella dengan pendekatan SDS page dilakukan menggunakan metode dari Malandrin dan Samson (1999). Kultur bakteri yang digunakan adalah kultur bakteri dengan kerapatan sekitar  $10^8$  (nilai absorbansi OD<sub>600</sub>= 1.0 ) yaitu kultur yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C diatas shaker dengan kecepatan 150 rpm pada media CPG dengan berbagai konsentrasi logam. 10 ml kultur kemudian diambil dan disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 10 menit. Supernatan dibuang dan pelet kemudian diambil dan disuspensikan ke dalam 5 ml buffer fosfat dengan konsentrasi 40 mM dengan pH 6,9. Suspensi kemudian divortex dengan kecepatan penuh selama 15 menit. Kemudian suspensi disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C selama 15 menit. Supernatan kemudian diambil dan disaring menggunakan membrane filter (Kurabo) dengan ukuran 0,45  $\mu$ l. Filtrat kemudian diultracentrifuge dengan kecepatan 35.000 rpm selama 2 jam dengan suhu 4°C. Supernatan dibuang lalu pelet diresuspensikan dengan 200mM Tris-HCl dengan pH 8,8 sebanyak 100  $\mu$ l, disimpan di suhu -20°C hingga siap proses elektroforesis.

Elektroforesis protein flagella dilakukan menggunakan metode SDS-Page. Pertama menyiapkan lower gel dan upper gel elektroforesis, kemudian sample protein flagella dicampur dengan loading dye dengan perbandingan 2:1 (40  $\mu$ l sample dengan 20  $\mu$ l loading dye). Campuran sample dan loading dye kemudian

dimasukkan kedalam gel elektroforesis bersama marker protein (Bio-Rad). Lalu jalankan mesin elektroforesis. Ukuran flagella bakteri *R. solanacearum* adalah 31 kDa (Malandrin, 1999).



## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa  $\text{NiCl}_2$  pada konsentrasi minimal 30 ppm serta  $\text{ZnSO}_4$  pada konsentrasi minimal 75 ppm mampu menurunkan produksi faktor-faktor virulensi dari bakteri *R. solanacearum* secara *in vitro* yaitu ekstrapolisakarida dan enzim endoglukanase. Selain itu juga mampu memperlama periode sifat planktonik *R. solanacearum* tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteri secara signifikan.

### 5.2. SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai bagaimana dampak penggunaan logam Ni dan Zn terhadap jaringan tanaman dan dampak terhadap lingkungan karena pada penelitian ini hanya dalam skala laboratorium.

## DAFTAR PUSTAKA

- Addy, H. S., A. Askora, T. Kawasaki, M. Fujie, dan T. Yamada. 2012. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by  $\phi$ RSM filamentous phages. *Bacteriology*. 102(5) : 469-477.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology 5th edition*. Amsterdam: Elseiver.
- Ahmad, A. Ali, M. J. Stulberg, J. P. Mershon, D. S. Mollov, Q. Huang. 2017. Molecular and biological characterization of  $\phi$ Rs551, a filamentous bacteriophage isolated from a race 3 biovar 2 strain of *Ralstonia solanacearum*. *Plos One*. 12(9) : 1-19.
- Aini, E.N. 2007. Efektifitas Beberapa Isolat *Bacillus* spp. dalam Menghambat *Ralstonia solanacearum* pada Cabai. *Skripsi*. Jember: Fakultas Pertanian Universitas Jember.
- Balai Penelitian Tanaman Sayur. 2013. *Pengelompokan Pestisida Berdasarkan Cara Kerja (Mode of Action)*. Bandung: BPTS Bandung.
- Buriavora, T., J. Kopečný, J. Sajdok, dan J. Kas. 1991. Assay of very low cellulolytic activity in fodder supplemented with enzyme preparation. *Animal feed Sciences and Technologies*. 33 : 41-48.
- Chen, Fang, Y. Gao, X. Chen, Z. Yu, dan X. Li. 2013. Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. *Molecular Science*. 14(9) : 17477–17500.
- Clough, S.J., K.E. Lee, M.A. Schell, dan T.P. Denny. 1997. A two component system in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* modulates production of *phcA*-regulated virulence factors in response to 3-hydroxypalmitic acid methyl ester. *Bacteriology*. 179(11) : 3639-3648.
- Denny, T. 2007. *Plant Pathogenic Ralstonia Species*. Georgia: University of Georgia.
- Eberhard, A., A. L. Burlingame, C. Eberhard, G. L. Kenyon, K. H. Nealson, dan N. J. Oppenheimer. (1981) structural identification of autoinducer of *Photobacterium Fischeri luciferase*. *Biochemistry*. 20: 2444–449.
- Fontes, R.L.F. dan F. R. Cox. 1995. Effects of sulfur supply on soybean plants exposed to zinc toxicity. *Journal of Plant Nutrition*. 18: 1893-1906
- Gillings M., dan A. Holmes. 2004. *Plant Microbiology*. Sydney : BIOS Scientific Publishers.



