



**DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum*
DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A**

TESIS

Oleh

**MOH.MIFTAH FARID.MS
NIM 162520101004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI
PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum*
DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Bioteknologi (S2) dan mencapai gelar Magister Bioteknologi

Oleh

**MOH.MIFTAH FARID.MS
NIM 162520101004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI
PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum*
DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A**

TESIS

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Bioteknologi (S2) dan mencapai gelar Magister Bioteknologi

Oleh

**MOH.MIFTAH FARID.MS
NIM 162520101004**

**PROGRAM STUDI MAGISTER BIOTEKNOLOGI
PASCASARJANA
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan syukur Alhamdulillah dan segala kerendahan hati, tesis ini saya persembahkan kepada :

1. Orang tua tercinta, Bapak H.Salamun Almaliki dan Ibu Siti Maria serta Bapak R.Mustofa serta Ibu Maisaroh serta sanak keluarga atas dukungan moral, kasih sayang yang telah diberikan.
2. Istri tercinta Nurus Sholihah S.Pd dan putra tersayang Fihri Ahmad Aljabar atas dukungan dan kesabaran didalam menemani proses studi lanjut (S2)
3. Seluruh dosen Program Studi Bioteknologi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan wawasan selama proses belajar dengan penuh kesabaran.
4. Almamater Program Studi Bioteknologi Universitas Jember yang saya banggakan.

MOTTO

Dan perumpamaan- perumpamaan ini kami buat untuk manusia dan tiada yang memahaminya kecuali orang-orang yang berilmu (Qur'an surah Al Ankabut :29)*

Barang siapa yang menempuh suatu jalan untuk menuntut ilmu, Allah akan memudahkan baginya jalan ke surga (Hadist Riwayat Muslim) **

*)Kementrian Agama Republik Indoesia. 2016. Al Qur'an dan Tafsirnya. Jakarta. Lembaga Percetakan Al Qur'an (LPQ) Kemenag RI.

**)Terjemah Riyadhush Shalihin Kitabul Ilmi Al Imam An Nawawi No 2699.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Moh.Miftah Farid.MS

NIM : 162520101004

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang **berjudul ” DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum* DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A”** adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 17 Juli 2018

Yang menyatakan,

Moh. Miftah Farid MS
NIM 162520101004

TESIS

**DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum* DAN
KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A**

Oleh

MOH.MIFTAH FARID.MS

NIM 162520101004

Pembimbing :

Dosen Pembimbing Utama : Hardian Susilo Addy, S.P., M.P., Ph.D

NIP : 19801109 2005011001

Dosen Pembimbing Anggota : Erlia Narulita, S.Pd., M.Si., Ph.D

NIP : 198007052006042004

PERSETUJUAN PEMBIMBING

Tesis berjudul “**Determinasi Molekular Bakteri *Ralstonia solanacearum* dan Karakterisasi Bakteriofag DT3A**” telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Senin, 23 Juli 2018

Tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota

Hardian Susilo Addy, S.P, M.P, Ph.D.
NIP. 19801109 2005011001

Erlia Narulita, S.Pd., M.Si, Ph.D.
NIP. 198007052006042004

PENGESAHAN

Tesis berjudul “*Determinasi Molekular Bakteri Ralstonia solanacearum dan Karakterisasi Bakteriofag DT3A*” telah memenuhi persyaratan Keputusan Rektor Universitas Jember, nomor 16887/UN25/SP/2017, tanggal 01 November 2017 tentang Deteksi Dini Tindakan Plagiasi dan Pencegahan Plagiarisme Karya ilmiah Dosen, Tenaga Kependidikan dan Mahasiswa Universitas Jember dengan submission ID 985528299 serta telah diuji dan disahkan pada :

Hari, tanggal : Senin, 23 Juli 2018

Tempat : Pascasarjana Universitas Jember

Tim Penguji,

Dr.drg. Banun Kusumawardani.M.Kes
NIP. 197005091999032001

Anggota I,

Anggota II,

Prof. Tri Agus Siswoyo, M.Agr, Ph.D
NIP 197008101998031001

Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.Pd, Ph.D
NRP 760016793

Mengesahkan,

Direktur,

Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S
NIP 1952070661976031006

RINGKASAN

Determinasi Molekular Bakteri *Ralstonia solanacearum* dan Karakterisasi Bakteriofag DT3A; Moh. Miftah Farid.MS; 162520101004; 38 halaman; Program Studi Magister Bioteknologi Pascasarjana Universitas Jember.

Bakteri patogen *Ralstonia solanacearum* adalah penyebab penyakit layu bakteri, penyakit dikategorikan sebagai penyakit bakteri paling merusak dikarenakan kisaran inang yang sangat luas dan menyebabkan kehilangan produksi yang besar. Deteksi dan identifikasi yang cepat dan akurat menjadi penentu didalam upaya pencegahan dan pengendalian penyakit ini. Salah satu metode yang dapat dimanfaatkan untuk hal itu adalah penggunaan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Upaya-upaya pengendalian penyakit ini seperti penggunaan varietas tahan dan penggunaan pestisida kimia belum memberikan hasil yang optimal. Disisi lain pengendalian penyakit berbasis biologi dengan keunggulannya seperti ramah lingkungan dan keefektifannya yang berkelanjutan telah banyak diteliti seperti salah satunya adalah pemanfaatan bakteriofage (*phage therapy*) yaitu virus yang mempunyai kespesifikan didalam menginfeksi bakteri inang. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi isolat bakteri *R. solanacearum* yang diisolasi dari 4 tanaman *Solanaceae* seperti tomat, cabai, terong dan tembakau. Tanaman- tersebut berasal dari 4 Kabupaten di Jawa Timur yaitu Jember, Bondowoso, Situbondo dan Banyuwangi yang selanjutnya dilakukan pengujian kisaran inang menggunakan bakteriofag DT3A.

Sebanyak 24 isolat yang berhasil diisolasi dilakukan identifikasi menggunakan metode PCR dengan primer *fliC*, yaitu primer spesifik mengkode *flagellar* dari subunit protein flagellin dengan panjang target 400 bp, hal ini menunjukkan bahwa ke 24 isolat merupakan bakteri *R. solanacearum*. Selanjutnya determinasi dilanjutkan menggunakan primer primer *phyllo* 1F dan sekuen target teramplifikasi sepanjang 144 bp hal ini menunjukkan bahwa ke 24 isolat merupakan bakteri *R. solanacearum* phyllo tipe I yang berasal dan tersebar di kawasan benua Asia. Metode *multiplex* PCR menggunakan 2 primer yaitu primer RsSC panjang target 296 bp dan Primer RsSA dengan panjang target 132 bp, sebanyak 24 isolat menunjukkan teramplifikasinya pita DNA pada ukuran 296

bp hal ini menunjukkan bahwa ke 24 isolat merupakan *R. solanacearum* spesies complex (RsSC) sedangkan untuk target primer sepanjang 132 bp tidak muncul mengindikasikan ke 24 isolat bukan merupakan *R. solanacearum* Ras 3 Biovar 2 (*select agent*) hal ini dikuatkan dengan hasil pengujian hipersensitif respon yang menunjukkan ke 24 isolat tersebut menyebabkan gejala nekrotik coklat kehitaman disertai *halo* pada 36 jam setelah *infiltrasi* yang merupakan ciri dari Ras 1.

Analisa genom bakteriofag DT3A menggunakan 5 enzim restriksi yaitu DNase I, RNase A, *Exonuclease I*, *S1 nuclease* dan *XhoI* memberikan informasi bahwa jenis asam nukleat DT3A merupakan DNA untai ganda (*double stranded DNA*). Pengujian kisaran inang yang menggunakan metode pendekatan spot test menunjukkan bahwa bakteriofag DT3A mampu menyebabkan lisis yang ditandai dengan munculnya *plaque* 18 dari 24 isolat dengan keterangan *plaque* bening berjumlah 10, 8 isolat menunjukkan *plaque* keruh dan 6 isolat sisanya tidak menunjukkan adanya *plaque*.

Kata kunci : *Ralstonia solanacearum*, multiplex PCR, bakteriofage DT3A, analisis genom.

SUMMARY

Molecular Determination of *Ralstonia solanacearum* and Characterization of Bacteriophage DT3A; Moh. Miftah Farid. MS; 162520101004; 2018: 38 pages; Study Program of Biotechnology, Post Graduate Program, University of Jember.

Pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum* is the causative agent of bacterial wilt disease, categorized as the most destructive bacterial disease due to a very wide range of hosts and causes a large production loss. Rapid and accurate detection and identification becomes determinant in prevention and control of this disease. One method that can be utilized for that use of PCR (Polymerase Chain Reaction). Efforts to control the disease such as the use of resistant varieties and the use of chemical pesticides has not given optimal results. On the other hand biological-based disease control with its advantages such as environmentally friendly and its sustainable effectiveness has been widely studied such as one of them is the utilization of bacteriophage (*phage therapy*) that is virus that has specificity in infecting host bacterium. This study aims to identify and to determine isolates of bacteria *R. solanacearum* isolated from 4 *Solanaceae* plants such as tomatoes, chili, eggplant and tobacco. in East Java, namely Jember, Bondowoso, Situbondo and Banyuwangi, which then tested host ranges using bacteriophage DT3A.

A total of 24 isolated isolates were identified using PCR method with primer *fliC*, which is the flagellar-specific primer of the flagellin protein subunit with a target length of 400 bp, indicated that the 24 isolates were *R. solanacearum* bacteria then determination was continued using the primer phyllo 1F and amplified target sequence with a target length of 144 bp indicates that 24 isolates are *R. solanacearum* phyllo type I bacteria origin and scattered in Asian geographic PCR mutliplex method using 2 primers of RsSC primer and RsSA primer with target length of 296 bp and 132 bp, 24 isolates showed the amplification of DNA bands of 296 bp. This shows that the 24 isolates were *R. solanacearum* species complex (RsSC) , while a target length of 132 bp did not appear This indicated that 24 isolates were not *R. solanacearum* Race 3 Biovar 2 (*R. solanacearum* select agent) (RsSA) or this was confirmed by the result of hypersensitive test

response that showed to 24 isolates causing blackish brown necrotic symptoms with halo at 36 h after infiltration which is characteristic of Race 1.

