

## KARAKTERISASI DAN DETEKSI CEPAT BAKTERI PENYEBAB PENYAKIT DARAH PADA PISANG

### CHARACTERIZATION AND RAPID DETECTION OF BLOOD DISEASE BACTERIUM ON BANANA AND PLANTAIN

Nur Edy<sup>1)</sup>, Siti Subandiyah<sup>\*2)</sup>, Christanti Sumardiyono<sup>2)</sup>, dan Jaka Widada<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Fitopatologi, Sekolah Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

<sup>2)</sup>Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Jln. Flora 1 Bulaksumur Yogyakarta 55281

\*Penulis untuk korespondensi. E-mail: sitisubandiyah@ugm.ac.id

#### ABSTRACT

Blood disease of banana is one of the most serious banana disease in Indonesia. Although the disease has become the subject of quarantine it eventually spread and found in most provinces in Indonesia. The aim of this research were to identify the blood disease bacterium (BDB) using morphological observation, biochemical assay, pathogenicity testing of hosts range using infectivity titration and rapid detection by Polymerase Chain Reaction (PCR). The results showed that the blood disease bacterium could be differentiated from *Ralstonia solanacearum* race 2, the causal agent of Moko disease and *R. solanacearum* tobacco isolates. BDB isolates were not able to hydrolyze gelatin, Tween 80, starch, and were not able to produce nitrite from nitrate. They were only able to produce acid from galactose and glycerol. The pathogenicity test indicated that the BDB was only able to infect the banana/plantain and was not able to infect tomato, eggplant, and chili. Rapid detection using PCR method showed that the 121F/R primers was able to amplify the BDB genome and was not able to amplify the genome of *R. solanacearum* tobacco isolates.

Key words: Blood Disease Bacterium, characterization, Polymerase Chain Reaction

#### INTISARI

Penyakit darah pada pisang masih merupakan kendala utama dalam budidaya pisang di Indonesia. Walaupun patogen penyakit darah sudah merupakan OPT karantina, namun saat ini penyakit sudah tersebar di seluruh provinsi di Indonesia. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri penyebab penyakit darah dengan karakterisasi morfologi, biokimia, kisaran inang, dengan *infectivity titration* dan deteksi cepat menggunakan PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri penyakit darah (BDB) dapat dibedakan dengan *Ralstonia solanacearum* ras 2, penyebab penyakit Moko dan *R. solanacearum* isolat tembakau. Isolat BDB tidak dapat menghidrolisis gelatin, Tween 80, pati dan tidak dapat menghasilkan nitrit dari nitrat. Bakteri ini hanya menghasilkan asam dari galaktosa dan gliserol. Hasil uji patogenitas menunjukkan bahwa bakteri penyakit darah (BDB) hanya dapat menginfeksi pisang dan *plantain* dan tidak dapat menginfeksi tomat, terung dan cabai. Deteksi cepat dengan PCR menunjukkan bahwa primer 121F/R dapat mengamplifikasi genom bakteri penyakit darah (BDB) dan tidak dapat mengamplifikasi *R. solanacearum* isolat tembakau.

Kata kunci: karakterisasi, penyakit darah pisang, *Polymerase Chain Reaction*

#### PENGANTAR

Penyakit darah masih menjadi kendala utama dalam budidaya pisang di Indonesia. Penyakit ini banyak dijumpai pada pisang Kepok akan tetapi varietas lainnya juga dapat terinfeksi. Gejala yang ditimbulkan sangat mirip dengan gejala penyakit Moko di Amerika Latin yang disebabkan oleh *Ralstonia solanacearum* ras 2 (Sequeira, 1997).

Sampai saat ini patogen penyakit darah pada pisang belum memiliki nama yang valid sekalipun kedudukan taksonominya telah ditentukan bahwa patogen ini tergolong ke dalam *Ralstonia* kompleks spesies dan memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Ralstonia solanacearum* ras 2, penye-

bab penyakit layu pisang di Amerika Latin dan Filipina serta *Ralstonia syzygii* penyebab penyakit mati pucuk pada cengkeh (Fegan & Prior, 2006). Bakteri penyebab penyakit darah hanya dikenal dengan nama umum *Blood Disease Bacterium* (BDB).

