

## JURNAL METAMORFOSA

### Journal of Biological Sciences

eISSN: 2655-8122

<http://ojs.unud.ac.id/index.php/metamorfosa>

#### Identifikasi Bakteri Penyebab Penyakit Layu Bakteri pada Tanaman Kentang (*Solanum tuberosum* L.) di Desa Taman Tanda, Tabanan, Bali

#### Identification of Bacteria Caused Bacterial Wilt Disease in Potato Plants (*Solanum tuberosum* L.) in Taman Tanda Village, Tabanan, Bali

I Komang Adi Widyastama<sup>1\*</sup>, Retno Kawuri<sup>2</sup>, Made Pharmawati<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Program Studi Magister Ilmu Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jalan PB Sudirman, Denpasar, Bali

<sup>2,3</sup> Program Studi Ilmu Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, Jalan Raya Kampus UNUD Jimbaran, Badung, Bali

\*Email: [adiwidyastama@gmail.com](mailto:adiwidyastama@gmail.com)

#### INTISARI

Salah satu masalah utama pada budidaya tanaman kentang di Desa Taman Tanda adalah serangan penyakit layu bakteri yang disebabkan oleh patogen bakteri. Penyebab layu bakteri adalah bakteri dari famili Ralstoniaceae. Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi bakteri penyebab layu bakteri pada tanaman kentang di Desa Taman Tanda, Tabanan, Bali. Metode identifikasi diawali dengan isolasi patogen dari tanaman kentang yang sakit di lapangan menggunakan media selektif *Ralstonia casein peptone glukose*. Koloni yang tumbuh pada media selektif kemudian dikarakterisasi morfologi dan biokimia. Uji patogenitas patogen (Postulat Koch) dilakukan dengan menginokulasi patogen pada tanaman kentang berumur 30 hari di rumah kaca. Tanaman kentang yang menunjukkan gejala layu bakteri seperti layu kering pada daun dan batang tanaman dikonfirmasi sebagai *Ralstonia* sp. Isolat patogen kemudian diekstraksi gen 16S rRNA dan diamplifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer *forward* U1 (5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG'3) dan primer *reverse* U2 (5'ATCGG(C/T)TACCTTGTACGACTTC'3). Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan satu arah dengan mengirim DNA ke PT. Genetika Science, Jakarta. Hasil sekuensing kemudian dianalisis BLASTN dengan membandingkan pusat data di GenBank. Analisis BLASTN menunjukkan isolat patogen teridentifikasi sebagai *Ralstonia solanacearum* strain K60-1 dengan kemiripan 100%. Dendrogram dari isolat patogen dibuat dengan metode *neighbor joining tree* 1000 kali bootstrap. Berdasarkan identifikasi morfologi, biokimia, Postulat Koch, dan molekuler bakteri penyebab layu bakteri pada tanaman kentang di Desa Taman Tanda, Tabanan, Bali teridentifikasi sebagai *Ralstonia solanacearum*.

Kata kunci: isolasi, gen 16S rRNA, *Raltonia* sp.

#### ABSTRACT

One of the main problems in potato cultivation in Taman Tanda Village is bacterial wilt disease caused by pathogenic bacteria. The cause of bacterial lay is bacteria from the Ralstoniaceae family. The purpose of this study was to identify the bacteria that cause bacterial wilt in potato plants in Taman Tanda Village, Tabanan, Bali. The method begins with the isolation of pathogens from diseased potato plants in the field using *Ralstonia casein peptone glucose* selective media. Colonies grown on selective media were then characterized morphologically and biochemically. The pathogenicity test (Koch's postulates) was carried out by inoculation of the pathogen on 30-day-old potato plants in a greenhouse.

