

Identifikasi Bakteri Penyebab Penyakit Utama pada Tanaman Hidroponik

DEWA AYU DIAH PUSPITASARI
I PUTU SUDIARTA*)
I MADE SUDARMA

Program Studi Agroekoteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Udayana
Jl. PB. Sudirman Denpasar 80362 Bali

*)Email: putusudiarta@unud.ac.id

ABSTRACT

Identification of Bacteria Causing the Main Diseases in Hydroponic Plants

Hydroponics is a horticultural cultivation technique using water as its growing medium. As the times progressed, people began to switch to planting with a hydroponic system, but this system was not completely free from pathogen attacks, one of which was bacteria. Therefore, this study aims to identify the types of bacteria that can infect hydroponic plants and determine the percentage of disease in hydroponic plants. The research implementation includes (1) calculating the percentage of disease, (2) sampling, (3) symptomatic plant isolation, (4) inoculation, (5) morphological classification, (6) detection of bacteria by PCR (Polymerase Chain Reaction), and sequencing analysis. The results showed that the percentage of attack on three plants, namely lettuce with soft rot symptoms, was 31.6% and celery with bacterial blight symptoms was 56.1%. The highest attack percentage was on tomato plants with bacterial wilt symptoms, reaching 69.1%. PCR results showed DNA bands measuring ± 1500 bp using general 16S rRNA primers (27F forward and 1492R reverse) on the three plants. Sequence analysis was continued on bacterial isolates from tomato plants because they had the highest percentage of attack. The nucleotide analysis of bacterial isolates in tomato plants indicated that the bacteria were a genus of *Pseudomonas* sp. Homology level of *Pseudomonas* sp. from Kesiman Village, East Denpasar District, Bali, after being traced and matched to the GenBank data in the NCBI program, it has similar homology with *Pseudomonas* from Iraq and India with a homology level of 89.86%, as well as from Egypt, New Zealand, and Germany with a sequence homology level of 89.19%.

Keywords: hydroponics, disease percentage, tomato, bacterial wilt, PCR, *Pseudomonas* sp.

1. Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Kebutuhan sayuran di Indonesia masih sangat tinggi, termasuk meningkatnya kebutuhan masyarakat yang mulai beralih mengkonsumsi sayuran sehat yang terbebas

dari pestisida dan hama penyakit (Aditya, 2018). Salah satu cara untuk memaksimalkan produksi sayuran didalam negeri yaitu melakukan budidaya tanaman hortikultura dengan memanfaatkan sistem hidroponik. Dalam budidaya tanaman sayuran hidroponik, tidak sepenuhnya dapat terlepas dari gangguan OPT (Organisme Pengganggu Tanaman). OPT yang dapat menyerang tanaman dapat disebabkan oleh hama dan penyakit, patogen dapat berasal dari bakteri, virus, dan jamur.

Hasil penelitian Fakhrunnisa (2017) tanaman tomat yang ditanam dengan sistem hidroponik pada PT. Amazing Farm, Bandung terserang penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas solanacearum* atau dikenal juga dengan nama *Ralstonia solanacearum*, gejala serangannya yaitu ditunjukkan dengan melunaknya daun dan batang serta berwarna cokelat.

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi apa saja jenis bakteri patogen yang menyerang tanaman hidroponik di Bali. Penelitian ini dapat dijadikan sebagai bahan referensi bagi akademisi serta petani sehingga mengetahui gejala penyakit yang muncul pada tanaman hortikultura dengan sistem hidroponik. Pengetahuan tersebut dijadikan dasar dalam metode pengendalian sehingga dapat menjaga stabilitas produksi tanaman hortikultura pada sistem hidroponik dan mengetahui persentase penyakit di setiap komoditi.

2. Metode Penelitian

2.1. Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan selama empat bulan mulai dari bulan Agustus 2020 sampai bulan November 2020. Kegiatan penelitian ini diawali dengan pengambilan tanaman contoh di tiga sentra kebun hidroponik yang berada di daerah Kota Denpasar, Kabupaten Badung, Kabupaten Buleleng. Lokasi ini ditentukan berdasarkan pada sentra hidroponik dengan sistem *Nutrient Film Technique* (NFT) yang memang terdapat pertanaman hortikultura. Pengamatan serta pengambilan sampel yang bergejala dilaksanakan kemudian dibawa ke Laboratorium Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian Universitas Udayana untuk dilakukan isolasi, inokulasi, uji gram, serta menghitung persentase penyakit, serta identifikasi secara molekuler.