Roberts *et al.* (1990) dan Baharuddin *et al.* (1994) telah membuktikan bahwa strain BDB dan *R. syzygii* memiliki DNA yang homolog pada uji serologi dan menunjukkan sidik jari dengan tingkat similaritas yang tinggi melalui uji *Polymerase Chain Reaction* dengan amplifikasi menggunakan primer tRNA (Seal *et al.*, 1992b). Analisis filogenetik menggunakan 16S rDNA, poligalaktu-

ronase, dan endoglukanase (Seal *et al.*, 1994; Thagayi *et al.*, 1996; Fegan *et al.*, 1998) lebih menegaskan bahwa BDB dan *R. syzygii* dapat diklasifikasi kembali ke dalam genus *Ralstonia*. BDB dan *R. syzygii* dapat dengan mudah dibedakan dari isolat *R. solanacearum* berdasarkan kisaran inang, perbedaan morfologi bakteri, sifat fisiologi jika dikulturkan (Eden-Green, 1994), dan spesifikan fragmen DNA *R. solanacearum* dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (Seal *et al.*, 1992a). Analisis filogenetik berdasarkan 16S-23S (*Internal Transcribed Spacer*, ITS), endoglukanase dan urutan DNA gen mutS, menggolongkan BDB dalam filotipe IV, sedangkan *Ralstonia solanacearum* ras 2 digolongkan dalam filotipe II (Fegan & Prior, 2005).

Sebaran geografi BDB yang sangat luas di Indonesia dan kompleksnya keragaman bakteri layu vaskular pada pisang menjadi alasan dibutuhkan metode deteksi BDB strain Indonesia untuk membedakannya dengan strain-strain bakteri lain penyebab penyakit layu pada pisang. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi bakteri penyebab penyakit darah (BDB) dan deteksi cepat dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) untuk kepentingan diagnosis.

## BAHAN DAN METODE

**Isolasi dan karakterisasi bakteri.** Isolat BDB yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1. Isolat-isolat BDB diperoleh dari daerah-

daerah berbeda di Indonesia. Bakteri dikulturkan pada medium *Tetrazolim Chloride Agar* (TZC) (Kelman, 1994) pada suhu ruang. Karakterisasi bakteri dilakukan menurut metode yang dideskripsikan oleh Fahy dan Hayward (1983), Lelliot dan Stead (1987), Baharuddin (1994), Eden-Green (1994).

**Uji patogenisitas.** Untuk mengetahui kisaran inang BDB, uji patogenisitas dilakukan dengan metode *infectivity titration* (Subandiyah, 1991) dengan kerapatan sel bakteri  $10^8$  CFU/ml. Tanaman uji adalah pisang, tomat, terung, dan cabai.

**Ekstraksi dan pemurnian DNA.** Total genom DNA BDB diekstraksi dengan metode yang dideskripsikan oleh Ausubel *et al.* (1992).

**Analisis PCR.** Isolat-isolat BDB diidentifikasi dengan metode *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan primer spesifik (5'-CGT ATT GGA TGC CGT AAT GGA-3') dan 121R (5'-AAG TTC ATT GGT GCC GAA TCA-3'). Amplifikasi fragmen DN BDB dilakukan pada mesin pendaur panas (Biorad, Jerman), volume total reaksi 25 l dengan komposisi 200 M dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer 10 x, 1 unit DNA *Taq* polymerase (Core Kit, Roche, Jerman), 25 pmol masing-masing primer 121F dan 121R, 50 ng DNA *template*. Kondisi mesin pendaur panas diatur sebagai berikut: 1 siklus 96°C selama 10 menit; 30 siklus berturut-turut terdiri atas 94°C selama 15 detik, 59°C selama 30 detik, dan 72°C selama 30 detik. Satu siklus pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit,