Potato plants showing bacterial symptoms such as dry wilting on leaves and stems were confirmed as *Ralstonia* sp. The isolates were then extracted with 16S rRNA gene and amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) method using forward primer U1 (5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG'3) and reverse primer U2 (5'ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC'3). Sequencing of 16S rRNA gene was carried out in one direction by sending DNA to PT. Genetics, Jakarta. The results of the sequencing were then analyzed by BLASTN by comparing the data in GenBank. BLASTN analysis showed the pathogen isolate as *Ralstonia solanacearum* strain K60-1 with 100% virtue. The dendrogram of the pathogen isolates was made using the neighbor join tree method 1000 times bootstrap. Based on morphology, biochemistry, Koch's postulates, and molecular the cause of bacterial wilt in potato plants in Taman Tanda Village, Tabanan, Bali identified as *Ralstonia solanacearum*.

**Keyword:** isolation, 16S rRNA gene, *Ralstonia* sp.

## PENDAHULUAN

Desa Taman Tanda yang terletak di Bedugul, Tabanan adalah salah satu sentra produksi kentang di Bali. Kondisi iklim dan lingkungan yang dingin di Bedugul cocok untuk budidaya tanaman kentang. Kendala utama dalam budidaya tanaman kentang salah satunya adalah serangan hama dan penyakit. Penyakit yang umum pada kentang adalah layu bakteri atau *bacterial wilt disease*, yang disebabkan oleh patogen dari famili Ralstoniaceae (*Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia solanacearum*, *Ralstonia syzygii*, *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia insidiosa*) (Choiryah dan Nurcahyanti, 2019). Kerusakan akibat penyakit layu bakteri menyebabkan kematian hingga 75% pada budidaya tanaman kentang (Semangun, 1989).

Patogen penyebab layu bakteri menginfeksi tanaman melalui air, tanah, benih, atau luka pada tanaman akibat gesekan pada alat pertanian yang kemudian berkembang biak pada pembuluh vaskuler tanaman. Gejala layu bakteri pada tanaman kentang dicirikan dengan layu tanaman disertai dengan pembusukan pada batang dan umbi kentang. Patogen ini selain menyebabkan penyakit layu bakteri pada kentang juga menyerang tanaman inang lain, seperti tanaman tomat, terung, cabai, paprika, kacang dan jahe (Peeters *et al.*, 2013). Patogen layu bakteri berkembang dengan baik pada suhu lingkungan antara 24°C – 35°C. Peningkatan populasi patogen juga dipengaruhi oleh suhu, pH dan curah hujan yang banyak sehingga tingkat keparahan patogen ini berbeda pada

lingkungan yang berbeda (Coutinho dan Wingfield, 2017).

Berbagai penelitian untuk mengendalikan bakteri ini sedang dilakukan seperti mengeksplorasi agen pengendali hayati. Isolasi dan identifikasi bakteri penyebab layu bakteri penting dilakukan untuk menunjang usaha pengendalian penyakit ini pada tanaman kentang. Metode identifikasi molekuler memiliki sensitivitas dan spesivitas yang tinggi. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan isolasi dan identifikasi molekuler terhadap bakteri penyebab layu bakteri di Desa Taman Tanda, Tabanan, Bali.

