EXPLORATION OF BACTRIOPHAGE VIRULENT TO *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV *CAMPETRIS* TOWARD DEVELOPMENT AS BIOCONTROL AGENT FOR CABBAGE BLACK ROT DISEASE

Sri Widadi, Linayanti, dan Sumiyati
Fakultas Pertanian UNS, Jl. Ir. Sutami, No. 36A Ska
Email: sriwidadifp@yahoo.com

Abstract: Black rot disease which is caused by *Xanthomonas campestris* pv *campetris* is an important disease on cabbage and so far could not be controlled satisfactory yet. Recently, people getting conscious the negative effect of applicating synthetic pesticides and the importance of using biocontrol agents fo controlling pests because they are relatively save and environmentally friendly. Bacteriophage is viruse that infects bacteria. The use of phages for disease control is a fast expanding area of plant protection with great potential to replace the chemical control and now prevalent. Phages can be used effectively as part of integrated disease management strategies. The relative ease of preparing phage treatments and low cost of production of these agents make them good candidates for widespread use in developing countries as well. So far, in Indonesia bacteriophage exploration for development as biocontrol agents has not been conducted yet. On the other hand, Indonesia is one of view countries having a lot of biodiversity resourches in the world. So it can be predicted that it is a lot of bacteriophages strains naturally, which could be developed for biocontrol agents of black rot disease in cabbage. This research was aimed to isolate some bacteriophage virulent to *Xanthomonas campestris* pv *campetris* from field. *X. campestris pv campetris* has been isolated from diseased cabbage in Blumbang, Tawangmangu. Biological characterization assay of 10 diseased cabbage leaf samples showed that all sample were indicated innfected by *X. campestris* pv *campetris*. Whereas plaque assay of 10 samples taken from fields showed indication of plague formation. This research still be continued to explore more samples form Tawangmangu, and also from other cabbage field in Central Java.

Key Words: Bacteriophage, exploration, biocontrol, *Xanthomonas*, cabbage.

Abstrak: Eksplorasi Bactriophage virulen untuk Xanthomonas campestris pv campetris terhadap Pembangunan sebagai Agen biokontro untuk Penyakit Kubis Busuk Hitam. Penyakit busuk hitam yang disebabkan oleh Xanthomonas campestris pv campetris adalah penyakit penting pada tanaman kubis dan sejauh ini belum memuaskan dalam pengendaliannya. Bakteriofage adalah virus yang menginfeksi bakteri. Penggunaan fag untuk pengendalian penyakit merupakan daerah berkembang cepat perlindungan tanaman dengan potensi besar untuk menggantikan kontrol kimia dan sekarang lazim. Fag dapat digunakan secara efektif sebagai bagian dari strategi manajemen penyakit terpadu. Yang relatif mudah untuk mempersiapkan perawatan fag dan biaya produksi yang rendah dari agen-agen membuat mereka kandidat yang baik untuk digunakan secara luas di negara berkembang juga. Di sisi lain, Indonesia adalah salah satu negara yang memiliki banyak resources keanekaragaman hayati di dunia. Jadi dapat diperkirakan bahwa banyak strain bakteriofag alami, yang dapat dikembangkan untuk agen biokontrol penyakit busuk hitam pada kubis. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi beberapa bakteriofag virulen untuk Xanthomonas campestris pv campetris dari lapangan. X. campestris pv campetris telah diisolasi dari kubis sakit di Blumbang, Tawangmangu. Karakterisasi uji biologis dari 10 sampel daun kubis yang sakit menunjukkan bahwa sampel semuanya diindikasikan oleh X. campestris pv campetris. Sedangkan uji plak dari 10 sampel yang diambil dari bidang menunjuk-kan indikasi pembentukan wabah. Penelitian ini masih terus menggali lebih banyak sampel membentuk Tawangmangu, dan juga dari bidang lain kubis di Jawa Tengah.

Kata Kunci: Bacteriofage, eksplorasi, biokontrol, Xanthomonas, kubis.