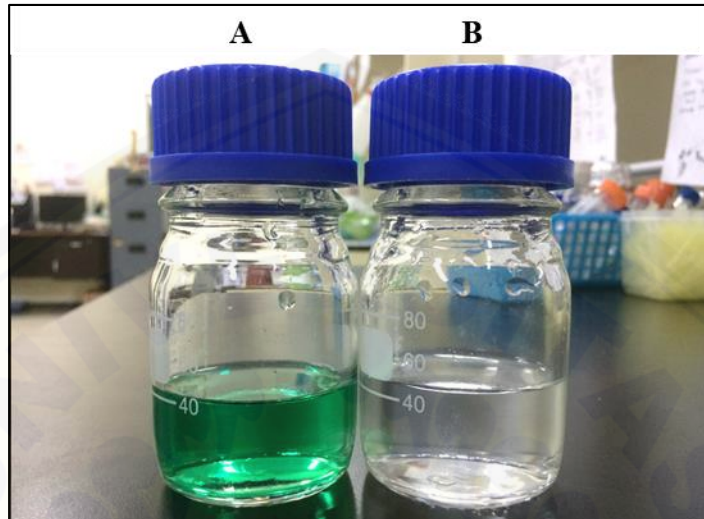
- Gunawan, O.S. 2006. Virulensi dan ras *Ralstonia solanacearum* pada pertanaman kentang di Kecamatan Pangalengan, Kabupaten Bandung, Jawa Barat. *Hortikultura*. 16 (3) : 211-218.
- Gutarra, Liliam, J. Herrera, E. Fernandez, J. Kreuze, dan H. L. Kreuze. 2017. Diversity, pathogenicity, and current occurrence of bacterial wilt bacterium *Ralstonia solanacearum* in peru. *Plant science*. 8 (1221) : 1-12.
- Harmens, H., Gusmao, P. R. D. Hartog, J.A.C. Verkeij, dan Ernst, W.H.O. 1993. Uptake and Transport of Zinc In Zinc-Sensitive and Zinc-Tolerant *Silene Vulgaris*. *Plant Physiology*. 141: 309-315.
- Havlin, L.J., S.L. Tisdale, J.G. Beaton, dan W.L. Nelson. 2005. *Soil Fertility and Fertilizer. An Intriduction to Nutrient Management, seventh edt.* New Jersey : Pearson Prentice Hall.
- Jin, H.L., Y. G. Kim, M. H. Cho, dan J. Lee. 2014. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. *Microbiology*. 169 : 888-896.
- Karagiannidis, N., N. Stavropoulos, dan K. Tsakelidou, 2002. Yield increase in tomato, eggplant and pepper using nickel in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 33(13/14): 2274-2285.
- Kievit, T.R., dan Iglewski, B.H. (2000) Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*. 68 : 4839-4849.
- Leticia, M. V., J. Mathieu., Y. Yang, B. H. Pyle, R. J. C. McLean, dan P. J. J. Alvarez. 2014. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. *Biodeterioration and Biodegradation*. 91 : 82-87.
- Malandrin, Laurance dan R. Samson. 1999. Serological and molecular size characterization of flagellins of *Pseudomonas syringae* pathovars and related bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 22 : 534-545.
- Minogue, T.D., M. W. Trebra, F. Bernhard, dan S. B Bodman. (2002) The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol*. 44: 1625-1635
- Miller, G. T., dan S. E. Spoolman. 2013. *Sustaining the Earth. 6<sup>th</sup> edition.* California: Thompson Learning
- Mohite, V. Bhavna, dan S. V. Patil. 2014. Investigation of bacterial cellulose biosynthesis mechanism in *Gluconoacetobacter hansenii*. *Microbiology*. 836083 : 1-7.