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu cawan petri, jarum ose, jarum suntik, pinset, pembakar bunsen, tabung reaksi, vortex (*shaker*), *beaker glass*, *laminar air flow cabinet*, *autoclave*, *micro pipette*, *pipette tip*, Qiamp spin column, *collection tube* 2 ml, tube eppendorf, mesin sentrifugasi, alat elektroforesis, *transilluminator ultra violet*, rak tabung PCR, *object glass*, pisau, *erlenmeyer*, *sprayer*, botol kaca, gunting, saringan, alat tulis, masker, *hands glove*, dan kamera.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alkohol 70%, KOH 3%, akuades, daun tanaman bergejala, media PDA (250 gr kentang, 20 gr gula putih, 10 gr agar putih, 500 ml akuades), media NA, media NB, obat anti jamur ketokonazol, isolat DNA bakteri, bubuk agarose, H₂O, etidium bromida, *buffer* TBE, *buffer* TE,

buffer AL, buffer AE, proteinase K, ethanol 96%, buffer AW1, buffer AW2, GoTaq® Green Master Mix, nuclease free water, 1 kb DNA Ladder, primer general 16s rRNA untuk prokariot yaitu 27F forward (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R *reverse (5'-GGT TACCTTACGACTT-3')* plastik 2 kg, *plastic wrap*, kapas, *aluminium foil*.

2.3 Pelaksanaan Penelitian

2.3.1 Pembuatan media PDA (Potato Dextrose Agar)

Media PDA dan anti jamur dimasukkan kedalam tabung *erlenmeyer* yang ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*. Selanjutnya tabung *erlenmeyer* yang sudah berisi media PDA disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Setelah autoklaf dingin, media dikeluarkan kemudian dipindahkan kedalam *laminar air flow* untuk kemudian dituangkan kedalam cawan petri yang sudah disterilkan, kemudian tunggu hingga media padat dan siap digunakan (Dewi, 2019).

2.3.2 Pengambilan sampel tanaman sakit serta menghitung persentase penyakit

Pengambilan sampel dilakukan pada setiap ke tiga sentra hidroponik di Bali. Tanaman hortikultura yang diamati sebanyak tiga komoditi disetiap lokasi sentra hidroponik yang diambil dari tanaman tomat, selada, dan seledri yang bergejala, masing-masing komoditi diamati dan dihitung berapa jenis penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri kemudian dihitung persentase penyakitnya. Adapun rumus yang digunakan untuk menghitung persentase penyakit yaitu menggunakan rumus dari Mohammed *et al.* (1999):

$$PS = \frac{Nh}{Nt} \times (100\%)$$

Keterangan: PS = Persentase penyakit, Nh = Jumlah tanaman terserang, Nt = Jumlah tanaman yang diamati.

2.3.3 Isolasi dan inokulasi kandidat bakteri patogen

Isolat bakteri pada media PDA yang sudah tumbuh diambil menggunakan jarum *ose*, kemudian diletakkan kedalam media NA. Isolat bakteri diletakkan dengan menggunakan teknik penggoresan. Selanjutnya kultur murni dari isolat bakteri pada media NA kemudian diambil sebanyak mungkin untuk dimasukkan kedalam media NB, kemudian dikocok menggunakan vortex (*shaker*) dengan kecepatan 100 rpm selama ± 48 jam.

2.3.4 Uji patogenisitas

Hasil dari perbanyakan isolat bakteri pada media NB yang berumur ± 48 jam selanjutnya diinokulasikan pada tanaman hidroponik yang sehat dengan cara menyuntikkan dan menyiramkan patogen hasil isolasi. Jumlah suspensi bakteri yang disuntikkan ke tanaman sehat yaitu 10⁸ sel/m (Kerr, 1980 dalam Fanani, 2015).

Pengamatan dilakukan selama 4-5 hari sampai menimbulkan gejala yang sama dengan gejala awal ditemukan pada saat di lapang.

2.3.5 Identifikasi secara makroskopis

Pengamatan dengan identifikasi morfologi koloni maupun sel bakteri bertujuan untuk mengetahui karakteristik dan ciri bakteri yang didapatkan untuk keperluan identifikasi bakteri. Pengamatan morfologi koloni bakteri meliputi warna, bentuk, permukaan, dan tepi.

2.3.6 Identifikasi dengan metode uji gram dan motilitas bakteri

Metode yang digunakan yaitu dengan uji gram menggunakan cairan KOH 3%. Isolat bakteri diambil sebanyak 1 *ose* untuk digoreskan pada kaca objek yang sudah disteril, kemudian ditetaskan larutan KOH 3% sebanyak 3 ml di atas isolat setelah itu dilakukan penggoresan dan diaduk perlahan menggunakan jarum *ose*. Amati apakah bakteri tersebut memiliki suspensi yang lengket dan berlendir. Apabila isolat bakteri memiliki suspensi yang berlendir maka bakteri tersebut digolongkan ke dalam bakteri gram negatif, namun jika sebaliknya tidak terbentuk lendir maka bakteri digolongkan kedalam gram positif (Abegaz, 2007).

Pengamatan motilitas bakteri diamati dengan cara isolat bakteri diambil menggunakan jarum *ose* kemudian diletakkan diatas *object glass* untuk diamati pada mikroskop, isolat bakteri kemudian diamati apakah bakteri bergerak atau tidak. Apabila bakteri menunjukkan pergerakan maka bakteri tersebut disebut motil (memiliki flagel), namun jika sebaliknya tidak menunjukkan adanya pergerakan bakteri tersebut disebut nonmotil (tidak memiliki flagel).