PENDAHULUAN

Busuk hitam (*black rot*) merupakan penyakit penting pada tanaman kubis. Penyakit ini terdapat di semua daerah penanam kubis di seluruh dunia dan menimbulkan kerugian yang besar. Di Indonesia, penyakit ini pertama kali dilaporkan pada tahun 1931, yaitu terdapat di Sumara Utara. Dewasa ini penyakit telah tersebar di Jawa, Sumatra, dan Sulawesi (Semangun, 1996).

Penyakit disebabkan oleh bakeri *Xanthomonas campestris* pv *Campetris* yang dapat bertahan dari musim ke musim pada biji-bijian kubis, dalam tanah, pada tumbuhan lain serta dalam sisa-sisa tanaman sakit. Oleh karena itu penyakit ini sulit dikendalikan (Semangun, 1996).

Sampai sekarang busuk basah kubis, maupun penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri pada tanaman secara umum belum bisa dikendalikan dengan memuaskan. Di sisi lain, dewasa ini semakin disadari bahwa penggunaan senyawa kimia sintetik untuk mengendalikan organisme pengganggu tanaman (OPT) menyebabkan dampak negatif berupa kerusakan agroekosistem, meningkatnya resistensi OPT, keracunan pada konsumen, maupun kerusakan ekosistem yang lebih luas.

Oleh karena itu, dewasa ini semakin disadari pentingnya pemanfaatan agens hayati untuk mengendalikan OPT karena aman serta ramah lingkungan. Sampai sekarang berbagai organisme dari jenis virus, bakteri, jamur, serangga dan sebagianya telah dieksplorasi dari alam, diteliti, dikembangkan, serta diaplikasikan untuk mengendalikan berbagai macam OPT pada tanaman pertanian.

Bakteriofage adalah virus yang mengifeksi bakteri. Sejak pertama kali ditemukan pada awal abad 20, bakteriofage talah dievaluasi secara ekstensif untuk mengendalikan berbagai macam penyakit yang disebabkan oleh bakteri, termasuk penyakit tumbuhan. Di luar negeri, akhir-akhir ini fage sedang dievaluasi untuk mengendalikan penyakit hawar api pada apel dan pir, layu pada tembakau, kanker pada jeruk, bercak pada jeruk, hawar pada geranium, lodoh pada jamur merang, dan hawar *Xanthomonas* pada bawang (Jones *et al*., 2007; Obradovic *et al*., 2005; Obradovic *et al*., 2004).

Di Amerika, bakteriofage telah berhasil digunakan untuk mengendalikan penyakit bercak pada tomat baik di rumah kaca maupun di lapangan. Pengelolaan terpadu berbasis fage untuk penyakit bercak tomat sekarang telah secara resmi direkomendasikan terhadap petani tomat di Florida, dan pestisida hayati berbahan aktif bakteriofage telah tersedia di pasaran (Momol *et al*., 2002; Flaherty *et al*.,2000).

Di Indonesia, sejauh ini eksplorasi bakteriofage untuk dikembangkan sebagai agens hayati belum dilakukan. Di sisi lain, Indonesia merupakan salah satu negara dengan kekayaan hayati tertinggi di dunia. Indonesia merupakan satu dari 17 negara yang dikategorikan sebagai negara dengan megabiodiversitas dan dua dari hanya 25 *hotspot* dunia berada di negara kita (Indonesian Biodiversity Strategy and Action Plan, data tidak dipublikasi). Berdasarkan realitas tersebut diperkirakan terdapat banyak strain-strain bakteriofage di alam yang dapat dikembangkan sebagai agens pengendali hayati penyakit busuk hitam kubis.

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi berbagai macam bakteriofage yang virulen terhadap bakteri *Xanthomonas campestris* pv

campetris dari lapangan dan mengkarakterisasikannya, untuk dikembangkan sebagai angens hayati penyakit busuk hitam kubis.