Bacteriophage genome analysis of DT3A use 5 restriction enzymes, DNase I, RNase A, *Exonuclease I*, *S1 nuclease* and *XhoI*, provided that DT3A nucleic acid is double stranded DNA. Testing of host range using spot test method showed that DT3A bacteriophage was able to cause lysis characterized by a plaque 18 of 24 isolates with clear plaque description of 10, 8 isolates showed a cloudy plaque and the remaining 6 isolates showed no plaque.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*, multiplex PCR, bacteriophage DT3A, genome analysis

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul ” DETERMINASI MOLEKULAR BAKTERI *Ralstonia solanacearum* DAN KARAKTERISASI BAKTERIOFAG DT3A”. Tesis ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata dua (S2) pada Program Studi Bioteknologi Universitas Jember. Penyusunan tesis ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Universitas Jember yang telah memberikan beasiswa UKT selama masa studi S2 ini ;
2. Prof. Dr. Ir. Rudi Wibowo, M.S. selaku Direktur Pascasarjana Universitas Jember ;
3. Prof. Tri Agus Siswoyo, S.P., M.Sc, Ph.D selaku Ketua Program Studi Bioteknologi untuk bimbingan dan motivasi selama penyusunan tesis ini ;
4. Prof. Dr. Ir. Bambang Sugiharto., M.Agr .Sc selaku Kepala CDAST yang telah membantu dan memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian di CDAST ;
5. Hardian Susilo Addy., S.P.,M.P.,Ph.D selaku Dosen Pembimbing Utama (DPU) dan Dosen Pembimbing Akademik (DPA) untuk bimbingan, arahan dan motivasi yang telah diberikan dengan penuh kesabaran dan keikhlasan selama penyusunan tesis ini ;
6. Erlia Narulita.S.Pd., M.Si., Ph.D selaku Dosen Pembimbing (DPA) untuk bimbingan, arahan dan motivasi selama penyusunan tesis ini;
7. Dr.drg. Banun Kusumawardani.M.Kes selaku ketua Dosen Penguji, Prof. Ir.Wiwiek Sri Wahyuni, M.S, Ph.D selaku Dosen Penguji I dan Agung Nugroho Puspito, S.Pd., M.Pd., Ph.D selaku Dosen Penguji II untuk waktu, arahan serta bimbingan selama seminar dan penyusunan tesis ini ;
8. Serta semua pihak yang telah memberikan saran dan kontribusi sehingga proses penyelesaian tesis dapat berjalan dengan lancar.

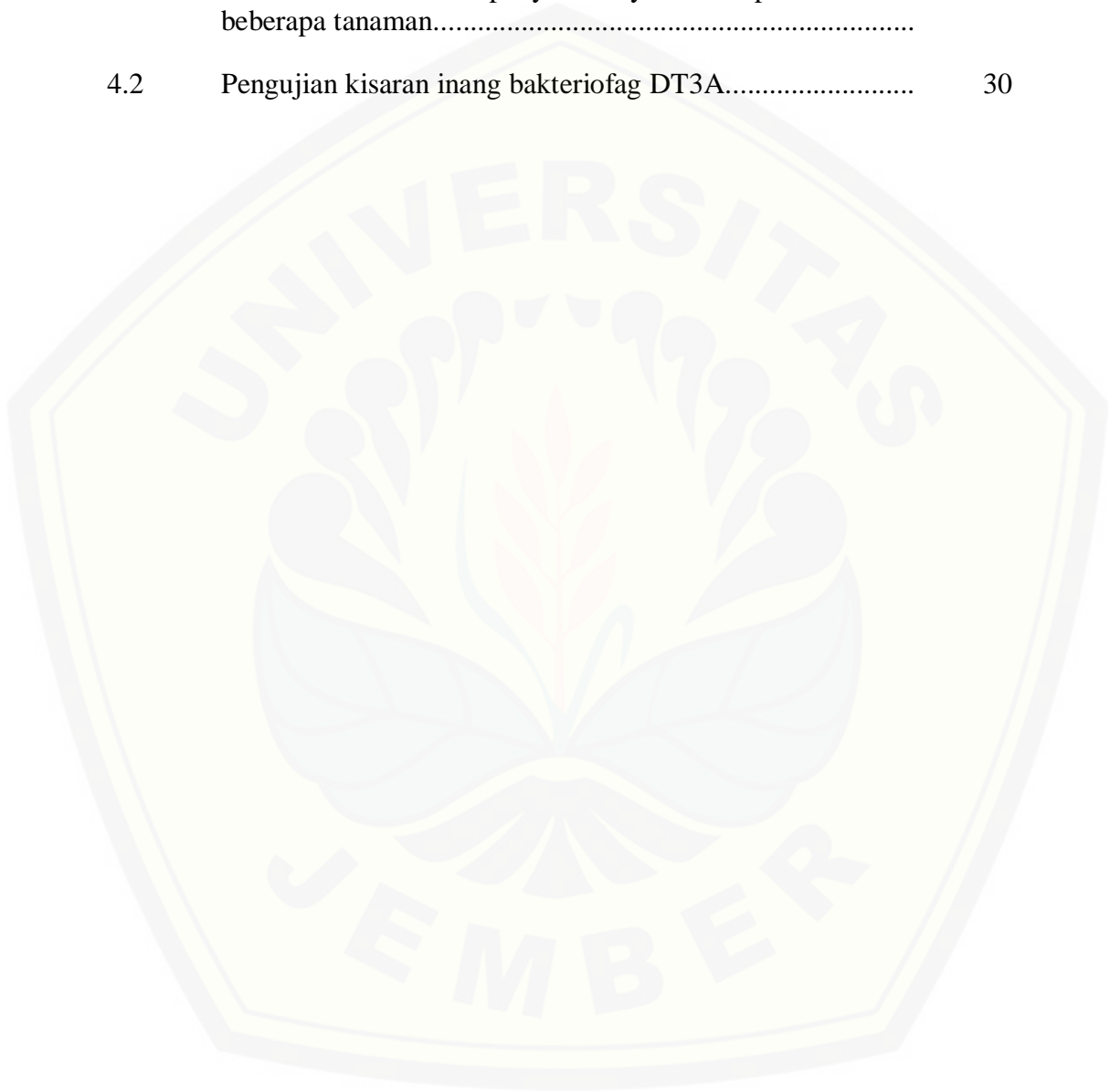
DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|-----------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSEMBAHAN..... | ii |
| HALAMAN MOTTO..... | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN..... | iv |
| HALAMAN PEMBIMBING..... | v |
| HALAMAN PERSETUJUAN PEMBIMBING..... | vi |
| HALAMAN PENGESAHAN..... | vii |
| RINGKASAN | viii |
| SUMMARY..... | ix |
| PRAKATA..... | xi |
| DAFTAR ISI..... | xii |
| DAFTAR TABEL..... | xiv |
| DAFTAR GAMBAR..... | xv |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | xvi |
| | |
| BAB 1. PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1 Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2 Perumusan Masalah..... | 2 |
| 1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian..... | 2 |
| | |
| BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA..... | 3 |
| 2.1 Bakteri <i>R.solanacearum</i> dan Penyakit Layu Bakteri..... | 3 |
| 2.2 Bakteriofag | 7 |
| | |
| BAB 3. METODE PENELITIAN..... | 13 |
| 3.1 Waktu dan Tempat | 13 |
| 3.2 Bahan dan Alat | 13 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3 Metode..... | 13 |
| 3.3.1 Pengambilan Sampel Tanaman Inang <i>R. solanacearum</i> | 13 |
| 3.3.2 Isolasi dan Purifikasi Isolat Patogen Layu Bakteri..... | 14 |
| 3.4 Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Patogen Layu | 14 |
| 3.4.1 Pengujian Hipersensitif Respon dan Pengujian Gram..... | 14 |
| 3.4.2 Karakterisasi Molekuler..... | 15 |
| 3.4.3 Perbanyakkan Partikel Bakteriofag dan Kartakterisasi Partikel..... | 16 |
| 3.4.3 Pengujian Kisaran Inang..... | 17 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN..... | 18 |
| 4.1 Hasil..... | 18 |
| 4.1.1 Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penyebab Layu Bakteri. | 18 |
| 4.1.2 Perbanyakkan dan Karakterisasi Partikel Bakteriofag..... | 26 |
| 4.1.3 Pengujian Kisaran Inang Bakteriofag DT3A..... | 29 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN..... | 31 |
| 5.1 Kesimpulan..... | 31 |
| 5.2 Saran..... | 31 |
| DAFTAR PUSTAKA..... | 32 |
| LAMPIRAN..... | 39 |

DAFTAR TABEL

| | Halaman |
|--|---------|
| 3.1 Daftar primer yang digunakan..... | 15 |
| 4.1 Karakter isolat bakteri penyebab layu bakteri pada beberapa tanaman..... | 19 |
| 4.2 Pengujian kisaran inang bakteriofag DT3A..... | 30 |