2.3.7 Identifikasi secara molekuler

a. Isolasi DNA Total

Isolasi sampel DNA dilakukan menggunakan prosedur *Qiamp DNA Mini Kit* (250). Isolasi diawali dengan penyediaan kultur bakteri pada media padat. Biakkan bakteri diambil menggunakan jarum *ose* dan dimasukkan kedalam tabung mikro berukuran 1,5 ml yang sudah berisi *nuclease free water*, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Pelet yang terbentuk disuspensikan dengan dengan $\text{NH}_4\text{Cl} \pm 8$ ml, sentrifuse kembali pada kecepatan 3000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C. Hasil endapan pelet kemudian ditambahkan 10 ml PBS, lalu disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Supernatan dibuang, dan ditambahkan 10 ml PBS (*Power Bead Solution*) kemudian di sentrifuse pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit, setelah itu supernatan yang dihasilkan dibuang kembali, sehingga hanya terdapat larutan pelet dengan 2 ml PBS. Selanjutnya hasil isolasi DNA disimpan pada suhu -20°C sebelum diuji PCR.

Sebanyak 200 μL PBS dan 20 μL *Proteinase K* ditambahkan kedalam tabung 1,5 ml *microfuge*, kemudian ditambahkan 200 μL *buffer AL* kedalam sampel, kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik, lalu

diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit menggunakan *shaker water bath*. Setelah inkubasi, sampel disentrifuse selama 1 menit pada kecepatan 8000 rpm agar cairan diatas tutup dapat jatuh ke dasar tabung, sebanyak 200 µL *ethanol* 96% ditambahkan kedalam tabung dan di homogenkan dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik, sentrifuse tabung *microfuge* pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Masukkan campuran sampel kedalam *Qiamp spin column* (dalam 2 ml *collection tube*) dengan hati-hati tanpa membasahi rimnya, tutup dan sentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Tempatkan *Qiamp spin column* dalam 2 ml *collection tube* dan buang tube yang berisi filtrat. Buka tabung QSC dan tambahkan 500 µL *buffer* AW1, sentrifuse pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit, buka tabung QSC dan tambahkan *buffer* AW2 kedalamnya lalu sentrifuse kembali pada kecepatan 14000 rpm selama 3 menit

Saat akan membuka tutup harus hati-hati, sebanyak 200 µL *buffer* AE ditambahkan kedalam tabung QSC. Tahap terakhir adalah tabung *microfuge* diinkubasi pada suhu ruang 1-5 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. Filtrat DNA kemudian disimpan pada suhu -20 °C sebelum diuji dengan PCR.

b. Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA kromosom dengan teknik PCR menggunakan sepasang primer general 16S rRNA untuk prokariot yaitu 27F *forward* (5'AGAGTTTGATCCTGGC-TCAG-3') dan 1492R *reverse* (5'-GGTTACCTTACGACTT-3') yang digunakan Lane (1991) dengan target ampikon ± 1500 pb. Reaksi PCR dilakukan pada volume total 25 µL. Bahan-bahan PCR dicampur dalam tabung mikro 1.5 mL pada kondisi dingin di atas es. Sebanyak 1µL DNA template dimasukkan ke dalam tabung PCR. Bahan-bahan PCR yang telah dicampurkan dimasukkan ke dalam tabung PCR yang berisi DNA *template*. Selanjutnya tabung ditempatkan pada mesin PCR. Program PCR yang digunakan menggunakan metode dari (Dashti dkk, 2009) yaitu denaturasi awal pada suhu 95° C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 94° C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 57° C selama 1 menit, ekstensi pada suhu 70° C selama 1 menit, ekstensi akhir pada suhu 72° C selama 10 menit, dan dilakukan sebanyak 32 siklus.

c. Elektroforesis DNA

Produk hasil amplifikasi dianalisis menggunakan alat *Blued electrophoresis* dengan 1% gel agarose. Elektroforesis dilakukan pada 75 volt selama 28 menit. Hasil elektroforesis divisualisasikan dengan transilluminator ultraviolet. Pita DNA yang terbentuk pada hasil elektroforesis tersebut didokumentasikan dengan kamera digital.

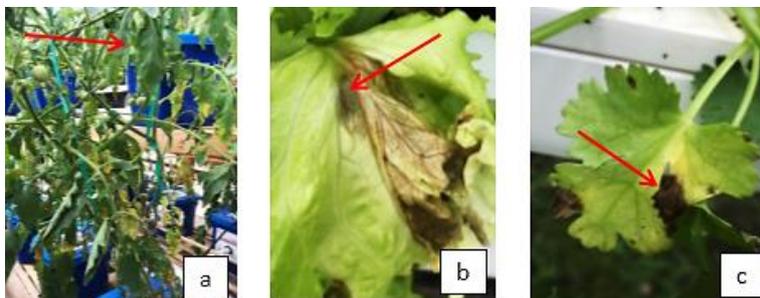
d. Analisis Nukleotida

Produk amplifikasi dikirim ke Macrogen (Singapore) untuk perunutan nukleotida. Hasil perunutan selanjutnya dianalisis menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) dengan program optimasi untuk memperoleh urutan basa DNA yang memiliki homologi dengan sekuen DNA yang terdapat dalam situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