METODE PENELITIAN

Lokasi kegiatan

Bakteriofage diisolasi dari wilayah endemi penyakit busuk hitam kobis, yaitu di pusat produksi tanaman kobis di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Kultur dan karakterisasi biologi isolat-isolat bakteriofage akan dilakukan di Laboratorium Ilmu Hama/Penyakit Tumbuhan Fakultas Pertanian UNS. Sedangkan uji kinerja bakteriofage dalam mengendalikan penyakit busuk hitam kubis akan dilakukan di Rumah Kaca Fakultas Pertanian UNS.

Isolasi Bakteri *X. campestris* pv *campetris* dari lapang

Isolasi dilakukan menurut cara Streets (1972). Bakteri *X. campestris* pv *campetris* diisolasi dari wilayah endemi penyakit busuk basah kobis, yaitu di pusat produksi tanaman kobis di Tawangmangu, Jawa Tengah. Isolasi dilakukan dengan mendatangi wilayah tersebut. Tanaman kobis yang menunjukkan gejala ditandai. Bagian tanaman (daun) yang menunjukkan gejala penyakit tersebut dipotong, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik dan diberi label, kemudian secepatnya dimasukkan ke dalam termos pendingin. Setelah sampai di Laboratorium, sampel-sampel tanaman segera dipindah ke refrigerator bersuhu 4°C, untuk selanjutnya dikulturkan di medium buatan.

Kultur Bakteri *X. campestris* pv *campetris* Pada Media Buatan Serta Karakterisasi Berdasarkan Koloni Isolat

Kultur bakteri dilakukan menurut cara Balogh *et al.* (2003). Bakteri ditumbuhkan pada media nutrient agar (NA) (0.8% nutrient broth [BBL, Becton Dickinson and Co., Cockeysville, MD] di dalam petridis berdiameter 9 cm. Kultur diinkubasikan pada suhu ruang selama 48 jam. Sedangkan karakterisasi koloni *X. campestris* pv *campetris* dilakukan dengan menggunakan kriteria dari Streets (1972).

Isolasi Bakteriofage dari Lapangan

Isolasi Bakteriofage dari Lapangan dilakukan Menurut cara Balogh *et al.* (2003). Bakteriofage diisolasi dari tiga tempat yaitu: jaringan tanaman kubis yang sakit, jaringan tanaman kubis yang sehat, serta tanah disekitar tanaman kubis yang sakit. Dari jaringan tanaman kubis masing-masing diambil sekitar 50 g (satu unit sampel). Sedangkan dari tanah juga diambil sekitar 50 g (satu sendok) (satu unit sampel). Masing-masing sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik, diberi label, lalu dimasukkan ke dalam termos pendingin.

Setelah sampai di laboratorium, masing-masing sampel segera diproses. Sampel yang berupa jaringan tanaman, masing-masing ditambah 50 ml aquades lalu digerus secara steril. Preparasi kemudian disentrifugasi dengan kecepatan rendah selama 5 menit, supernatan diambil. Supernatan lalu disaring dengan filter steril dengan diameter pori 0.2-µm. Bakteriofage yang lolos dari saringan ditampung dan disimpan untuk pengujian berikutnya.

Sedangkan sampel yang berupa tanah, masing-masing ditambah 50 ml aquades lalu digoyang diatas *shaker* elektrik selama 60 menit. Preparasi kemudian disentrifugasi serta langkah berikutnya seperti pada pemprosesan jaringan tanaman.

Plating *X. campestris* pv *campetris* pada top agar untuk Uji Plaq

Plating dilakukan menurut cara Balogh *et al.* (2003). Plat dasar dibuat/disiapkan menggunakan 0,4% agarose. Kemudian dibiarkan mengental selama semalam. Dibuat tiga macam pengenceran bakteriofage yaitu: 10^{-1}, 10^{-2} dan 10^{-3}. Total volume pengenceran adalah 300 ul. Sel *X. campestris* pv *campetris* (kompeten sel) disiapkan pada kerapatan ~10^{8} cells/ml.