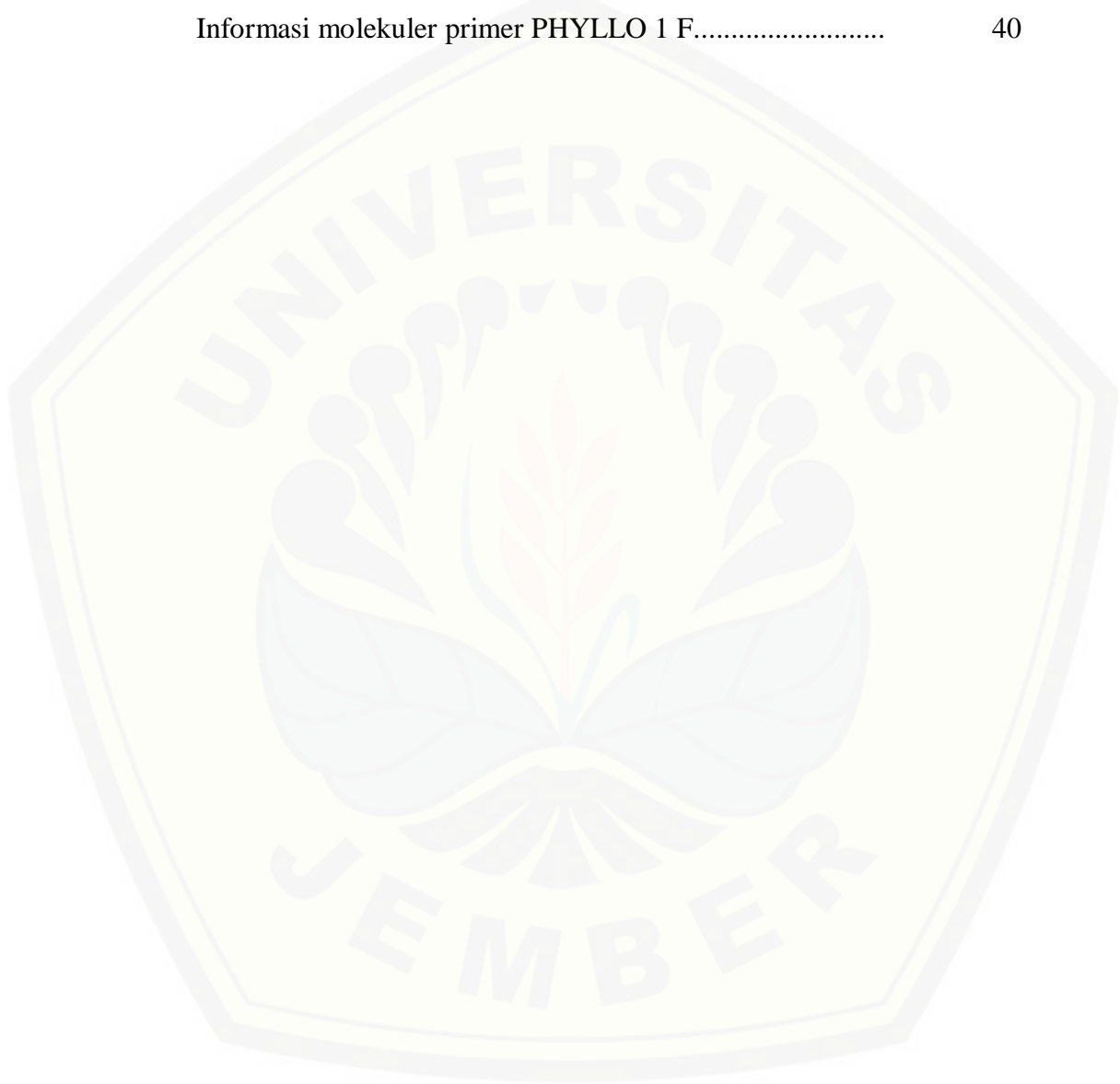


DAFTAR GAMBAR

| | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Morfologi bakteri <i>R. solanacearum</i> (A) dan Koloni <i>R. solanacearum</i> pada media TZC)..... | 3 |
| 2.2 Gejala penyakit layu bakteri pada tanaman tomat , cabai, terong dan tembakau..... | 5 |
| 2.3 Siklus hidup dan replikasi bakteriofage..... | 8 |
| 2.4 Bakteriofag dari ordo <i>Caudovirales</i> yang terdiri dari 3 family yaitu <i>Myoviridae</i> , <i>Podoviridae</i> dan <i>Siphoviridae</i> | |
| 2.5 Skema terapi bakteriofag..... | 12 |
| 4.1 Gejala layu bakteri pada tomat, cabai, terong dan tembakau serta batang tomat yang terinfeksi layu bakteri..... | 18 |
| 4.2 Daun tembakau pada uji HR dengan isolat tomat, isolat cabai, isolat terong dan isolat tembakau serta suspensi bakteri yang menunjukkan lendir kental..... | 21 |
| 4.3 Elektroforesis hasil PCR bakteri penyebab layu bakteri menggunakan primer <i>fliC</i> | 22 |
| 4.4 Struktur flagellum bakteri..... | 23 |
| 4.5 Elektroforesis hasil PCR bakteri penyebab layu bakteri menggunakan 2 primer (RsSC dan RsSA)..... | 25 |
| 4.6 Elektroforesis hasil PCR bakteri penyebab layu bakteri menggunakan primer <i>phyllo</i> 1F..... | 26 |
| 4.7 Morfologi partikel bakteriofag DT3A..... | 28 |
| 4.8 Analisa genom bakteriofag DT3A menggunakan beberapa enzim restriksi..... | 28 |
| 4.9 Uji spot bakteriofag DT3A . <i>Plaque</i> yang jernih (A), <i>Plaque</i> yang keruh (B). Tidak ada <i>plaque</i> (C) pada hamparan biakan isolat <i>R. solanaceraum</i> | 30 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Halaman |
|---|---------|
| Informasi molekuler primer RsSA..... | 39 |
| Informasi molekuler primer RsSC..... | 39 |
| Informasi molekuler primer PHYLLLO 1 F..... | 40 |



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 latar belakang

Ralstonia solanacearum adalah penyebab penyakit layu bakteri (Fegan dan Prior, 2005) dengan kisaran inang yang luas termasuk tanaman-tanaman yang bernilai ekonomi tinggi seperti tembakau (*Nicotiana tabacum*), pisang (*Musa paradisiaca*), tomat (*Lycopersicon esculentum*), kacang tanah (*Arachis hypogaea*), terong (*Solanum melongena*), kentang (*Solanum tuberosum*), dan jahe (*Zingiber officinale*) (IPDN, 2014). Bakteri ini berbentuk batang, bersifat aerobik, digolongkan dalam Gram negatif, oksidase dan katalase positif, mampu mereduksi nitrat dan digolongkan patogen tular tanah yang umumnya menyerang tanaman yang banyak mengandung air atau *herbaceous* (Kresten *et al.*, 2001; Wahyuni, 2010).

Patogen penyebab penyakit layu bakteri menyebabkan kerugian yang sangat besar pada wilayah dengan iklim tropis dan subtropis (Denny, 2006). Bahkan Meng, (2013) mengkategorikan penyakit ini sebagai penyakit bakterial tunggal yang paling merusak karena sifat agresivitas yang tinggi, distribusi geografis penyebaran yang luas dan tanaman inang yang sangat bervariasi, keagresivitasan penyakit ini ditunjukkan dengan mampu menyebabkan kelayuan sempurna pada tanaman tomat dalam jangka waktu beberapa jam saja (Goto, 1992) dan berpotensi mengurangi produksi panen mencapai 45-100 % (Suhartiningsih, 2015; Balamurugan *et al.*, 2017).

The International Plant Diagnostic Network (IPDN) tahun 2014 melaporkan bahwa 3 juta petani dengan luas area 1,5 juta hektar di 50 negara mengalami kerugian 950 juta dolar Amerika karena penyakit layu bakteri. Oleh karena itu dibutuhkan suatu metode deteksi dan identifikasi yang cepat dan akurat guna mencegah penyebaran serta mengendalikan patogen penyakit layu bakteri misalnya dengan teknik multiplex *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Stulberg *et al.*, 2015). Identifikasi secara akurat, cepat dan stabil dapat berguna dalam pengambilan keputusan pengendalian bagi petani selain menjadi dasar acuan

petugas karantina suatu negara dalam kaitannya mendapatkan informasi epidemiologi, patogenisitas, kisaran inang dan asal geografis bakteri, proses taksonomi dan nomenklatur kelompok bakteri yang berguna dalam hal patologi tanaman (Fegan and Prior, 2005).

Upaya strategi pengendalian penyakit layu bakteri misalnya menggunakan varietas tahan mempunyai tingkat stabilitas yang kurang, hal ini dikarenakan di setiap wilayah memiliki tingkat kepadatan populasi bakteri patogen, strain dan struktur keadaan tanah yang bervariasi (Ahmed *et al.*, 2013) sedangkan pengendalian menggunakan bakterisida kimiawi didalam pengendalian bakteri patogen dianggap kurang berhasil (Wahyuni, 2010), sisi lain pemanfaatan *agens* biokontrol yang efektif menjadi salah satu pilihan alternatif pengendalian bakteri misalnya dengan pemanfaatan bakteriofag (Jones *et al.*, 2012).

1.2 Rumusan masalah

1. Bagaimana karakteristik dan pengelompokkan bakteri *R. solanacearum* asal Jember, Banyuwangi, Bondowoso dan Situbondo secara molekuler?
2. Bagaimana karakteristik dan virulensi bakteriofag terhadap beberapa isolat *R. solanacearum*?

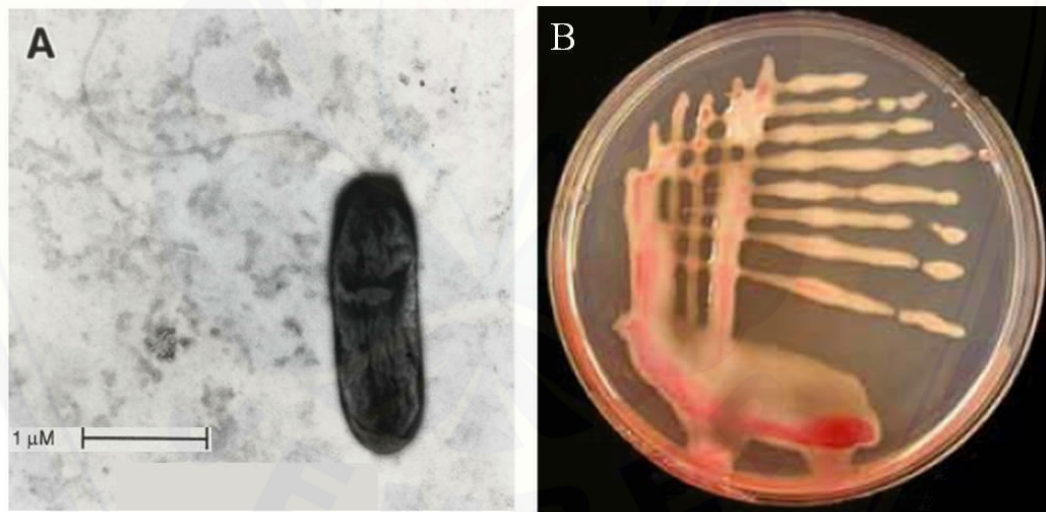
1.3. Tujuan Penelitian

1. Untuk mengidentifikasi dan mengelompokkan bakteri *R. solanacearum* asal Jember, Banyuwangi, Bondowoso dan Situbondo melalui pendekatan molekuler
2. Untuk mengkarakterisasi partikel bakteriofag dan mengetahui kisaran inang

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Ralstonia solanacearum* dan Penyakit layu bakteri

Bakteri *R. solanacearum* memiliki morfologi berbentuk batang pendek ujung membulat dengan ukuran sel tunggal $0,5-0,7 \times 1,5-2,0 \mu\text{m}$, dapat bergerak dengan menggunakan bulu getar (flagela polar multitrik) (Gambar 2.1 A), polisakarida ekstraseluler diproduksi oleh sel yang virulen dan sebaliknya (Arwiyanto, 2013; Champoiseau *et al.*, 2009). Bakteri yang virulen akan membentuk koloni bulat tidak teratur, kebasah-basahan, berwarna putih dengan pusat koloni berwarna merah muda pada media *Triphenyl Tetrazolium Chlorida* (TZC) (Gambar 2.1 B) dan optimum tumbuh pada suhu 37°C (Hayward, 1964; Sagar *et al.*, 2014).