- Mori, Yuka, K. Inoue, K. Ikeda, H. Nakayashiki, C. Higashimoto, K. Ohnishi, A. Kiba, dan Y. Hikichi. 2015. The vascular plant-pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* produces biofilms required for its virulence on the surfaces of tomato cells adjacent to intercellular spaces. *Molecular Plant Pathology*. 17(6) : 890-902
- Nadia, Gad, M. H. El-Sherif, dan N. H. M. El-Gereedly. 2007. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. *Basic and Applied Science*. 1(3) : 286-293.
- Nasrun, Christanti, T. Arwiyanto, dan I. Mariska. 2007. Karakteristik fisiologis *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu bakteri nilam. *Litri*. 13(2) : 43-48.
- Nawangsih, A. A. 2006. Seleksi dan Karakterisasi Bakteri Biokontrol untuk Mengendalikan Penyakit Layu Bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tomat. Disertasi. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Poussier, S., P. Thoquet, D.T. Demery, S. Barthet, D. Meyer, M. Arlat, dan 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*. 3(3) : 1-15.
- Rasmussen, T., dan M. Givskov. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *Medical microbiology*. 296(2-3) : 149-161
- Ratmawati, I. 2013. *Mengenal Lebih Dekat Penyakit Layu Bakteri Ralstonia solanacearum pada Tembakau*. Jakarta : POPT Perkebunan.
- Saile, Elke, J. A. McGarvey, M. A. Shell, dan T. P. Denny. 1997. Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Bacteriology*. 87 (12) : 1264-1271.
- Schell, M.A. (2000) Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Phytopathol*. 38, 263-292.
- Setyari, A.R., L.Q. Aini, dan A.L. Abadi. 2013. Pengaruh pemberian pupuk cair terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *HPT*. 1(2) : 80-87.
- Suryadi, Y., dan M. Machmud. 2002. Keragaman genetik strain *Ralstonia solanacearum* berdasarkan karakterisasi menggunakan teknik berbasis asam nukleat. *Agrobio*. 15(2) : 59-66.
- Suryadi, Y., I. Manzila, dan M. Machmud. 2009. Potensi pemanfaatan perangkat diagnostik ELISA serta variannya untuk deteksi patogen tanaman. *AgroBiogen*. 5 (1) : 39 – 48.