## BAHAN DAN METODE

### Isolasi Bakteri

Bakteri patogen diisolasi dari tanaman kentang varietas Granola yang menunjukkan gejala umum penyakit layu bakteri. Isolasi patogen mengikuti metode Yuliasari *et al.* (2015). Batang tanaman yang sakit dipotong ±5 cm dan disterilkan permukaannya menggunakan 2% natrium hipoklorit lalu dibilas dengan air steril yang diulang tiga kali. Batang tanaman kemudian dicelupkan pada air steril 10 mL dalam tabung reaksi dan ditekan dengan pinset steril hingga keluar suspensi bakteri seperti lendir berwarna coklat. Suspensi bakteri kemudian diencerkan hingga 10<sup>-2</sup>. Pengenceran dari 10<sup>-2</sup> dituang sebanyak 1 mL secara *pour plate* ke dalam Petri berisi media selektif *Ralstonia* casein pepton glucose agar (CPGA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Koloni tunggal dengan morfologi seperti susu, putih pucat, datar, tidak beraturan, dan fluidal setelah inkubasi teridentifikasi sebagai *Ralstonia* sp. (Chamedjeu *et al.*, 2018). Koloni bakteri kemudian di-*streak* ke media NA dalam cawan Petri untuk memperoleh koloni tunggal murni dan diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni tunggal murni dengan morfologi seperti *Ralstonia* sp. yang tumbuh kemudian diinokulasikan ke media NA miring pada tabung reaksi sebagai *stock culture*. Isolat patogen yang telah diisolasi kemudian diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis, dan biokimia berdasarkan buku Bergey's Manual of Determination of Bacteriology (Holt *et al.*, 1994). Sementara pengujian biokimia dilakukan dengan uji katalase, *tripple sugar iron agar* (TSIA), indol, Simmon sitrat, dan reduksi gula (glukosa, laktosa, maltosa, sukrosa, dan manitol) lalu dilanjutkan dengan pengujian Postulat Koch.

### Uji Postulat Koch

Pengujian Postulat Koch dilakukan dengan menginokulasi isolat patogen yang telah ditumbuhkan dalam media Nutrient Broth (NB) sebanyak 5 mL pada tanaman kentang usia 30 hari. Tanaman kentang ditumbuhkan di *green house* dan diamati gejala layu bakteri yang muncul. Patogenitas isolat bakteri terkonfirmasi apabila tanaman kentang menunjukkan gejala layu bakteri seperti daun dan batang tanaman menjadi layu dan kering. Tanaman yang sakit kemudian diambil dan diisolasi patogen penyebab penyakitnya sesuai Yuliasari *et al.* (2015).

### Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA dilakukan berdasarkan metode Doyle and Doyle (1990). Isolat bakteri disiapkan dalam media NB 5 mL lalu 1 mL suspensi kultur *disentrifuge* pada kecepatan 12000 rpm selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL buffer lisis yang mengandung 2% CTAB, Tris-HCL pH 8, 50 mM EDTA dan 5 mM NaCl. Campuran kemudian digerus dengan tip untuk menghancurkan sel secara fisik. Selanjutnya campuran divorteks dan diinkubasi pada suhu

65°C selama 10 menit. Campuran kemudian ditambahkan 1mL larutan kloroform : isoamilalkohol (24:1). Campuran divortex dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit. Lapisan atas dari campuran kemudian dipindahkan ke tabung baru dan diulangi lagi pemberian larutan kloroform : isoamilalkohol. Campuran divorteks dan disentrifuge selama 5 menit. Lapisan atas dari campuran diambil lagi dan dipindahkan ke tabung baru. Supernatan kemudian ditambahkan etanol dingin sebanyak 1 mL dan disentrifuge dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Supernatan kemudian dibuang dan pelet DNA dicuci dengan 500 µL alkohol 70%. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 3 menit. Selanjutnya, alkohol 70% dibuang dan pelet DNA dikeringanginkan. Setelah kering DNA ditambahkan 100 µL H<sub>2</sub>O steril dan disimpan dalam suhu -20°C.

Elektroforesis dilakukan untuk mengecek keberadaan DNA hasil ekstraksi. Elektroforesis dilakukan dengan membuat gel agarose 1% dalam buffer 1x TAE dan ditambah 3 µL ethidium bromida (EtBr). Gel kemudian direndam pada kotak katoda anoda dengan buffer TAE. Selanjutnya campuran 2 µL DNA dan 1 µL *loading dye* dimasukkan ke dalam sumur gel dan elektroforesis dilakukan selama 30 menit pada 100 Volt. DNA ladder 100 bp digunakan untuk mengetahui ukuran pita DNA produk PCR. Visualisasi DNA dilakukan dengan menggunakan UV transilluminator.