Top agar dibuat/disiapkan menggunakan 0,5% Low-Melt agarose (1 bagian sel:4 bagian agarose, menghasilkan sekitar 0.4% agarose konsentrasi akhir). Larutan agarose dididihkan, lalu dibiarkan mendingin pada suhu sekitar 29C. Kemudian ditambahkan kompeten sel. Campuran segera dituang ke dalam tabung falkon yang telah berisi fage, lalu segera divortek dan dituangkan ke atas plat dasar yang telah tersedia. Sebagai indikator, dilakukan inokulasi biakan cair dengan pengenceran fage yang dipakai untuk plating. Preparasi diinkubasikan selama semalam.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri *X. campestris* pv *campetris* dari lapang

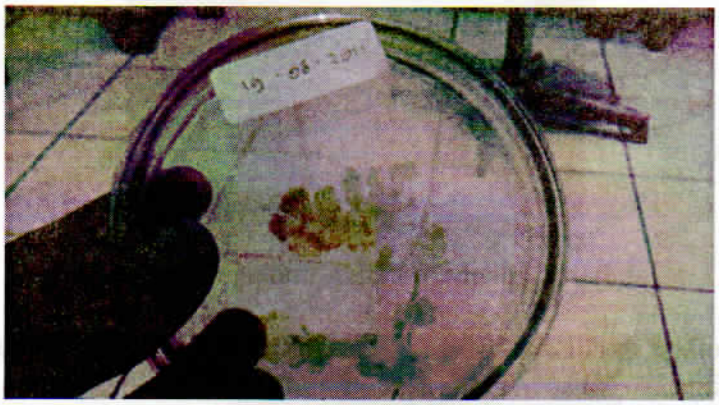
Bakteri *X. campestris* pv *campetris* diisolasi dari wilayah endemi penyakit busuk basah kobis, yaitu di pusat produksi tanaman kobis di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah (Gambar 1). Bakteri diisolasi dari pertanaman kobis yang menampakkan gejala busuk hitam, yaitu daun mengering dan berwarna coklat dari bagian tepi. Urat-urat daun berwarna hitam serta di bagian dalamnya seperti basah (Gambar 2). Daun-daun yang menampakkan gejala tersebut dipetik, lalu dimasukkan ke dalam kantong plastik, serta diberi label. Sampel lalu dimasukkan ke dalam termos pendingin, lalu dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengujian berikutnya. Dari daerah Tawanmangu ini total diambil 10 sampel/isolat, yaitu dari Kelurahan Blumbang.

Gambar 1. Area Pertanaman Kobis di Kelurahan Blumbang, Tawangmangu

Gambar 2. Gejala Penyakit Busuk Hitam pada Tanaman Kobis

Kultur Bakteri *X. campestris* pv *campetris* Pada Media Buatan Serta Karakterisasi Berdasarkan Koloni Isolat

Ke-sepuluh sampel daun kubis yang sakit dicuci dengan air steril, lalu permukaannya disterilisasi dengan alkohol 70%, kemudian dibiarkan kering. Bakteri kemudian diisolasi menurut cara Streets (1972), lalu ditumbuhkan pada media nutrient agar (NA) menurut cara Balogh *et al.* (2003) (Gambar 3).



Gambar 3. Kultur Bakteri yang Diisolasi dari Daun Kubis

Isolat bakteri tersebut lalu dimurnikan menggunakan metode Balogh *et al.* (2003), sehingga diperoleh isolat murni seperti pada Gambar 4.

Gambar 4. Isolat Murni Bakteri yang Diisolasi dari Daun Kubis

Isolat murni bakteri yang telah diperoleh tersebut menampakkan fenotip koloni sebagai berikut: pada umur 3 hari koloni berwarna putih kekuningan, rata-rata diameter koloni adalah 3 mm, permukaan koloni rata/datar dengan bagian tepinya halus. Menurut kriteria dari Streets (1972), isolat tersebut mengindikasikan *X. campestris* pv *campetris*.