Gambar 2.1. Morfologi bakteri *R. solanacearum* (A) dan Koloni *R. solanacearum* pada media TZC (Sumber : Kresten *et al.*, 2001; Champoiseau *et al.*, 2009)

Bakteri *R. solanacearum* sebagai penyebab penyakit layu bakteri menginfeksi melalui luka pada akar tanaman, luka yang disebabkan proses alami akibat pertumbuhan akar, luka mekanis dari alat-alat pertanian maupun serangan nematoda (Hartati dan Karyani, 2014; Borkar, 2017). Patogen yang berhasil

menginfeksi tanaman akan memanfaatkan nutrisi tanaman untuk memperbanyak diri di dalam pembuluh vaskuler sehingga pembuluh vaskuler sebagai jalan transportasi air tersumbat oleh massa bakteri, selain itu rusaknya jaringan pengangkut akibat enzim-enzim yang disekresikan oleh bakteri yang mampu mendegradasi dinding jaringan pengangkutan tanaman (Addy, 2015), hal ini yang menyebabkan gejala layu muncul pada saat tengah hari atau saat penyinaran matahari penuh dengan suhu lebih dari 30° C (Borkar, 2017).

Penyebaran penyakit layu bakteri didukung oleh faktor biotik dan abiotik diantaranya faktor biotik yaitu kemampuan bakteri dalam bertahan hidup pada sisa-sisa tanaman yang telah terinfeksi serta kemampuan bertahan didalam tanah dengan jangka waktu yang lama hingga mendapatkan tanaman inang yang sesuai bahkan bakteri ini juga mampu hidup pada inang sementara berupa gulma tanpa menunjukkan gejala (Borkar, 2017; Goto, 1992). Komoditas seperti kentang, jahe dan kunyit yang umbinya berada dalam tanah mempunyai potensi penyebaran lebih tinggi melalui bibit umbi yang telah terinfeksi (Borkar, 2017). Faktor abiotik (lingkungan) juga berpengaruh positif didalam perkembangan dan penyebaran penyakit ini seperti iklim yang lembab (hangat), pH tinggi serta curah hujan tinggi (Denny, 2006; Borkar, 2017) serta alat-alat pertanian dan irigrasi yang telah terkontaminasi bakteri juga mendukung dalam penyebaran penyakit ini (Wahyuni, 2010).

Tanaman yang terserang patogen layu bakteri menunjukkan gejala khas di setiap tanaman seperti pada tanaman tomat akan menunjukkan gejala layu pada daun muda terlebih dahulu disusul dengan daun yang lebih tua hingga tanaman akan layu sempurna (mati) dalam 2-3 hari hingga tanaman mati (Gambar 2.2 A), namun apabila kondisi tidak mendukung maka penyakit perkembangan akan juga melambat dengan gejala epinasti pada daun dan munculnya akar *adventif* pada batang. Batang tomat yang telah mengalami layu bakteri akan mengalami kerusakan pada bagian jaringan vaskularnya (berwarna coklat gelap) nampak apabila dibelah secara vertikal (Borkar, 2017).

Gejala layu pada tomat juga dapat terjadi tanpa diawali dengan menguningnya daun sehingga dapat dengan waktu yang relatif singkat dapat menyebabkan gejala layu sempurna (Balamurugan *et al.*, 2017; NCSU, 2011).



Gambar 2.2. Gejala Penyakit layu bakteri pada tanaman tomat (A), tanaman cabai (B), tanaman terong (C) dan tanaman tembakau (D) (Sumber : Champoiseau *et al.*, 2009; Cattlin, 2017; Reddy, 2014; Clemson University- USDA, 2018)

Berbeda dengan dengan gejala pada tanaman tomat, gejala pada tanaman cabai dan terong yang terserang patogen layu bakteri ialah daun paling tua (bagian bawah) akan layu terlebih dahulu. Pelayuan berlangsung secara bertahap ataupun juga dapat secara cepat, pelayuan juga dapat terjadi di seluruh ranting daun atau

juga di sebagian ranting saja dan gejala ini disertai gugurnya daun yang telah menguning (Gambar 2.2 B dan Gambar 2.2 C), gejala layu pada tanaman umumnya muncul pada kondisi terik matahari dan tanaman akan kembali normal (tegak) kembali pada malam hari (Borkar, 2017; Revathi *et al.*, 2017; Momol *et al.*, 2001).

Gejala layu bakteri pada tanaman tembakau dapat terjadi layu pada sebagian sisi tanaman saja. Apabila kondisi mendukung maka akan terjadi layu sempurna diseluruh daun hingga tanaman akan mati, sedangkan bila kondisi kurang mendukung maka pertumbuhan tembakau akan terhambat (kerdil) disertai tangkai daun yang menghitam khususnya pada tangkai daun yang dekat dengan permukaan tanah (Borkar, 2017).

Secara fenotipe bakteri *R. solanacearum* terbagi 5 Ras berdasarkan kisaran inang dan berdasarkan kemampuan bakteri dalam memanfaatkan 3 gula alkohol (*mannitol, sorbitol, dulcitol*) dan 3 disakarida (*maltose, laktos, cellobiose*) terbagi 6 biovar (EPPO,2004). Keanekaragaman genetik yang tinggi dimiliki setiap strain *R. solanacearum* memicu proses identifikasi dan determinasi molekuler terus dilakukan guna mendapatkan jawaban akan variasi fenotipe dan genotipe dalam spesies, hal tersebut yang menjadi para peneliti termasuk bagi Fegan dan Prior, (2005) yang mengklasifikasikan *R. solanacearum* menjadi *R. solanacearum* spesies complex, hal itu didukung dari banyaknya studi tentang homologi DNA dari strain *R. solanacearum* yang mengungkapkan bahwa keterkaitan antar isolat spesies *R. solanacearum* seringkali kurang dari 70% dari ambang batas yang umumnya diharapkan dalam suatu spesies

Penelitian-penelitian yang dilakukan guna mendeterminasi *R. solanacearum* seperti yang dilakukan Cook *et al.* (1989) yang menggunakan metode *random Fragment Length Polymorphism* (RFLP) yang melaporkan *R. solanacearum* terbagi menjadi 2 divisi yaitu divisi terdiri dari strain biovar 3, 4 dan 5 yang diisolasi dari kawasan Asia dan divisi 2 terdiri dari strain biovar 1, 2 dan N2 yang diisolasi dari kawasan Amerika.

Identifikasi lanjutan menggunakan metode analisis 16S rDNA-23S rDNA pada daerah ITS (*Intergenic Spacer Region*) dengan fokus pada gen

polygalacturonase dan gen *endoglucanase*, hasilnya adalah *R. solanacearum* terbagi menjadi 4 tipe berdasarkan filotipenya yang berkolerasi dengan penyebarannya yaitu filotipe I yang berasal dan tersebar di kawasan benua Asia, filotipe II yang berasal dan tersebar di benua Amerika, filotipe III yang berasal dan tersebar di benua Afrika serta filotipe IV yang berasal dan tersebar di Indonesia (Fegan dan Prior, 2005). Laporan yang dikemukakan oleh Safni., *et al* (2014) menyebutkan bahwa *R. solanacearum* spesies complex terbagi menjadi tiga genospecies yaitu *R. solanacearum* (Phylotipe II), *R. pseudosolanacearum* (Phylotipe I dan III) dan *R. syzigii* (Phylotipe IV), hal tersebut didasari pada analisa filogenetik 16S-23S Rrna *ITS gene sequences*, 16S–23S rRNA *Intergenic Spacer region Sequences(ITS)* dan hibridisasi DNA.

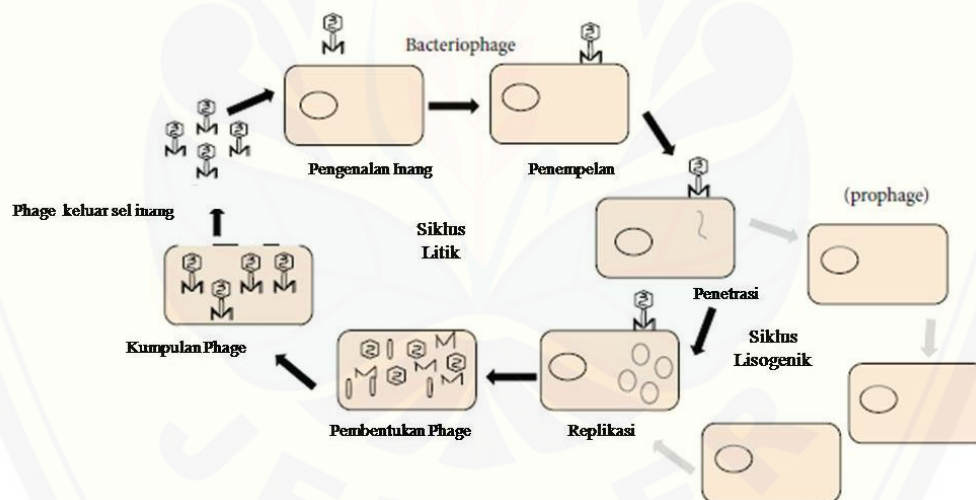
Identifikasi dan determinasi bakteri patogen yang cepat dan efektif sangat diperlukan guna mendukung keamanan pangan suatu negara dalam kaitanya menjaga hama penyakit tumbuhan khususnya bakteri patogen yang belum ada / *non* endemik di negara tersebut untuk tidak masuk dan berpotensi menyebabkan kerugian besar pada budidaya tanamannya, hal tersebut sesuai dengan yang dikemukakan oleh Stulberg *et al.* (2015) yang menjelaskan pengujian untuk mendeteksi dan mendeterminasi patogen *R. solanacearum* menggunakan *multiplex* PCR, dengan metode ini informasi yang didapatkan dari 1 isolat akan lebih luas dan lengkap, misalnya penggunaan primer RsSC (*R. solanacearum* spesies complex) dan primer RsSA (*R. solanacearum* select agent) dalam *multiplex* PCR yang memberikan informasi isolat terkait penggolongan sebagai spesies kompleks dan apakah isolat tersebut termasuk select agents (SA) ras 3 biovar 2 yang menjadi daftar bakteri patogen yang dilarang masuk oleh pemerintah Amerika Serikat.

2.2 Bakteriofag

Bakteriofag merupakan virus yang memiliki kespesifikan dalam menginfeksi bakteri (Campbell, 2003; Salmond *et al.*, 2015). Seperti virus pada umumnya bakteriofag memiliki paling tidak dua komponen yaitu asam nukleat dan protein (Campbell, 2003), asam nukleat tersebut dapat terdiri dari satu molekul atau lebih

yang berupa DNA (*Deoxyribon Nucleic Acid*) atau RNA (*Ribonucleic Acid*) dan terlindungi oleh lapisan pelindung yang disebut *kapsid*, namun terdapat juga bakteriofag yang memiliki lapisan pelindung tambahan yang sangat kompleks dengan komponen penyusunannya seperti karbohidrat, *lipid* dan pelindung paling luar yang berupa protein tambahan yang disebut *envelope*, meskipun ada juga beberapa bakteriofag yang tidak memiliki *envelop* (Orlova, 2012).