3 Hasil dan Pembahasan

3.1 Gejala Penyakit yang Ditunjukkan dari Beberapa Komoditi Tanaman Hidroponik di Lapangan

Pengamatan gejala penyakit tanaman hidroponik dilakukan di Pondok Tani di Kota Denpasar dengan komoditi tomat, Rasa Farm di Kabupaten Badung dengan komoditi selada, serta Jansen Hydroponic di Kabupaten Buleleng dengan komoditi seledri. Ketiga lokasi tersebut merupakan sentra budidaya tanaman hortikultura menggunakan sistem hidroponik dengan metode NFT (*Nutrient Film Technique*). Umur tanaman pada saat dilakukan pengamatan dan pengambilan sampel yaitu berkisar antara \pm 3-5 minggu. Pada saat di lapang, tanaman tomat menunjukkan gejala penyakit layu bakteri, pada tanaman selada menunjukkan gejala penyakit busuk lunak, serta pada tanaman seledri menunjukkan gejala hawar daun.



Gambar 1. Gejala serangan oleh bakteri yang ditunjukkan pada tanaman hidroponik di lapang. (a) Gejala layu bakteri pada tomat, (b) Gejala busuk lunak bakteri pada selada, (c) Gejala hawar daun bakteri pada seledri.

Beberapa gejala penyakit yang ditemukan di lokasi pengambilan sampel disajikan pada Gambar 1. Gejala penyakit layu bakteri pada tanaman tomat hidroponik di kebun Pondok Tani Denpasar (Gambar 1.a), yang ditunjukkan di lapang yaitu seluruh pucuk tanaman layu, batang berubah menjadi cokelat dan membusuk, akar tanaman berubah warna menjadi warna cokelat dan mengeluarkan lendir. Hasil pengamatan di lapang juga menunjukkan beberapa tanaman yang sudah terinfeksi penyakit layu bakteri mengalami nekrosis. Gejala penyakit ini sama seperti yang sudah pernah ditemukan oleh Fakhrunnisa (2017), yaitu melaporkan bahwa tanaman tomat dengan gejala melunaknya daun dan batang berwarna cokelat, diserang penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas solanacearum*.

Gejala penyakit busuk lunak pada selada di kebun Rasa Farm Pelaga (Gambar 1.b), menunjukkan bagian leher tanaman berubah menjadi busuk, berwarna cokelat dan mengeluarkan lendir. Gejala penyakit ini dimulai dari bagian batang tanaman yang berubah warna menjadi cokelat dan akhirnya menyebar ke bagian leher tanaman. Penyakit busuk lunak ini disebabkan oleh bakteri patogen yang diduga berasal dari golongan *Erwinia* dan *Pseudomonas* seperti yang sudah pernah dilaporkan oleh Koohakan, dkk (2008) yang ditemukan di Thailand.

Gejala penyakit hawar daun bakteri pada seledri di kebun Jansen Hydroponic Pancasari (Gambar 1.c), menunjukkan bagian daun yang mulai menguning, pinggiran daun berubah warna menjadi cokelat, serta bagian batang tanaman berubah menjadi cokelat kemudian membusuk. Gejala penyakit serupa yang disebabkan oleh *Xanthomonas* juga dilaporkan oleh Wahyudi *et al.* 2011, bahkan pada serangan lanjut dilaporkan pula serangannya dapat menyebabkan warna daun berubah dari warna kuning menjadi cokelat, layu, kemudian mati.

3.2 Menghitung Presentase Penyakit

Adapun tabel persentase penyakit pada ke tiga komoditi yaitu sebagai berikut:

Tabel 1. Persentase Penyakit Tanaman dengan Sistem Hidroponik di Beberapa tempat perusahaan hidroponik.

Lokasi	Tanaman	Penyakit	Nh	Nt	Persentase Penyakit
Denpasar	Tomat	Layu Bakteri	83	120	69,1%
Pelaga	Selada	Busuk Lunak	57	180	31,6%
Pancasari	Seledri	Hawar Daun	46	82	56,1%

Keterangan: Nh = Jumlah tanaman terserang, Nt = Jumlah tanaman yang diamati.