Tabel 1. Bakteri yang digunakan dalam penelitian

No.	Kode	Daerah asal isolat	Varietas inang
1.	Slk-31	Solok, Sumatera Utara	Kepok
2.	Slk-33	Solok, Sumatera Utara	Kepok
3.	Lpg-29	Lampung	Kepok
4.	Sln-03	Sleman, D.I. Yogyakarta	Kepok
5.	Btl-11	Bantul, D.I. Yogyakarta	Kepok
6.	Skh-06	Sukoharjo, Jawa Tengah	Kepok
7.	Pwr-07	Purworejo, Jawa Tengah	Kepok
8.	Sal-48	Salaman, Jawa Tengah	Kepok
9.	Byl-35	Boyolali, Jawa Tengah	Raja Bandung
10.	Klt-34	Klaten, Jawa Tengah	Kepok
11.	Bal-50	Tabanan, Bali	Kepok
12.	Plu-32	Palu, Sulawesi Tengah	Kepok
13.	Mks-52	Makassar, Sulawesi Selatan	Kepok
14.	Mksr-51	Makassar, Sulawesi Selatan	Kepok
15.	Btp-22	Batu Putih, Sulawesi Selatan	Ambon
16.	Lmp-28	Lompo, Sulawesi Selatan	Kepok
17.	Mdo-53	Manado, Sulawesi Utara	Kepok
18.	Bpn-46	Tritip, Balikpapan, Kalimantan Timur	Kepok
19.	Bpn-47	Tritip, Balikpapan, Kalimantan Timur	Kepok
20.	Bpn-44	Karang Juang, Balikpapan, Kalimantan Timur	Kepok
21.	Smrd-45	Samarinda, Kalimantan Timur	Kepok

PCR dihentikan pada suhu 11°C. Produk PCR (5 µl) dielektroforesis menggunakan agarosa 1% dalam larutan buffer 0.5 x (*Tris-acetate-EDTA buffer*, 89 mM Tris-acetate, pH 8,0 dan 2 mM EDTA) dengan pengaturan pergerakan DNA pada gel agarosa 10 V/cm selama 25 menit. Pewarnaan DNA dilakukan dengan *ethidium bromide* (0,5 g/ml), lalu fragmen DNA yang terbentuk diamati di atas UV transiluminator. Untuk membuktikan kespesifikan primer. Uji yang sama dilakukan pada *Ralstonia solanacearum* isolat tembakau sebagai kontrol. Isolat BDB dimurnikan dengan dikulturkan pada medium TZC sampai ditemukan koloni tunggal dengan ciri-ciri: bentuk koloni bakteri bulat, berdiameter 2–4 mm, berwarna putih susu dengan warna merah muda pada bagian tengahnya, mengilap, dan tidak fluidal. Koloni tunggal kemudian dipindahkan ke medium CPG.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Karakteristik bakteri.** Ciri khusus yang terlihat secara teknis adalah koloni bersifat lengket pada medium jika diambil dengan jarum ose, pertumbuhan koloni pada medium CPG terbilang lambat, koloni baru jelas terlihat pada hari keempat sampai kelima setelah dikulturkan. Sebagai pembandingan ditampilkan hasil karakterisasi Baharuddin (1994). Hasil karakterisasi BDB oleh penulis dan Baharuddin disajikan pada Tabel 2.

**Patogenisitas bakteri.** BDB hanya menginfeksi pisang dengan gejala layu, sedangkan tomat, terung, dan cabai tidak menunjukkan gejala layu (tetap sehat) sampai 4 minggu setelah inokulasi. Ini menunjukkan bahwa BDB hanya menginfeksi pisang dan tidak menginfeksi tanaman lain.

Bakteri layu pisang mampu memproduksi berbagai enzim ekstraseluler dengan fungsi yang berbeda-beda, antara lain adalah yang berfungsi untuk mendegradasi komponen dinding sel tanaman hubungannya dengan patogenisitas, tetapi tidak satupun di antaranya yang dibutuhkan secara mutlak untuk menimbulkan penyakit. Mutan yang kehilangan kemampuan membentuk proten-protein ekstraseluler seperti endopoligalakturonase (*PglA*), eksopoligalakturonase B (*PglB*), pektin metil esterase (*Pme*), atau endogalakturonase (*Egl*) masih mampu menyebabkan penyakit meskipun kemunculan gejala layu dan kematian tanaman membutuhkan waktu yang lebih lama. Faktor virulen lain yakni ekstrapolisakarida yang bersifat asam dengan berat molekul tinggi menyebabkan penyumbatan pada xilem sehingga menimbulkan kelayuan tetapi tidak mempunyai efek dalam proses invasi dan multiplikasi sel bakteri tersebut. Mutan spontan yang tertentu akan menunjukkan koloni yang tidak fluidal karena EPS tidak terbentuk (Kelman, 1953). Selanjutnya diketahui bahwa mutan tersebut mengalami inaktivasi pada lokus *phcA* yang membawa gen untuk mempertahankan fenotipe liar (*wild type*)

Tabel 2. Karakteristik isolat-isolat BDB dibandingkan dengan *Ralstonia solanacearum* ras 2