Bakteriofag sangat mudah ditemukan diberbagai kondisi lingkungan seperti tanah, air tawar maupun laut serta pada tanaman dan hewan yang telah mati maupun masih hidup, dengan kondisi lingkungan yang mendukung pertumbuhan bakteri sebagai inangnya (Elbreki *et al.*, 2014; Campbell, 2003; Salmond *et al.*, 2015). Menurut Budzik (2000) terdapat dua jenis siklus bakteriofag didalam menginfeksi inang bakteri untuk mereplikasi diri (Gambar 2.3) yaitu siklus lisogenik dan siklus litik



Gambar 2.3. Siklus hidup dan replikasi bakteriofage (Sumber : Elbreki *et al.*, 2015)

Proses awal bakteriofag menginfeksi sel inang ialah dimulai dari proses menempelnya bakteriofag pada tubuh inang dan terjadi pengenalan antara *phage* dengan reseptor sel inang, apabila sel inang berhasil dikenali oleh ekor *phage* maka *phage* akan menyuntikan genomnya pada tubuh sel inang, proses selanjutnya bergantung pada virulen atau tidaknya bakteriofag. Apabila

bakteriofag yang bersifat virulen maka proses litik akan terjadi yaitu bergabungnya ujung-ujung DNA *phage* dan ujung-ujung DNA bakteri inang membentuk lingkaran linear, kemudian DNA akan mengalami Transkripsi dan Translasi untuk membentuk partikel-partikel *phage* baru untuk keluar dari sel inangnya sedangkan apabila *phage* bersifat *temperate* (avirulen) maka proses lisogenik akan terjadi dimana penggabungan DNA virus dan sel inang bersifat stabil yang berarti replikasi yang dilakukan oleh bakteri turut membawa materi genetik *phage*. Dan fase lisogenik akan berubah menjadi fase lisis (pecah) dipicu karena faktor cekaman/ *stress* di lingkungan bakteri yang telah tersisipi DNA *phage* tersebut (Salmond *et al.*, 2015; Campbell, 2003; Orlova, 2012).

Menurut Elbreki *et al.* (2014) taksonomi bakteriofag dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi, jenis asam nukleat dan ada tidaknya *envelope* atau *lipid*. Ackermann (2011) menambahkan objek- objek yang dijadikan dasar taksonomi di antaranya apakah bakteriofag mempunyai untai ganda (*double –stranded*) atau untai tunggal (*single –stranded*) pada DNA atau RNA nya, apakah bakteriofag mempunyai ekor (*tailed*) atau tidak (*polyhedral*), dan apakah bakteriofag dalam bentuk *filementous* atau bukan (*pleomorphic*).

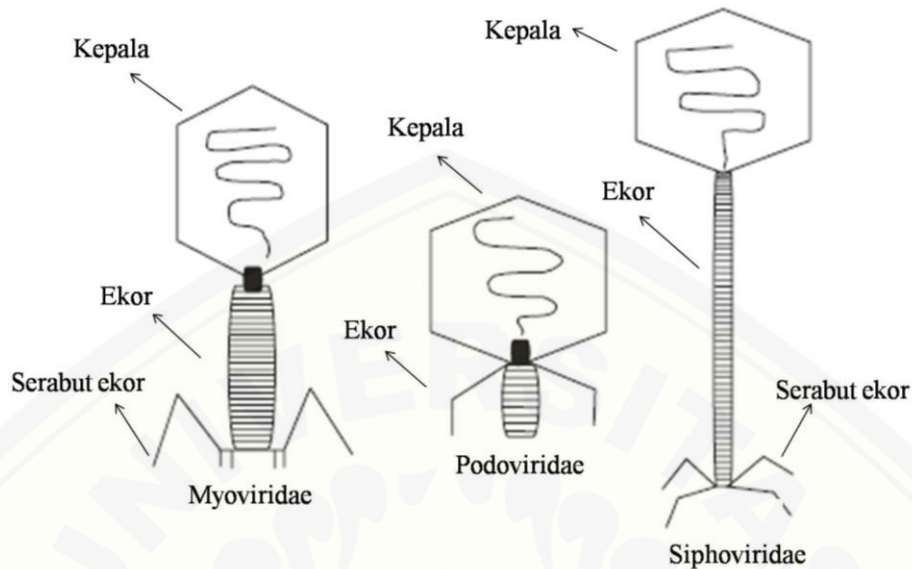
Proses taksonomi bakteriofag dengan objek asam nukleat dapat dilakukan dengan pendekatan analisis genom memanfaatkan beberapa enzim restriksi, enzim restriksi itu sendiri terbagi menjadi 2 berdasarkan lokasi pemotongan pada asam nukleat yaitu *endonuclease* yang memotong ikatan nukleotida dalam suatu asam nukleat dan *exonuclease* yang memotong nukleotida pada ujung 3' atau 5' suatu asam nukleat (Kirtikal *et al.*, 1976; Koval dan Matthews, 1998).

Enzim restriksi yang mampu mendegradasi asam nukleat sesuai dari jenis asam nukleatnya seperti DNase (*Deoxyribonuclease*) adalah enzim restrksi yang mampu memotong/*digest* DNA dengan memecah susunan *fosfodiesternya* melalui proses hidrolisis, termasuk didalam nya enzim DNaseI yang mampu memotong *single* maupun *double stranded* DNA menjadi *nucleotide* ukuran kecil (*trinucleotide*) dan umumnya digunakan untuk membersihkan sisa/*debris* pada proses ekstraksi yang berupa DNA pada suatu pengujian RNA misalnya *Revers Transkrip* PCR (RT-PCR) (Ramirez *et al.*, 2017; Nadugala dan Rakshit, 2007).

RNAse A (*Ribonuclease*) adalah suatu enzim restriksi *endonuclease* yang dikenal dengan *bovine pancreatic ribonuclease A* yang terdiri dari 124 asam amino, RNAse A ini dapat memotong asam nukleat *single stranded* maupun *double stranded* RNA, RNAse A secara khusus dapat memotong pada ujung 3' *fosfat pirimidin (urasil atau sitosin)* dan umumnya didalam proses membersihkan *debris* berupa RNA pada suatu pengujian DNA Misalnya PCR ataupun qPCR (Schein, 1997; Norton dan Roth, 1967; Raines, 1998).

Exconuclease adalah enzim yang menghidrolisis ikatan *fosfodiester* DNA pada ujung 3' maupun 5', *Exconuclease I (ExoI)* umumnya digunakan khusus untuk memotong DNA untai tunggal atau *single stranded* DNA (ssDNA), juga dapat dimanfaatkan pada proses perbaikan DNA, rekombinasi genetik dan menghindari mutasi genetik (Lovett, 2011). *SI nuclease* adalah enzim *endonuclease* yang digunakan untuk khusus memotong asam nukleat RNA untai tunggal atau *single stranded RNA* (ssRNA), enzim ini diisolasi dari *Aspergillus oryzae* (Koval *et al.*, 2016; Wiegand *et al.*, 1975). *XhoI* adalah salah satu dari enzim restriksi *endonuclease*, yang diisolasi dari *Xanthomonas camphetris* dengan bagian pengenalan asam basa C/TCGAG, enzim khusus memotong DNA untai ganda sesuai kode pengenalan yang dimilikinya dan *XhoI* menjadi salah satu enzim restriksi DNA yang digunakan untuk melakukan pemetaan genom bakteriofag T4 (O'farrell *et al.*, 1980).

Hasil taksonomi terbaru mendapati penggolongan bakteriofag menjadi 13 family, tiga diantaranya adalah 1). *Myoviridae*, famili bakteriofag ini memiliki ekor panjang yang dapat berkontraksi, tidak mempunyai *envelope* dan memiliki jenis asam nukleat DNA untai ganda (*double stranded*) 2). *Siphoviridae*, famili bakteriofag ini memiliki ekor yang panjang namun tidak dapat berkontraksi, tidak mempunyai *envelope* dan memiliki jenis asam nukleat DNA untai ganda (*double stranded*) 3.) *Podoviridae*, famili bakteriofag ini memiliki ekor yang pendek namun tidak dapat berkontraksi, tidak mempunyai *envelope* dan memiliki jenis asam nukleat DNA untai ganda (*double stranded*), ketiga famili diatas memiliki persamaan yaitu memiliki ekor sehingga digolongkan pada ordo yang sama yaitu ordo *Caudovirales* (Gambar 2.3) (Elbreki *et al.*, 2015; Novik *et al.*, 2017).

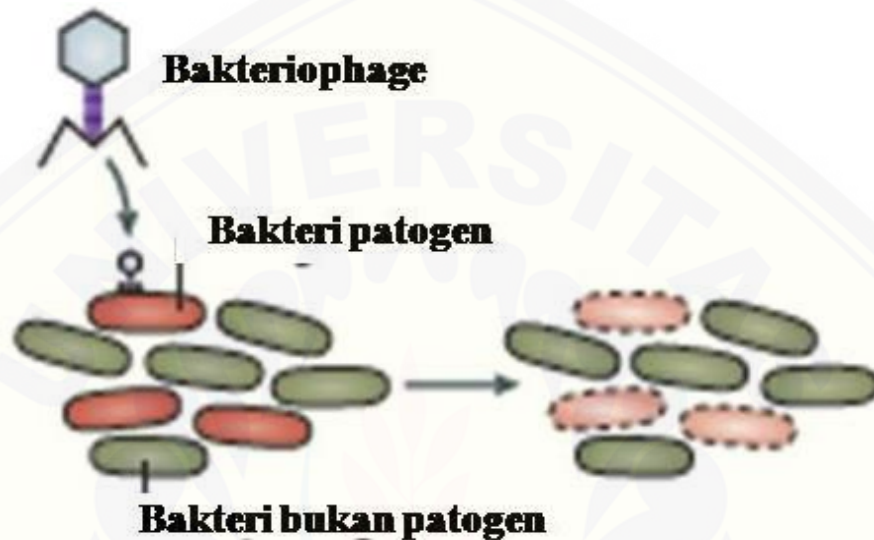


Gambar 2.3. Bakteriofag dari ordo *Caudovirales* yang terdiri dari 3 *Family* yaitu *Myoviridae*, *Podoviridae* dan *Siphoviridae* (Sumber : Elbreki *et al.*, 2014)

Salmond *et al.* (2015) menyebutkan bahwa 4 pemanfaatan bakteriofag yaitu 1). *Phage enzyme* yaitu kemampuan bakteriofag untuk menyandikan suatu enzim yang bersifat spesifik dan mampu menyebabkan lisis pada bakteri patogen, 2). *Biofilm dispersal* yaitu bakteriofag yang dapat dimanfaatkan untuk merusak biofilm bakteri dengan enzim spesifik, 3). *Drug sensitization* yaitu bakteriofag yang dapat digunakan untuk merusak sifat resistensi suatu bakteri terhadap antibiotik kemudian mengenalkan dengan gen yang bersifat sensitif pada antibiotik, 4). *Phage therapy* yaitu bakteriofag dengan sifat spesifikannya mampu menyebabkan lisis terhadap bakteri patogen (Gambar 2.4).