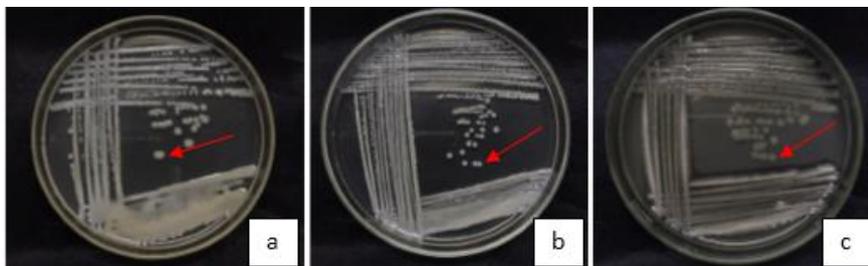
Tiga komoditas tanaman yang diamati pada tiga perusahaan hidroponik memiliki persentase penyakit yang berbeda (Tabel 1). Tanaman tomat dengan gejala penyakit layu bakteri menunjukkan persentase paling tinggi yaitu mencapai 69,1%, pada tanaman selada dengan gejala penyakit busuk lunak memiliki persentase 31,6%, serta pada tanaman seledri dengan gejala penyakit hawar daun memperoleh persentase sebanyak 56,1%.

Seperti yang pernah dilaporkan oleh Fakhrunnisa (2017) bahwa tanaman tomat peka terhadap serangan hama dan penyakit. Penyebab timbulnya penyakit pada tanaman tomat diduga karena sanitasi *greenhouse* yang tidak bersih seperti tidak membersihkan daun hasil rompesan, tunas air, ataupun buah hasil seleksi. Virus dan bakteri yang menyerang tanaman dapat menjadi sumber penyakit bagi tanaman disekitarnya baik melalui air drainase yang mengalir atau melalui luka pada jaringan tanaman akibat pemangkasan. Tanaman tomat yang sudah terserang patogen akan dapat menyebabkan tanaman menjadi layu kemudian mati. Maka dari itu perlu dilakukan pemeliharaan seperti mencabut tanaman yang layu untuk mengendalikan penyebaran hama dan penyakit dalam *greenhouse*.

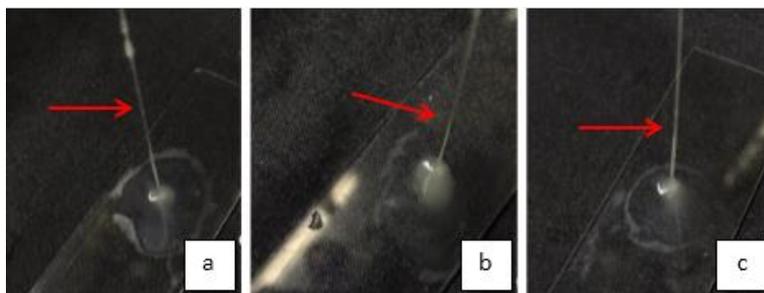
3.3 Isolasi dan Identifikasi Morfologi Isolat Bakteri Patogen pada Tanaman Sistem Hidroponik

Terlihat pada Gambar 2, koloni bakteri dari ketiga sampel membentuk bulatan-bulatan kecil yang terpisah, koloni tersebut merupakan isolat murni yang selanjutnya akan digunakan untuk uji postulat Koch. Pengamatan dari hasil uji gram menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri dari tanaman tomat, selada, dan seledri tersebut termasuk

kedalam golongan bakteri gram negatif, dimana dapat dilihat pada Gambar 3 bahwa isolat bakteri yang sudah ditetesi larutan KOH 3% tersebut menunjukkan terjadinya penggumpalan, memiliki suspensi yang kental, dan berlendir, hal ini terjadi karena penambahan KOH 3% dapat menghancurkan dinding sel bakteri (Marlina, 2008).

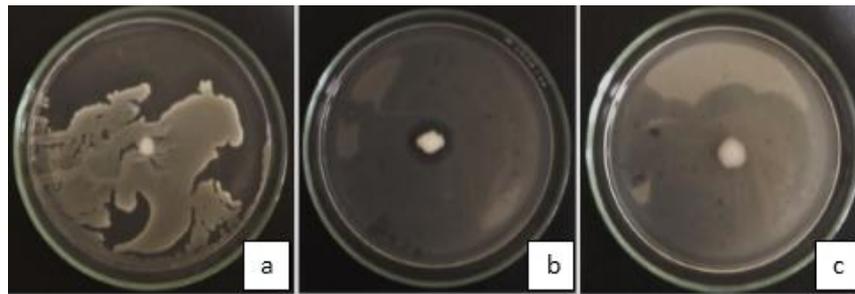


Gambar 2. Isolat murni hasil isolasi sampel tanaman bergejala. (a) Isolat murni bakteri dari tanaman tomat, (b) Isolat murni bakteri dari tanaman selada, (c) Isolat murni dari tanaman seledri



Gambar 3. Uji gram isolat bakteri patogen dengan KOH 3%. (a) Isolat bakteri pada tomat, (b) Isolat bakteri pada selada, (c) Isolat bakteri pada seledri

Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri yaitu ketiga koloni bakteri memiliki warna putih. Bentuk koloni bakteri pada tanaman tomat yaitu memiliki bentuk seperti akar (*rhizoid*), permukaannya datar (*flat*), serta tepian koloni yaitu seperti berlekuk (*lobate*). Bentuk koloni bakteri pada selada yaitu tidak beraturan (*irregular*), memiliki permukaan datar (*flat*), dan tepian koloni yaitu menyerupai gelombang (*undulate*). Bentuk koloni bakteri pada seledri yaitu melingkar (*circular*), dengan permukaan timbul (*raised*), serta tepian koloninya yaitu rata keseluruhan (*entire*). Hasil pengamatan morfologi koloni bakteri pada tanaman tomat, selada, dan seledri selanjutnya disajikan pada Gambar 4 dan telah dirangkum didalam Tabel 2.