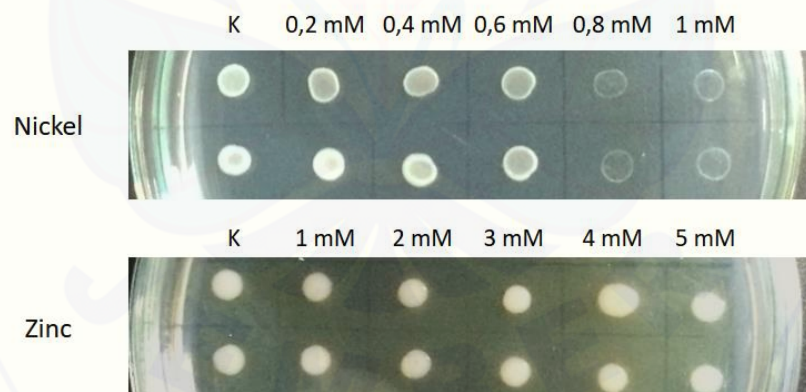
- Tinaz, G. B. 2013. Disruption of bacterial cell-to-cell communication (quorum sensing): a promising novel way to combat bacteria-mediated diseases. *Health Science*. 3(3) : 159-163.
- Tripathi, A.K. dan S. Tripathi. 2000. Changes in some physiological and biological characters in *Albizia lebbek* as bio-indicators of heavy metals. *Botany*. 40 : 421-430.
- Umesha, S., dan J. Shivakumar. 2013. Bacterial quorum sensing and its application in biotechnology. *Pharmaceutical Biology Science*. 4(2) : 850-861.
- Vatanparast, Mohammad, V. Hosseiniaveh, M. Ghadamyari, dan S. M. Sajjadian. 2014. Plant cell wall degrading enzymes, pectinase and cellulase, in the digestive system of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (coleoptera: curculionidae). *Plant Protection Science*. 50(4) : 190-198.
- Vijayarengan, P. dan G. Mahalakshmi. 2013. Zinc Toxicity in Tomato Plants. *Applied Sciences*. 24(5) : 649-653.
- Volk dan Wheeler. 1990. *Basic Microbiology. Fifth Edition*. New York: Joanna Cotler Books. Terjemahan S. Adisumartono. *Mikrobiologi Dasar*. Edisi Kelima. 2000. Jakarta: Erlangga.
- Wang D., dan C. A. Fierke. (2013). The BaeSR regulon is involved in defense against zinc toxicity in *E. coli*. *Metallomic*. 5 : 372–383
- World Health Organization. 1993. *Standard maxima for metals in Agricultural soils*.

**LAMPIRAN**

## 1. Pembuatan Larutan Logam Ni dan Zn

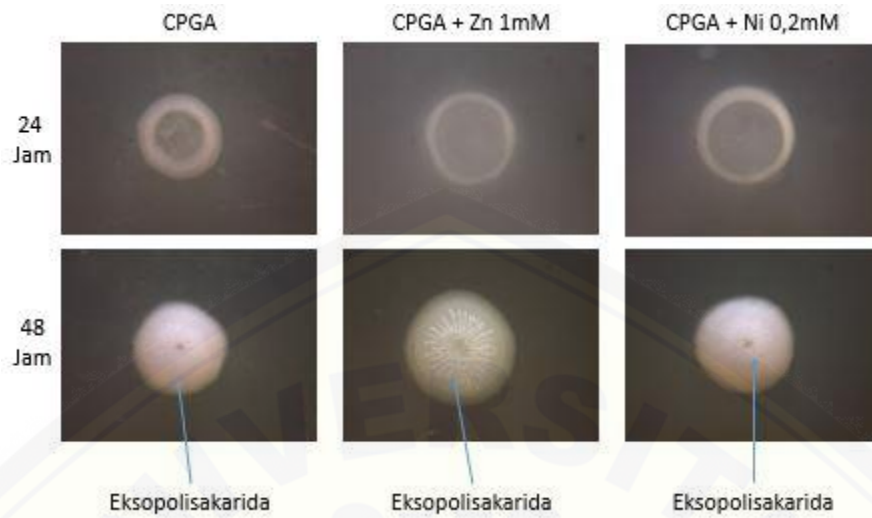
Larutan  $\text{NiCl}_2$  10.000 ppm (A) dan  $\text{ZnSO}_4$  10.000 ppm (B)

## 2. Uji Toksisitas Ni dan Zn terhadap Bakteri



Penampakan Morfologis *R. solanacearum* pada media agar dengan perlakuan inkubasi pada air steril mengandung logam

## 3. Pengamatan produksi EPS pada media padat



Penampakan Morfologis *R. solanacearum* pada media agar yang menunjukkan indikasi perbedaan produksi EPS