### Amplifikasi dan Sekuensing Gen 16S rRNA

Gen 16S rRNA diamplifikasi dengan mesin *Polymerase Chain Reaction* XPCycler BIOER menggunakan primer umum, yaitu primer *forward* U1 (5'CCAGCAGCCGCGGTAATACG'3) dan primer *reverse* U2 (5'ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC'3) (Rohit *et al.*, 2016). Komposisi master mix PCR untuk masing-masing bakteri yang diuji terdiri dari 2.5 µL buffer PCR (Promega), 3 µL MgCl<sub>2</sub>, 1.5 µL primer forward, 1.5 µL primer reverse, 5 µL dNTP, 0.2 µL enzim Taq polimerase (Promega), 2 µL DNA template dan 9.3 µL H<sub>2</sub>O (total volume 25 µL). Kondisi PCR yang

digunakan adalah pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 56°C selama 1 menit, *extention* pada suhu 72°C selama 2 menit, dan final *extention* pada suhu 72°C selama 10 menit dilakukan sebanyak 35 siklus. DNA hasil amplifikasi kemudian dikonfirmasi dengan metode elektroforesis. Sekuensing DNA kemudian dilakukan satu arah menggunakan primer *forward* dan *reverse* dengan mengirimkan 22 µL produk PCR *Ralstonia* sp. ke PT. Genetika Science, Jakarta, Indonesia.

### Analisis BLAST dan Konstruksi Dendogram

Hasil sekuensing dari gen 16S rRNA *Ralstonia* sp. kemudian dibandingkan dengan GeneBank di NCBI menggunakan program BLAST-N untuk mengetahui spesies yang homolog dengan urutan DNA. Dendogram dibuat berdasarkan metode *neighbor joining tree* dengan uji *bootstrap* 1000 kali menggunakan software Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6.0 (MEGA 6.0).

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan pengamatan pada tanaman di kebun kentang Desa Taman Tanda bulan Juli tahun 2021, 33% dari 834 tanaman berusia 60 hari menunjukkan gejala layu bakteri. Isolat bakteri yang diisolasi dari tanaman kentang yang sakit mampu tumbuh pada media spesifik CPG. Tanaman kentang yang diinokulasi patogen di rumah kaca (*green house*) menunjukkan gejala layu bakteri eksternal berupa layu serta perubahan warna pada daun dan batang tanaman kentang yang sama dengan gejala layu bakteri di kebun kentang Desa Taman Tanda (Gambar 1).

Menurut Chamedjeu *et al.* (2018), patogen penyebab layu bakteri menginfeksi tanaman melalui luka tanaman yang selanjutnya masuk ke jaringan xilem dan kemudian berkembang di pembuluh batang tanaman. Yulianah (2007), secara sistemik patogen bersama unsur hara dan air akan berdifusi melalui xilem, akibatnya proses translokasi air dan nutrisi menjadi terganggu sehingga tanaman menjadi layu dan mati. Selain itu,

patogen akan merusak sel-sel tanaman yang ditempatinya dengan mensekresikan enzim selulase dan pektinase yang dapat menghancurkan dinding sel tanaman (Duriat, 2009).



Gambar 1. Uji Postulat Koch pada tanaman kentang di *green house* (A). Keterangan (1) perlakuan tanpa patogen, (2) perlakuan dengan patogen; (B) layu bakteri pada tanaman kentang di Desa Taman Tanda, Bedugul.

Bakteri patogen juga dapat menginfeksi organ lain dari tanaman seperti akar dan umbi kentang. Enzim selulase yang disekresikan oleh bakteri dapat menyebabkan umbi kentang menjadi lembek dan membusuk. Menurut Pawaskar *et al.* (2014).

Hasil pengujian karakteristik morfologi dan biokimia dari bakteri patogen sesuai dengan Holt *et al.* (1994) dan Sharma (2018), *Ralstonia* sp. memiliki ciri utama koloni yaitu, cair, tak beraturan, rata, dan berwarna putih. Hasil pengamatan morfologi dan biokimia dari bakteri patogen ditunjukkan pada Tabel 1.