Phage therapy telah banyak diketahui dan dimanfaatkan untuk menanggulangi beberapa bakteri patogen penyakit misalnya pemanfaatan bakteriofag untuk menekan penyakit *Pneumonia* (pernafasan) yang disebabkan bakteri *Streptococcus pneumoniae* (Loeffler *et al.*, 2001), pemanfaatan bakteriofag untuk menekan penyakit radang usus pada unggas yang disebabkan bakteri *Campylobacter jejuni* (Connerton *et al.*, 2004), pemanfaatan bakteriofag

untuk mengendalikan bakteri *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* pada tanaman kedelai yang menyebabkan penyakit hawar daun bakteri (Susianto *et al.*, 2014) serta pemanfaatan bakteriofag untuk mengendalikan bakteri *Bacillus cereus* pada makanan terfermentasi yang menyebabkan keracunan pada manusia (Oh *et al.* , 2017).



Gambar 2.4 Skema Terapi Bakteriofag (Sumber : Salmond *et al.*, 2015).

Eksplorasi bakteriofag yang menginfeksi bakteri *R. solanacearum* telah banyak diteliti dan berkembang pesat (Yamada, 2012). Fujiwawara *et al.* (2011) dan Addy *et al.* (2012; 2016) melaporkan tentang bakteriofag yang spesifik menyerang bakteri *R. solanacearum* dan potensinya didalam menjadi agen biokontrol.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan di CDAST (*Center for Development Advanced Science and Technology*) Divisi Biomolekular dan Bioteknologi, Universitas Jember. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2017 sampai Juni 2018.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian sampel tanaman tomat, cabai, terong dan tembakau yang diduga terserang bakteri *R. solanacearum* atau penyakit layu bakteri, media CPG (*Casaminoacid peptone glucose*) + *Triphenyl Tetrazolium Chlorida* (TZC), media nutrient agar (NA), top agar, SM- buffer, *double destiled water* (ddH₂O), etanol, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) *master mix*. Peralatan yang digunakan yaitu kamera digital, spektrofotometer, pipet, jarum ose, sentrifuge, tabung reaksi, mikro pipet, cawan petri, tabung eppendorf, vortex, autoklaf, laminair, mesin termocycler, gel documentation.

3.3 Metode

3.3.1 Pengambilan sampel tanaman inang *R. solanacearum*

Sampel berupa tanaman bergejala diambil dari wilayah pertanian di Kabupaten Jember, Kabupaten Banyuwangi, Kabupaten Bondowoso dan Kabupaten Situbondo, adapun tanaman yang menjadi obyek pengambilan sampel adalah tanaman tomat, cabai, terong dan tembakau, gejala pada obyek yang dijadikan sampel adalah tanaman yang menunjukkan penyakit layu bakteri seperti tanaman layu, daun menguning, kerdil, batang menghitam dan mengeluarkan lendir. Selanjutnya tanaman tersebut dicabut untuk digunakan menjadi objek isolasi bakteri, kemudian diberikan nomor identitas serta lokasi pengambilan. Sampel dimasukkan dalam kantong plastik dan dibawa ke laboratorium untuk proses isolasi patogen. Pengambilan sampel juga disertai dengan pengambilan data dari petani/pemilik lahan tentang riwayat budidaya, jumlah tanaman yang terdampak, kondisi cuaca serta pengendalian yang telah dilakukan.

3.3.2 Isolasi dan Purifikasi Isolat Patogen Layu Bakteri

Tanaman yang diduga terinfeksi patogen layu bakteri selanjutnya dibersihkan dari sisa tanah dan kotoran lainnya kemudian memotong bagian akar dan batang yang menjadi dimensi $\pm 1 \times 1$ cm dibersihkan dengan air mengalir, selanjutnya dicuci dengan alkohol 70% kemudian di bilas dengan air *steril* sebanyak 3 kali selanjutnya dikering anginkan, potongan sampel (1 cm \times 1cm) tersebut selanjutnya ditanam pada media CPG + TZC dan diinkubasikan selama 24-48 jam, bakteri yang tumbuh disekitar sampel kemudian di gores kembali pada media CPG + TZC baru untuk mendapatkan isolat murni, morfologi isolat murni dengan ciri-ciri bentuk koloni berwarna putih susu dengan bintik merah muda dibagian tengah, bulat tak beraturan serta nampak kebasah-basahan diambil dengan jarum *ose steril* untuk diperbanyak pada media CPG cair (inkubasi 24-48 jam) untuk dipreservasi pada suhu -60° C dalam gliserol 80% (Arwiyanto *et al.*, 2007; Setyari *et al.*, 2013)

3.4 Karakterisasi dan Identifikasi Isolat Patogen Layu Bakteri

3.4.1 Pengujian Hipersensitif Respon dan Pengujian Gram

Pengujian respon hipersensitif (HR) dilakukan dengan menginfiltrasikan suspensi isolat bakteri (kerapatan 5×10^6 sampai 1×10^9 cfu/ml) ke dalam jaringan daun tanaman tembakau melalui permukaan daun menggunakan jarum suntik *steril*, dan respon hipersensitif diamati setelah rentang waktu 12 jam sampai 48 jam (Wahyuni, 2010; Lozano dan Sequeira 1969). Pengujian Gram dilakukan dengan pendekatan kelarutan pada KOH dengan cara menambahkan 3 % KOH pada suspensi bakteri yang diletakkan pada *objek glass*, apabila suspensi bakteri menjadi kental dan berlendir maka bakteri tersebut bersifat Gram negatif (Addy ,2015; Gregersen, 1978).

3.4.2 Karakterisasi Molekuler

Koloni tunggal yang murni selanjutnya diambil dengan jarum *ose steril* yang di campur dengan ddH₂O *steril* dalam *ependorf* dan digunakan sebagai cetakan DNA atau disebut dengan direct PCR (Mirhendi *et al.*, 2007; Kimberly *et al.*, 2001). Selanjutnya proses PCR dilakukan dengan mencampurkan standart reaksi sesuai panduan PCR master mix yaitu PCR *master mix* sebanyak 5 µl, cetakan DNA sebanyak 1 µl, primer *Forward* dan *Reverse* masing-masing sebanyak 1 µl dan ddH₂O sebanyak 2 µl.

Tabel 3.1 Daftar primer yang digunakan

| No | Nama Primer | Urutan Sekuens | Target (Bp) |
|----|------------------|--|-------------|
| 1 | <i>fliC</i> | F (5' GAACGCCAACGGTGC GAACT 3') R (5'GGCGGCCTTCAGGGAGGTC 3') | 400 |
| 2 | RsSC | F (5' CCGAGCGCATATCGTTCACAC 3') R(5' TTTGGCGTTCGGTCCGGAG 3') | 296 |
| 3 | RsSA | F (5' CAACGATGCCTGGAAACTGACC 3') R (5'TGGTCCGGGTTCAAGTAAATGTCAC 3') | 132 |
| 4 | <i>Phyllo</i> 1F | F (5'CGTTGATGAGGCGCGCAATTT 3') R (5'TCGCTTGACCCTATAACGAGTA 3') | 144 |

Amplifikasi DNA menggunakan primer *fliC* dilakukan pada kondisi berikut : *predenaturasi* pada suhu 95°C selama 1 menit, *denaturasi* pada suhu 95°C selama 30 detik ,*annealing* pada suhu 56°C selama 30 detik, *elongasi* 72°C selama 40 detik, *final ektension* pada suhu 72°C selama 3 menit dengan jumlah 30 siklus (Addy *et al.*, 2016).

Proses amplifikasi DNA menggunakan primer RsSC dan primer RsSA dilakukan pada kondisi berikut : *predenaturasi* pada suhu 94°C selama 4 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit ,*annealing* pada suhu 62°C selama 1 menit, *elongasi* pada suhu 72°C selama 1 menit , *final ektension* pada suhu 72°C selama 10 menit dengan jumlah 35 siklus (Stulberg *et al.*, 2015).

Proses amplifikasi DNA menggunakan primer *phyllo* 1F dilakukan pada kondisi berikut : *predenaturasi* pada suhu 96°C selama 5 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 15 detik ,*annealing* pada suhu 50°C selama 30 detik, *elongasi*

72°C selama 30 detik, *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit dengan jumlah 35 siklus (She *et al.*, 2017; Siri *et al.*, 2011).

Hasil PCR selanjutnya dielektroforesis pada gel *agarose* konsentrasi 1% - 2% dilarutkan pada *buffer* 1×TAE yang ditambahkan dengan zat pewarna (*etidium bromide*) kemudian dengan arus listrik daya 100 volt selama 30- 45 menit, hasil *elektroforesis* divisualisasi dengan alat UV *gel documentation*.