Gambar 4. Pengamatan bentuk koloni bakteri pada media NA. (a) Bentuk koloni bakteri pada isolat A1, (b) Bentuk koloni bakteri isolat A2, (3) Bentuk koloni bakteri pada isolat A3

Hasil identifikasi morfologi melalui mikroskop menunjukkan bahwa ketiga isolat bakteri tersebut bersifat motil yaitu memiliki flagel yang digunakan untuk melakukan pergerakan sel. Menurut Pelczar dan Chan (1986) pengujian pada motilitas bakteri dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pergerakan sel, yang dimungkinkan oleh adanya flagel. Hasil pengamatan motilitas bakteri ini telah dicantumkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil identifikasi morfologi isolat bakteri patogen.

Kode Isolat	Nama Isolat	Uji Gram	Warna Koloni	Bentuk Koloni	Permukaan	Tepi	Motilitas
A1	Tomat	-	Putih	<i>Rhizoid</i>	<i>Flat</i>	<i>Lobate</i>	M
A2	Selada	-	Putih	<i>Irregular</i>	<i>Flat</i>	<i>Undulate</i>	M
A3	Seledri	-	Putih	<i>Circular</i>	<i>Raised</i>	<i>Entire</i>	M

Keterangan: (-) = gram negatif, (M) = Motil.

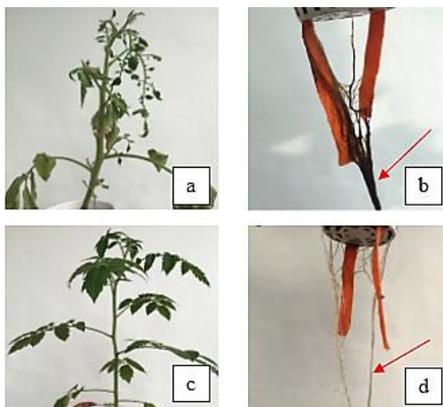
3.4 Inokulasi Bakteri Patogen pada Tanaman Sehat

Inokulasi dilakukan pada tanaman sehat yaitu pada tanaman tomat, selada, dan seledri dengan menandai bagian daun dan batang (2-4) titik. Bagian yang sudah ditandai kemudian diinjeksikan inokulum pada bagian punggung daun dan batang tanaman. Pada saat inokulasi disediakan perlakuan dengan akuades. Tanaman kemudian diamati selama 3-4 hari sampai menimbulkan gejala penyakit. Proses inokulasi ini bertujuan untuk mengetahui adanya kemiripan gejala pada tanaman saat pengambilan sampel di lapang dengan tanaman tomat, selada, dan seledri sehat yang diinjeksikan inokulum, sehingga nantinya dapat dilakukan identifikasi lebih lanjut pada bakteri yang menyerang tanaman tomat hidroponik di Kota Denpasar, selada hidroponik di Kabupaten Badung, serta seledri hidroponik di Kabupaten Buleleng.

Pada tanaman tomat sehat yang sudah diinjeksikan inokulum dari isolat A1 kemudian diamati sampai menimbulkan gejala, tanaman tomat sehat mulai menimbulkan gejala hasil inokulasi pada hari kedua, dimana gejala terlihat pada pucuk daun yang mulai layu, pada hari ketiga seluruh daun tanaman mengalami layu, serta

pada akar tanaman mulai berubah warna menjadi cokelat. Pada hari kelima daun semakin layu dan berubah warna menjadi kuning serta akar yang berwarna cokelat mengeluarkan lendir seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.

Gejala penyakit hasil inokulasi isolat A2 pada tanaman selada sehat muncul pada hari ketiga dengan gejala bercak cokelat pada pinggiran daun, bercak kemudian terus muncul dan bertambah pada seluruh bagian daun tanaman selada pada hari keempat seperti terlihat pada Gambar 6. Pada hari keempat bagian batang daun mengalami perubahan warna cokelat dan menjadi busuk. Gejala ini semakin hari semakin parah sehingga menyebabkan tanaman membusuk, berlendir, dan akhirnya mati, seperti yang terlihat pada Gambar 6.