Guna memperkuat hasil karakterisasi biologi tersebut di atas, kami juga melakukan karakterisasi kimia dengan Uji Penggumpalan menggunakan

KOH. Hasil pengujian menunjukkan terjadi penggumpalan massa bakteri (Gambar 5), sehingga memperkuat hasil karakterisasi biologi tersebut di atas.

Isolat bakteri *X. campestris* pv *campetris* asal pertanaman kobis di Kelurahan Blumbang, Tawangmangu, Karanganyar ini lalu disimpan dan akan dipakai untuk berbagai pengujian pada tahapan berikutnya.

Gambar 5. Hasil Uji Penggumpalan dengan KOH

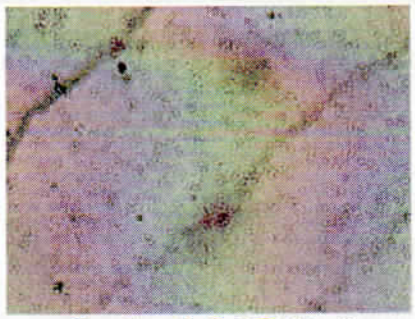
Isolasi Bakteriofage dari Lapangan

Bakteriofage diisolasi dari pertanaman kobis di Kelurahan Blumbang, Tawangmangu, Karanganyar. Bakteriofage diisolasi dari tiga tempat yang berbeda yaitu: jaringan tanaman kubis yang sakit, jaringan tanaman kubis yang sehat, serta tanah disekitar tanaman kubis yang sakit. Masing-masing sampel dimasukkan ke dalan kantong plastik, diberi label, lalu dimasukkan ke dalam termos pendingin.

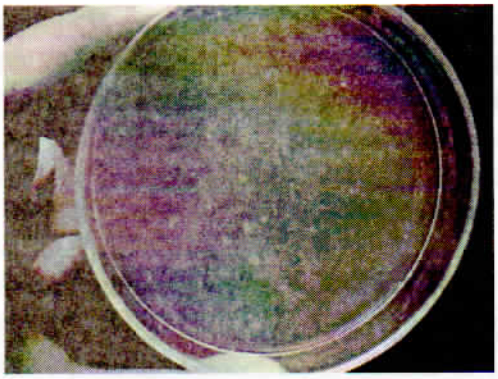
Setelah sampai di Laboratorium bakteriofage diisolasi Menurut cara Balogh *et al.* (2003). Setelah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 5 menit, peparasi berupa supernatan yang jernih. Suspensi bakteriofage ini kemudian disimpan untuk berbagai pengujian berikutnya.

Plating *X. campestris* pv *campetris* pada top agar untuk Uji Plaq

Plating dilakukan menurut cara Balogh *et al.* (2003). Kami mencoba dua macam bahan sebagai plat dasar, yaitu NA dan agarose. Plating menggunakan bakteri hasil identifikasi sebelumnya (Gambar 6). Dari hasil plating deketahui bahwa plat dasar dari bahan NA menghasilkan plat yang kompak, yaitu terbentuk penggabungan yang kompak antara plat dasar dan top agar. Plat cepat memadat serta tidak berair (Gambar 7). Untuk pengujian berikutnya kami akan menggunakan NA sebagai plat dasar.