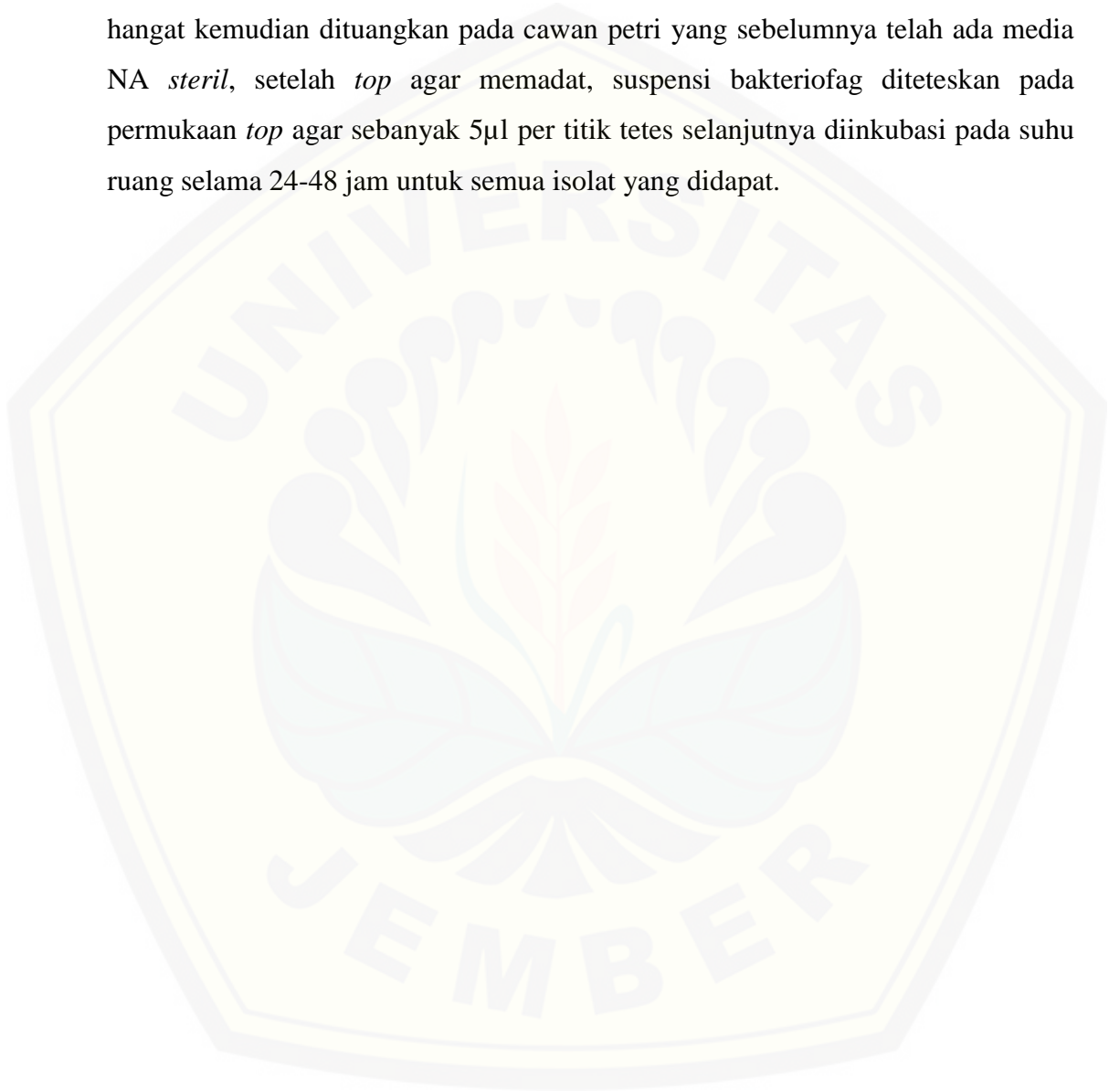
3.4.3 Perbanyak Partikel Bakteriofag dan Karakterisasi partikel

Perbanyak partikel bakteriofag murni dilakukan dengan mengacu pada Susianto *et al.* (2013) yaitu dengan pendekatan metode *plaque assay* dengan mencampurkan 100 µl filtrat partikel bakteriofag kedalam 250 µl suspensi bakteri kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang, selanjutnya suspensi tersebut dicampurkan dengan media top agar (0,45 % media NA) yang masih hangat kemudian dituangkan pada cawan petri yang sebelumnya telah ada media NA yang *steril* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam. Pengamatan morfologi partikel bakteriofag serta karakteristik genom dilakukan di USDA-ARS (*United States Department of Agriculture - Agriculture Research Service*), Washington, Amerika Serikat.

Secara singkat, partikel bakteriofag dimurnikan dengan menambahkan 1:1 volume chloroform dalam suspensi partikel bakteriofag (500 µl) dan di vortek sebelum disentrifugasi pada 10.000 rpm, suhu 4 °C, selama 5 menit. Sebanyak 400µl supernatant dipindahkan ke ependorf baru untuk kemudian diamati dengan menggunakan mikroskop electron Hitachi 7700. Untuk karakteristik Genom bakteriofag, sebanyak masing-masing 100 ng genom bakteriofag (diekstraksi menggunakan KIT *Phage DNA Isolation kit* (Norgen Biotek Corp, Canada)) diperlakukan beberapa enzim restriksi yaitu DNase I, RNase A, S1 *nuclease*, *Exonuclease I* (ThermoFisher, USA) dan *XhoI* (BioLabs, USA). Campuran tersebut dilakukan mengikuti protocol dari perusahaan dan divisualisasikan pada gel agarose 1%.

3.4.4 Pengujian kisaran inang

Pengujian kisaran inang mengacu pada Addy *et al.* (2016) dan Narulita *et al.* (2016) dengan pendekatan metode *spot test* yaitu yaitu dengan mencampurkan 250 μ l suspensi bakteri pada media *top* agar (0,45 % media NA) yang masih hangat kemudian dituangkan pada cawan petri yang sebelumnya telah ada media NA *steril*, setelah *top* agar memadat, suspensi bakteriofag diteteskan pada permukaan *top* agar sebanyak 5 μ l per titik tetes selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam untuk semua isolat yang didapat.



BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Sebanyak 24 isolat yang diduga bakteri penyebab layu bakteri yang diisolasi dari tanaman tomat, cabai, terong dan tembakau asal Jember, Banyuwangi, Bondowoso dan Situbondo menunjukkan hasil identifikasi dan determinasi molekuler sebagai berikut :

1. Diperoleh 24 isolat merupakan bakteri *R. solanacearum* ditunjukkan dengan teramplifikasinya primer spesifik *fliC* pada ukuran 400 bp dan digolongkan sebagai *R. solanacearum* spesies complex yang ditunjukkan dengan teramplifikasinya primer RsSC pada ukuran 296 bp.
2. Sebanyak 24 isolat digolongkan menjadi *R. solanacearum* phylotype 1 (*R. pseudosolanacearum*) yang berasal dari benua Asia yang ditunjukkan dengan teramplifikasinya primer *phyllo* 1F pada ukuran 144 bp.
3. Pengujian HR menunjukkan bahwa 24 isolat mengakibatkan gejala nekrotik coklat kehitaman disertai halo pada 36 jam setelah infiltrasi dan hal itu menjadi ciri khas dari *R. solanacearum* Ras 1.
4. Bakteriofag DT3A digolongkan masuk pada *Family Podoviridae* dengan jenis asam nukleat dsDNA dan bakteriofag DT3A mampu menyebabkan lisis 18 isolat dari total 24 isolat bakteri yang telah diisolasi dengan presentasi paling besar pada isolat asal tanaman tomat dan yang berasal dari Kabupaten Jember dan Kabupaten Banyuwangi.

5.2 SARAN

Penelitian selanjutnya diharapkan mampu mengeksplorasi bakteri *R. solanacearum* pada skala yang lebih luas baik dalam pengambilan sampel (daerah pengambilan sampel, topografi daerah serta jenis tanaman), sehingga dapat menjadi koleksi isolat yang lengkap serta eksplorasi formula pemanfaatan bakteriofag DT3A sebagai agen hayati/ *phage therapy* patogen layu bakteri yang mampu diamplikasikan di dunia pertanian modern.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2012. Utilization of filamentous phage ϕ RSM3 to control bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Dis. 96(8):1204-1209.
- Addy HS. 2015. Prinsip dan metode dasar bakteriologi tumbuhan. Jember : Jember University Press.
- Addy HS, Azizi NF, Mihardja PA. 2016. Detection of bacterial wilt pathogen and isolation of its bacteriophage from banana in Lumajang Area, Indonesia. International Journal of Agronomy Vol 2016 :1-8.
- Ahmed NH, Islam MR, Hossain MA, Meah MB, Hossain MM. 2013. Determination of races and biovars of *Ralstonia solanacearum* causing bacterial wilt disease of potato. Journal of Agricultural Science; Vol. 5, No. 6 :1-8.
- Anand ID, Ravikumar MR, Raghu S, Prabhu HV and Swamy MR. 2015. Specific and quick detection of *Ralstonia solanacearum* (E.F Smith) Yabuuchi *et al*, from infected rhizomes causing bacterial wilt of ginger by using PCR based Amplification of *fliC* gene coding for the flagella subunit. Journal of Pure and Applied Microbiology Vol 9: 1-7.
- Arwiyanto T. 2013. *Ralstonia solanacearum*, biologi, penyakit yang ditimbulkan dan pengelolaannya. Yogyakarta, Gadjah Mada university Press.
- Arwiyanto T, Yuniarsih F, Martoredjo T, Dalmadiyo G. 2007. Seleksi *Pseudomonad fluoresen* secara langsung di lapangan untuk pengendalian penyakit lincat pada tembakau. Jurnal HPT Tropika. Vol. 7, No. 1: 62 – 68
- Balamurugan A, Kumar A, Muthamilan M, Sakthivei K, Vibhuti M, Ashajyothi M, Sheoran N, Kamalakannan A, Shanti A, Arumugam T. 2017. outbreak of tomato wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in Tamil Nadu, India and elucidation of its genetic relationship using multilocus sequence typing (MLST). Eur J Plant Pathol : 1-10.
- Borkar GS and Yumlembam RA. 2017. Bacterial diseases of crop plants. New York, CRC Press.
- Bourgault AM And Lamothe F .1988. Evaluation of the KOH test and the antibiotic disk test in routine clinical anaerobic bacteriology. Journal of Clinical Microbiology, Vol. 26, No. 10 : 2144-2146.