Gambar 5. Gejala penyakit pada tanaman Tomat sehat hasil inokulasi bakteri isolat A1. (a) Gejala layu pada daun tanaman tomat, (b) Gejala membusuk pada akar dan perubahan warna akar menjadi cokelat. (c) Kontrol tanaman tomat sehat pada daun, (d) kontrol tanaman tomat sehat pada akar



Gambar 6. Gejala penyakit pada Selada sehat hasil inokulasi bakteri isolat A2. (a) Gejala bercak cokelat pada pinggiran daun pada hari ketiga, (b) Gejala busuk muncul pada batang pada hari keempat

Pada tanaman seledri, gejala belum muncul pada hari pertama sampai hari ketiga dan tanaman seledri masih terlihat sehat seperti yang terlihat pada Gambar 7. Gejala serangan hasil inokulasi kemudian muncul pada hari keempat dengan menunjukkan

gejala tanaman mulai layu, serta daun tanaman mengering. Hari kelima seluruh tanaman layu dan mati seperti yang ditunjukkan pada Gambar 7.

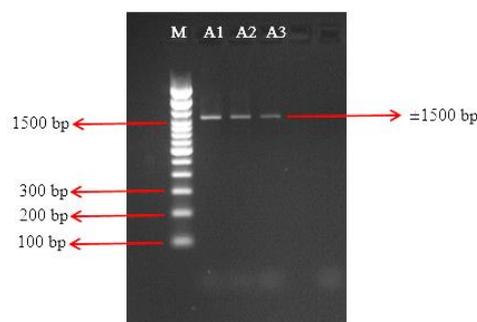


Gambar 7. Gejala penyakit pada Seledri sehat hasil inokulasi bakteri isolat A3. (a) Pengamatan hari pertama, (b) Gejala layu pada tanaman setelah 3-5 hari inokulasi

3.5 Deteksi Produk PCR dengan elektroforesis

Ketiga sampel DNA Tomat (A1), Selada (A2), Seledri (A3) selanjutnya diamplifikasi dengan PCR menggunakan primer general 16S rRNA (27F *forward* dan 1492R *reverse*) melalui tahapan denaturasi, annealing, dan ekstensi sebanyak 32 siklus. Kemudian produk hasil amplifikasi PCR di running pada elektroforesis selama 28 menit dengan tegangan 75 volt. Hasil elektroforesis memperoleh pita DNA berukuran ± 1500 bp dengan ukuran marker 100 bp yang berhasil diamplifikasi dengan primer 27F *forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R *reverse* (5'-GGT TACCTTACGACTT-3') pada ketiga sampel DNA yang telah ditunjukkan pada Gambar 8.

Hasil elektroforesis menyatakan bahwa primer general 16S rRNA (27F *forward* dan 1492R *reverse*) berhasil diamplifikasi yang mengindikasikan bahwa pita DNA pada Gambar 8. menunjukkan positif bakteri seperti yang pernah dilaporkan oleh (Inayatul dkk, 2018) yang berhasil mendeteksi keberadaan bakteri *Pseudomonas stutzeri* menggunakan primer yang sama yaitu 27F *forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') dan 1492R *reverse* (5'-GGT TACCTTACGACTT-3') dan memperoleh pita DNA sepanjang ± 1500 bp.



Gambar 8. Hasil elektroforesis pada DNA Tomat, Selada, dan Seledri menggunakan PCR dengan primer general 16S rRNA (27F *forward* dan 1492R *reverse*). (M = Marker), (A1 = Tomat, A2 = Selada, A3 = Seledri).

3.6 Sekuensing DNA Bakteri Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tomat

Sampel DNA yang yang dikirim untuk sekuen hanya pada sampel DNA tomat (A1) saja, hal ini dikarenakan tomat memiliki persentase serangan paling tinggi, serta gejala serangan hasil isolasi sesuai dengan gejala di lapang. Produk PCR DNA bakteri penyebab penyakit layu bakteri pada tanaman tomat (A1) selanjutnya dikirim ke PT. Indolab Utama untuk selanjutnya dilakukan sekuensing pada MacroGen Singapura.

3.7 Analisis Runutan Nukleotida DNA Bakteri Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Tomat

Hasil sekuen sampel DNA bakteri yang diambil dari tanaman tomat (A1) di Bali di BLAST di NCBI dan menunjukkan hasil bahwa bakteri tersebut dekat dengan genus *Pseudomonas*. Hasil sekuen di Bali kemudian ditelusuri dan dicocokkan kemiripan/similaritasnya dengan sekuen bakteri *Pseudomonas* sp. yang ada pada data NCBI dengan nomor aksesinya yaitu MW 0850291 (Iraq), JF 8009251 (India), KF 4079901 (Mesir), AF 3209941 (Selandia Baru), AY 2671921 (Jerman) yang dipilih untuk analisis nukleotida.

Hasil analisis nukleotida dari sampel bakteri yang ditemukan pada tanaman tomat (A1), Desa Kesiman, Kecamatan Denpasar Timur, Bali, menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki kesamaan homologi berkisar antara 89.19% sampai 89.86% dengan genus *Pseudomonas*. Sekuen bakteri yang berasal dari Negara Iraq dan India menunjukkan homologi sekuen sebesar 89.86%, dan homologi sekuen sebesar 89.19% berasal dari Negara Mesir, Selandia Baru dan Jerman. Namun hasil analisis nukleotida ini belum sepenuhnya bisa mengidentifikasi sampai tingkat spesies karena kedekatannya tidak ada yang mencapai 95-100%, maka hanya bisa disimpulkan sampai tingkat genus saja.