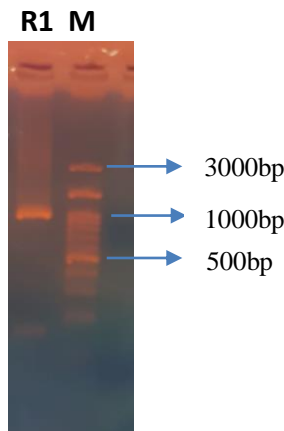
Tabel 1. Karakteristik secara morfologi dan biokimia bakteri patogen *Raltonia* sp.

No	Karakteristik	Keterangan
1	Tepi Koloni	Tidak rata
2	Tekstur koloni	Berlendir/Mengkilat
3	Bentuk koloni	Tidak beraturan
4	Warna koloni	Putih susu
5	Elevasi	Cembung
6	Pewarnaan Gram	Negatif
7	Bentuk sel	Batang/basil
8	Katalase	Positif
9	Simmon Citrate	Positif
10	Indol	Negatif
11	Glukosa	Positif
12	Manitol	Negatif
13	Sukrosa	Negatif

14	Laktosa	Negatif
15	Maltosa	Negatif

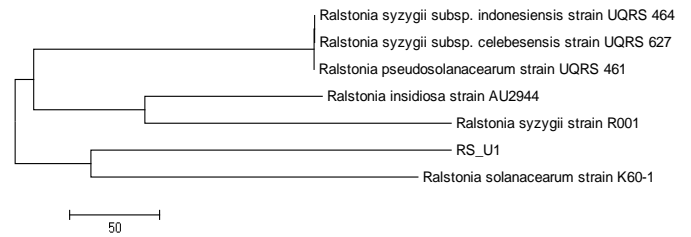
Uji biokimia menunjukkan reaksi positif pada pengujian sitrat. Sitrat merupakan salah satu sumber karbon yang dapat digunakan oleh *Ralstonia* sp. Selain itu pada pengujian gula menunjukkan hasil negatif pada seluruh gula yang diujikan (glukosa, manitol, sukrosa, laktosa, dan maltosa) yang menunjukkan *Ralstonia* sp. hanya mampu memanfaatkan sumber karbon yang spesifik.

Isolasi gen 16S rRNA *Ralstonia* sp. menunjukkan panjang DNA pada 900-1000 bp (Gambar 2). Identifikasi molekuler dilakukan dengan membandingkan sekuens gen 16S rRNA patogen (RS\_U1) dengan pusat data di GenBank. Hasil identifikasi molekuler patogen dengan BLASTN menunjukkan 100% kemiripan dengan bakteri *Ralstonia solanacearum* strain K60-1. Dendrogram dari isolat RS\_U1 ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 2. Amplifikasi gen 16S rRNA isolat patogen; R1= *Ralstonia* sp.; M= marker 100bp DNA ladder.

Berdasarkan dari hasil pengujian yang telah dilakukan meliputi uji Postulat Koch, morfologi, biokimiawi, dan molekuler dapat dikonfirmasi bakteri yang terisolasi adalah *R. solanacearum*. Penelitian lainnya menunjukkan bahwa *Ralstonia solanacearum* ditemukan pada rhizosfer tanaman kentang dan menyebabkan gejala layu bakteri di Madagaskar (Rado *et al.*, 2015).



Gambar 3. Dendrogram isolat bakteri patogen (RS\_U1) dibandingkan dengan 6 bakteri *Ralstonia* lain.

*Ralstonia* merupakan patogen yang dapat menginfeksi berbagai macam tanaman serta dapat menginfeksi inangnya melalui banyak media seperti tanah, luka tanaman, air, maupun biji tanaman. Shahbaz *et al.* (2017) melaporkan *R. solanacearum* dapat menyebabkan penyakit layu bakteri pada tanaman cabai melalui biji dan air. Tanaman cabai yang sudah terinfeksi *R. solanacearum* akan menimbulkan gejala seperti layu pada batang dan daun, muncul bercak warna kuning pada daun hingga kematian tanaman. Penelitian lainnya juga mengungkapkan *R. solanacearum* dapat diisolasi dari tanaman tembakau (*Nicotiana tobacco*) yang terserang penyakit layu bakteri di Cina (Li *et al.*, 2016).