- Budzik JM. 2000. *Phage* isolation and investigation. Undergraduate Journal of Scien. Vol. III, No. 1
- Campbell A. 2003. The future of bacteriophage biology. Nature Reviews Genetics volume 4 :471-477.
- Carlone GM, Valadez MJ and Pickett MJ.1982. Methods for distinguishing Gram-Positive from Gram- Negative bacteria. Journal of Clinical microbiology, Vol. 16, No. 6 : 1157-1159
- Champoiseau PG, Jones JB, Allen C. 2009. *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2 Causes tropical losses and temperate anxieties. Plant Management Network Journal : 1-10
- Cattlin N. 2018. https://www.mindenpictures.com/search/preview/bacterial-wilt-pseudomonas-solanacearum-on-matature-capsicum-chilli-pepper/0_80115720.html diakses pada tanggal 24 Mei 2018.
- Clemson Universty – USDA (United State Department of Agricultural), <https://www.ipmimages.org/browse/detail.cfm?imgnum=1436047> diakses pada Tanggal 17 Mei 2018.
- Connerton PL, Corriollo CM, Swift C, Dillin B, Scott A, Rees C, Dodd C, Frost J, and Connerton I. 2004. Longitudinal study of *Campylobacter jejuni* bacteriophages and their host from broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 70 :3877-3883.
- Cook, D., E. Barlow, and L. Sequeira. 1989. Genetic diversity of *Pseudomonas solanacearum*: detection of restriction fragment polymorphisms with DNA probes that specify virulence and hypersensitive response. Mol. Plant-Microbe Interact. 2 :113-121.
- Denny,TP. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* spesies.In S.S Gnanamanickam, Plant-Associated bacteria (pp.573-644). Amsterdam, Netherland: Springer
- Elbreki M, Ross PR, Hill C,O'Mahony J, McAuliffe O, CoffeyA. 2014. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. Journal of Viruses :1-20.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. Diagnostic protocols for regulated pests *Ralstonia solanacearum*. EPPO Bulletin 34 : 173 –178

- Fegan M and Prior P. 2005. How to complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. USA. APS Press
- Francis NR, Sosinsky GE, Thomas D, DeRosier DJ. 1994. Characterization and structure of bacteria flagellar motors containing the switch complex. J.Mol. Biol. 235 :1261-1270
- Goto M. 1992. Fundamentals of bacterial plant pathology. San Diego, California. Academic press inc.
- Gregersen T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram – positive bacteria. european j. appl. Microbiol, biotechnol 5 : 123-127.
- Hajam IA, Dar PA, Shahnawaz I, Jaume JC and Lee JH. 2017. Bacterial flagellin a potent immunomodulatory agent. Experimental & Molecular Medicine Journal Vol 49, E373 : 1-15
- Hartati SY and Karyani N.2014. Teknik inokulasi *Ralstonia solanacearum* untuk pengujian ketahanan nilam terhadap layu bakteri. Buletin Litro Vol 25 No 2 : 1-10
- Hayward AC.1964. Characteristic of *Pseudomonas solanacearum*. J.appl.Bact (2) : 266-277
- IPDN (The International Plant Diagnostic Network), 2004. Bacterial Wilt Disease (*Ralstonia solanacearum*), Standard Operating Procedure for Use in Diagnostic Laboratories : 1-24.
- Jones BJ, Vallad GE, Iriarte BF, Obradovic A, Wernsing HM, Jackson EL, Balogh B, Hong CJ, Momol TM. 2012. Considerations for using bacteriophages for plant disease control. Landes Bioscience Volume 2 issue 4: 208-214.
- Kersten JT, Huang H, Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. Journal of Bacteriology Vol. 183, No. 12 : 3597–3605
- Kimberly A. Vaughan F, Wimpee CF, Remsen CC., and Collins MLP. 2001. Detection of bacteria in environmental samples by direct PCR without DNA extraction. BioTechniques 31:598-607
- Kirtikar DM, Cathcart GR And Goldthwait DA. 1976. Endonuclease II, apurinic acid endonuclease, and exonuclease III. Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 73, No. 12 : 4324-4328,

- Kombrink E and Somssich IE. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Advances in Botanical Research* Vol . 21: 1-33
- Kovall RA And Matthews BW.1998. Structural, functional, and evolutionary relationships between I-exonuclease and the type II restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 95, : 7893–7897
- Kubota R, Vine BG , Alvarez AM, Jenkins DM. 2008. Detection of *Ralstonia solanacearum* by Loop-Mediated isothermal amplification. *The American Phytopathological Society journal* Vol. 98, No. 9 : 1045-1052.
- Lebeau A, Daunay MC, Frary A, Palloix A, Wang JF , Dintinger J , Chiroleu F, Wicker E, Prior P. 2011. Bacterial Wilt Resistance in Tomato, Pepper, and Eggplant: Genetic Resources Respond to Diverse Strains in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Journal The American Phytopathological Society* Vol. 101, No. 1. page 155-165.
- Loeffler JM, Nelson D, Fischetti VA. 2001. Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science* 94: 2170-2172.
- Lovett ST. 2011. The DNA exonucleases of *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 4(2) : 1-45.
- Lozano JC and Sequeira L. 1969. Differentiation of races op *Pseudomonas solanaceae* by a leaf infiltration technique. *Phytopathology journal* vol 60 : 833-839
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction : A practical approach. *Journal Of Clinical Laboratory Analysis* 16:47-51.
- Macnab RM. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 77–100
- Meng F. 2013 *Ralstonia solanacearum* species complex and bacterial wilt disease. *J Bacteriol Parasitol* Vol 2 :1-4.
- Minamino T and Imada K. 2015. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends in Microbiology* 1159 : 1-8
- Mirhendi H, Diba, K, Rezaei A, Jalalizand, Hosseinpur L, Khodadadi H. 2007. Colony-PCR is a rapid and sensitive method for DNA amplification in yeasts. *Iranian J Publ Health*, Vol. 36, No.1 :40-44

- Momol T, Pradhanang P, and Lopes CA. 2001. Bacterial wilt of pepper. Extension of Institute of Food and Agriculture, University of Florida. Fact Sheet PP 189 : 1-5
- Nadugala LMNS and Rakshit SK. 2007. The effect of DNaseI enzyme on food pathogens subjected to different food processing treatments. J. Natn ScL Foundation Sri Lanka 35(3) : 167-173
- Narulita E, Addy HS, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. 2016. The involvement of the PilQ secretin of type IV pili in *phage* infection in *Ralstonia solanacearum*. Biochemical and Biophysical Research Communications 469 : 868-872
- Norton J And Roth JS. 1967. A Ribonuclease specific for 2'-O-Methylated ribonucleic acid. the journal Of Biological Chemistry Vol. 242, No. 9, : 2029-2034
- Novik G, Ladutska A and Rakhuba D.2017. Bacteriophage taxonomy and classification. Badajoz. Formatex Research Center.
- O'Farrell PH, Kutter E and Nakanishi M. 1980. A restriction map of the bacteriophage T4 genome. Mol Gen Genet 179(2): 421-435.
- Oh H, Seo DJ, Jeon SB, Park H, Jeong S, Chun HS, Oh M, Choi C. 2017. Isolation and characterization of *bacillus cereus* bacteriophages from foods and soil. Food Environ Virol : 1-10.
- Orlova EV. 2012. Bacteriophages and Their Structural Organisation. Croatia: Intech-Open Access Publisher.
- Powers, EM. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining Gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. applied and environmental microbiology Vol. 61, No. 10 : 3756-3758
- Prior P, Ailloud F, Dalsing B L, Remenant B, Sanchez B and Allen C. 2016. Genomic and proteomic evidence supporting the division of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* into three species. BMC Genomics 17:90
- Raines RT. 1998. Ribonuclease A. Chem. Rev. 98, 1045-1065
- Ramirez AV, Abendroth J, Mejia AA, Phan IQ, Lorimer DD, Edwards TE and Aguilera RJ. 2017. Structure of acid deoxyribonuclease. Nucleic Acids Research Vol. 45, No. 10 : 6217-6227

- Revathi RM, Narayanaswamy H, Nagarajappa A and Seema MN. 2017. Integrated management of bacterial wilt of brinjal incited by *Ralstonia solanacearum*. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 7(1) : 271-273.
- Reddy PP. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria for horticultural crop protection. New Delhi. Springer Press.
- Rio BD, Martín MC, Ladero V, Martínez N, Linares DM., Fernández M and Alvarez MA. 2012. Bacteriophages in Dairy Industry: PCR Methods as Valuable Tools. Croatia: Intech-Open Access Publisher.
- Salmond CPG and Fineran CP. 2015. A century of the *phage*: past, present and future. Nature Reviews Microbiology : 1-10.
- Schein CH. 1997. From housekeeper to microsurgeon: the diagnostic and therapeutic potential of ribonucleases. Nat Biotechnol 15(6) :529-536.
- Sagar V, Gurjar MS, Arjunan J, Bakade RR, Chakrabarti SK, Arora RK, Sharma S. 2014. Phylotype analysis of *Ralstonia solanacearum* strain causing potato bacterial wilt in Karnataka in India. African journal of microbiology research. Vol 8 (12) : 1277-1281
- Schonfeld J, Heuer H, Elsas JDV, Smalla K. 2003. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments. Applied And Environmental Microbiology Vol. 69, No. 12 : 7248–7256.
- Seleim AMM, Kamal A. Elyousr MA, Abd-El-Moneem MK and Saeed AFF. 2014. First Report of Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* Biovar 2 Race 1 on Tomato in Egypt. Plant Pathol. J. 30(3) : 299-303.
- Setyari AR, Aini LQ, Abadi AL. 2013. Pengaruh pemberian pupuk cair terhadap penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tanaman tomat (*Lycopersicon esculentum* mill.) Jurnal HPT Volume 1 Nomor 2 : 80-88.
- She X, Yu L, Lan G, Tang Y and He Z. 2017. Identification and genetic Characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex isolates from *Cucurbita maxima* in China. Frontiers in Plant Science. Vol 8 :1-11.
- Siri MA, Sanabria A, Pianzola MJ. 2011. Genetic diversity and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in uruguay. Plant disease journal vol 95 no 10 : 1292 - 1301
- Somssich IE And Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants- a paradigm of biological complexity. Elsevier Science journal Vol. 3, No. 3 : 86-91

- Stulberg M.J, Shao J, Huang Q. 2015. A Multiplex PCR assay to detect and differentiate select agent strains of *Ralstonia solanacearum*. The American Phytopathological Society Journal plant disease 333-341.
- Stulberg MJ, Huanga Q. 2016. A computer program for fast and easy typing of a partial endoglucanase gene sequence into genospecies and sequevars 1&2 of the *Ralstonia solanacearum* species complex. Journal of Microbiological Methods 123 : 101–107
- Suhartiningsih. 2015. Kajian pengendalian penyakit layu bakteri *Ralstonia solanacearum* pada tomat dengan penyambungan. Disertasi. Yogyakarta. Program PascaSarjana. Universitas Gajahmada.
- Susianto G, Farid MM, Dhany NR, Addy HS.2014. Host range for bacteriophages that infect bacterial blight pathogen on soybean. Procedia enviromental sciense : 760-766.
- Wahyuni SW. 2010. Aspek biologi bakteri dan fitoplasma patogenik tumbuhan. Jember : Jember University Press.
- Winstanley C and Morgan JAW.1997. The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. mikrobilogy 143 : 3071-3084
- Yamada T. 2012. Bacteriophages of *Ralstonia solanacearum* : Their diversity and Utilization as biocontrol agents in agriculture. Intech 113-138.
- Zipfel C. 2008. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. Current Opinion in Immunology 20: 10-16