Informasi tabel hasil analisis nukleotida bakteri *Pseudomonas* sp. yang diambil di Desa Kesiman, Kecamatan Denpasar Timur, Bali dan *Pseudomonas* sp. dari berbagai Negara diuraikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Homologi (%) Sekuen Nukleotida *Pseudomonas* sp. di berbagai Negara.

Nama Isolat	Homologi (%)		
	Layu Bakteri Tomat	Nomor Aksesinya	Negara
<i>Pseudomonas tolaasii</i> 1077	89.86	MW085029.1	Iraq
<i>Pseudomonas tolaasii</i> strain PB2RP1(1)	89.86	JF800925.1	India
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain H40	89.19	KF407990.1	Mesir
<i>Pseudomonas tolaasii</i> strain NZ027	89.19	AF320994.1	Selandia Baru
<i>Pseudomonas veronii</i>	89.19	AY267192.1	Jerman

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan yang tertera di atas, maka dapat diambil kesimpulan bahwa, terdapat penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada tanaman dengan sistem hidroponik. Persentase penyakit paling tinggi yaitu pada tanaman tomat sebesar 69,1%, pada tanaman selada sebesar 31,6%, serta pada tanaman seledri sebesar 56,1%. Jenis bakteri patogen utama khususnya pada tanaman tomat hidroponik yaitu berasal dari genus *Pseudomonas* sp. yang didapat dari hasil sekuensing serta analisis nukleotida yang kemudian dicocokkan dengan data yang terdapat pada *GenBank*.

Daftar Pustaka

- Abegaz, K. 2007. Isolation, Characterization and Identification of Lactic Acid Bacteria Involved in Traditional Fermentation of Borde an Ethiopian Cereal Beverages. *African Journal of Biotechnology*. 6(12): 1469-1478.
- Aditya, I. G. N. G. 2017. Efisiensi Penggunaan Pupuk Majemuk terhadap Pertumbuhan dan Produksi Baby Kailan (*Brassica oleracea* L.) dengan Hidroponik Sistem Sumbu. Bogor Agricultural University (IPB).
- Dashti, Al. A., Jadaon, Mehrez M., Abdulsamad, M Abdulsamad., Dashti, Hussein M. 2009. *Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques*. Department of Surgery, Faculty of Medicine, Health Science Center, Kuwait University, Kuwait. 41(2): 117-122.
- Dewi, N. L. P. N.. 2019. Isolasi Jamur Endofit Pada Tanaman Anggur Bali (*Vitis vinifera* L. var. Alphonso Lavalley) Serta Efektivitasnya untuk Menekan Pertumbuhan Penyakit Busuk Kapang Kelabu Pada Buah Anggur Bali. Konsentrasi Perlindungan Tanaman Program Studi Agroekoteknologi Fakultas Pertanian Universitas Udayana.
- Fakhrunnisa, E. 2017. Produksi Tomat Cherry Dan Tomat Beef Dengan Sistem Hidroponik Di Pt Amazing Farm, Bandung. Bogor Agricultural University (IPB).
- Fanani, A. K., Abadi, A.L., Aini, L.Q. 2015. Eksplorasi Bakteri Patogen pada Beberapa Spesies Tanaman Kantong Semar (*Nepenthes* Sp.). Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya, Malang. 3(3):104-110.
- Inayatul, O. W., Muchlissin, I. S., Mukaromah, A. H., Darmawati, S., Ethica, S. N. 2018. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Bakteri Penghasil Enzim Protease *Pseudomonas stutzeri* ISTD4 dari Tempe Gembus Pasca Fermentasi 1 Hari. Fakultas Ilmu Keperawatan dan Kesehatan UNIMUS. Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Diponegoro, Semarang. 102-109.
- Koohakan, P., Jeanaksorn, T., Nuntagij, I. 2008. Major Diseases of Lettuce Grown By Commercial Nutrient Film Technique In Thailand. *Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand*. 2(8):56-63.
- Marlina. 2008. Identifikasi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dengan metode biolog dan deteksi gen ToxRnya secara PCR. *J. Sains Teknologi Farmasi* 13:11-17.
- Mohammed, A. A., C. Mak, K. W. Liew., Y. W. Ho. 1999. Early Evaluation Banana Plants at Nursery Stage for *Fusarium* Wilt Tolerance. dalam *Banana Fusarium with Manageman. Towards sustainable cultivation. Proc. of the Int. workshop of the banana Fusarium wilt disease, Malaysia 18-20 October 1999*. Hal: 147-186.
- Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi* 1. Jakarta: Universitas Indonesia Press.

Wahyudi, A.T., Meliah, S., Nawangsih, A. A. 2011. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* bakteri penyebab hawar daun pada padi: isolasi, karakterisasi, dan telaah mutagenesis dengan transposon. *Makara Sains*. 15(1):89-86.