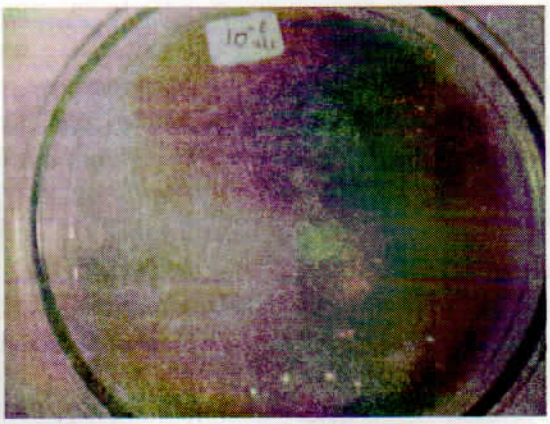


Gambar 6. Sel Bakteri



Gambar 7. Hasil Plating dengan Plat Dasar NA

Berdasarkan hasil uji plaq dari sekitar 10 unit sampel yang kami ambil dari daerah Tawangmangu menampakkan indikasi adanya plaq yang mengifeksi koloni bakteri ditandai dengan kenampakan spot-spot yang bening (Gambar 8).



Gambar 8. Hasil Pengujian plaq

Penelitian masih dilanjutkan, dengan mengambil sampel yang lebih banyak, baik dari wilayah Tawangmangu, maupun dari wilayah sentra pertanaman kubis yang lain di wilayah Jawa Tengah.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Terdapat penyakit busuk hitam yang disebabkan oleh infeksi bakteri *X. campestris* pv *campetris* pada pertanaman kubis di Kelurahan Blumbang, Tawangmangu.
2. Berdasarkan karakterisasi biologi, dari 10 sampel daun tanaman sakit yang diambil, seluruhnya terindikasi terinfeksi bakteri *X. campestris* pv *campetris*.
3. Penggunaan media NA untuk bahan plat dasar dalam uji plaq menghasilkan plat yang kompak serta tidak berair. Bahan ini akan dipakai untuk pembuatan plat berikutnya.
4. Berdasarkan hasi uji plaq dari 10 sampel yang diambil dari lapang, terlihat adanya indikasi plaq yang mengifeksi koloni bakteri.

SARAN

Saran dari penelitian ini adalah melanjutkan penelitian, dengan mengambil sampel yang lebih banyak, baik dari wilayah Tawangmangu, maupun dari wilayah sentra pertanaman kubis yang lain di wilayah Jawa Tengah

.

DAFTAR PUSTAKA

Balogh B, Jones JB, Momol MT, Olson SM, Obradovic A. 2003. *Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato. Plant Dis.* 87:949□54

Balogh, B. 2002. *Strategies for improving the efficacy of bacteriophages for controlling bacterial spot of tomato. Mster Thesis.* Graduate School of the University of Florida.

Civerolo, E.L and Keil, H.L. 1969. *Inhibition of bacterial spot of peach foliage by Xanthomonas pruni bacteriophage. Phytopathology* 59:1966□67

Flaherty JE, Jones JB, Harbaugh BK, Somodi GC, Jackson LE. 2000. *Control of bacterial spot on tomato in the greenhouse and .eld with H-mutant bacteriophages. HortScience* 35:882□84

Jones, J.B., L.E. Jackson. B. Balogh, A. Obradovic, F.B. Iriarte, and M.T. Momol. 2007. *Bacteriophages for Plant Disease Control..* Annu. Rev. Phytopathol..45:245-262.

Momol MT, Jones JB, Olson SM, Obradovic A, Balogh B, King P. 2002. *Integrated management of bacterial spot on tomato in Florida. Rep. PP110,* EDIS, Inst. Food Agric. Sci., Univ. FL. Online.

Obradovica A., Jones, JB, Momol MT, Olson SM, and Jackson LE. 2005. *Integration of biological control agents and systemic acquired resistance inducers against bacterial spot on tomato. Plant Dis.* 89:712□16

Obradovic A, Jones JB, Momol MT, Balogh B, and Olson SM. 2004. *Management of tomato bacterial spot in the .eld by foliar applications of bacteriophages and SAR inducers. Plant Dis.* 88:736□40

Sambrook, J. and D.W. Russel. 2001. *Molecular Cloning. A. Laboratory Manual.* Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. p2.25-3.49.

Semangun, H. 1996. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan.* Gadjah Mada University Press. Yogyakayta.

Streets, R.B. 1972. *Diagnosis of Plant Diseases.* The University of Arizona Press, USA.