**KESIMPULAN**

Bakteri penyebab layu bakteri pada tanaman kentang di Desa Taman Tanda, Tabanan teridentifikasi secara molekuler sebagai *Ralstonia solanacearum*.

**DAFTAR PUSTAKA**

Chamedjeu, R.R., J. Masanga, V. Matiru and S. Runo. 2018. Isolation and characterization of *Ralstonia solanacearum* strains causing bacterial wilt of potato in Nakuru County of Kenya. *African Journal of Biotechnology*. 17 (52): 1455-1465.

Choiryah, A dan S.D. Nurcahyanti. 2019. Pengendalian penyakit layu bakteri (*Ralstonia solanacearum*) pada tanaman tomat dengan penyambungan batang bawah tahan. *Jurnal Bioindustri*. 2: 295-306.

- Coutinho, T.A and M.J. Wingfield. 2017. *Ralstonia solanacearum* and *R. pseudosolanacearum* on *Eucalyptus*: Opportunists or Primary Pathogens?. *Frontier Plant Science*. 8 (761): 1 -7.
- Doyle, J.J and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Duriat, A.S. 2009. *Pengendalian Penyakit Kuning Keriting Pada Tanaman Cabai Kecil*. Balai Penelitian Tanaman Sayuran. Bandung.
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley and S. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology (9th ed.)*. Baltimore: Williams and Wilkins.
- Li, Y., J. Feng, H. Liu, L. Wang, T. Hsiang, X. Li and J. Huang. 2016. Genetic diversity and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt in China. *Plant Disease*. 100(7): 1288-1296.
- Pawaskar, J., M.S. Joshi, S. Navathe and R.C. Agale. 2015. Physiological and biochemical characters of *Ralstonia solanacearum*. *International Journal of Research in Agricultural Science*. 1(6): 357-360.
- Peeters, N. A. Guidot, F. Vailleau and M. Valls. 2013. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era. *Molecular Plant Pathology*. 14(7): 651–662.
- Rado, R., B. Andrianarisoa, S. Ravelomanantsoa, N. Rakotoarimanga, V. Rahetlah, F.R. Fienena and O. Andriambelason. 2015. Biocontrol of potato wilt by selective rhizospheric and endophytic bacteria associated with potato plant. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*. 15(1): 9762-9776.
- Rohit, A., B. Maiti, S. Shenoy and I. Karunasagar. 2016. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) for rapid diagnosis of neonatal sepsis. *Indian Journal Medical Research*. 143:72-78.
- Semangun H. 1989. *Penyakit-Penyakit Tanaman Hortikultura di Indonesia*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Shahbaz, M.U., T. Mukhtar and N. Begum. 2015. Biochemical and serological characterization of *Ralstonia solanacearum* associated with chilli seeds from Pakistan. *International Journal of Agriculture and Biology*. 17(1): 31-40.
- Sharma, D. K. 2018. Morphological and biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* (smith) in brinjal (*Solanum melongena* L.) in Rajasthan (India). *Advances in Plants and Agriculture Research*. 8(3): 284-288.
- Yulianah, I. 2007. *Studi pewarisan karakter ketahanan cabai (Capsicum annum L.) terhadap layu bakteri (Ralstonia solanacearum)* (Tesis). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Yuliasari, M.M., R. Kawuri dan M.W. Proborini. 2015. Isolasi dan identifikasi bakteri penyebab penyakit busuk lunak pada buah stroberi (*Fragaria x ananassa*). *Jurnal Metamorfosa*. 2(1): 23-28.