Karakter Bakteri	<i>Blood Disease Bacterium</i>	<i>R. solanacearum</i> ras 2*)
Gram (KOH 3%)	-	-
Katalase	+	+
Kovacs' Oksidasi	+	+
Oksidasi Fermentasi	O+/F-	O+/F-
Pencairan Gelatin	-	+
Hidrolisis Tween 80	-	+
Hidrolisis Pati	-	-
Reduksi Nitrat	-	+
Produksi Levan	-	+
Pigmen Fluoresen	-	-
Reaksi Hipersensitif	+	+
Produksi asam dari:		
- Maltosa	-	-
- Laktosa	-	-
- Sukrosa	-	-
- Galaktosa	+	+
- Mannitol	-	+
- Sorbitol	-	-
- Selobiosa	-	-
- Gliserol	+	+

\*Uji dilakukan oleh Baharuddin (1994)



dengan kemampuannya menyebabkan gejala kelayuan secara cepat pada tanaman (Hayward, 2000).

**Deteksi BDB dengan Polymerase Chain Reaction.** Hasil polimerasi dengan primer 121F dan 121R, primer spesifik untuk deteksi BDB pada pisang di Indonesia menunjukkan bahwa semua isolat (21) positif sebagai BDB yang ditunjukkan dengan terbentuknya fragmen DNA dengan ukuran 317 pb (Gambar 1). Primer tersebut dikembangkan dari hasil klon DNA genom BDB yang dibandingkan dengan DNA genom *Ralstonia solanacearum* lalu diidentifikasi dengan metode *subtractive hybridization*. Meskipun sekuen yang diperoleh tidak sesuai dengan *data base* Bank Gen, akan tetapi hasil uji pada banyak strain BDB menunjukkan hasil positif sedangkan pada *R. solanacearum* menunjukkan hasil negatif.

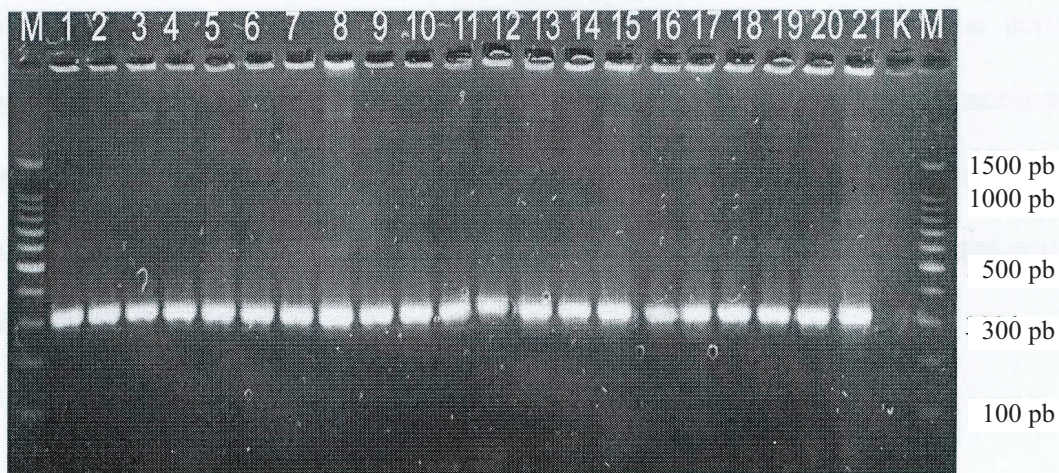
Spesifikasi urutan basa DNA primer 121F dan 121R mampu mengenali BDB pada total genom DNA-nya. Hasil polimerasi menunjukkan bahwa primer spesifik tersebut hanya mampu mengamplifikasi fragmen DNA BDB dan tidak mengamplifikasi fragmen DNA *R. solanacearum* isolat tembakau. Sekalipun kedua jenis bakteri tersebut tergolong dalam satu genus *Ralstonia*, akan tetapi pencirian khusus yang dimiliki oleh BDB pada fragmen DNA-nya akan menjadi faktor identitas utama sekaligus menjadi karakter pembeda dengan bakteri yang lain.

Beberapa primer telah dikembangkan untuk deteksi strain-strain bakteri layu seperti *R. solanacearum* dan bakteri layu lain yang sekerabat dengannya melalui metode *Polymerase Chain Reaction*. Di antara primer-primer deteksi yang telah dikembangkan tersebut, Opina *et al.* (1997) menemukan primer 759 dan 760 yang telah terbukti mampu mengamplifikasi fragmen DNA dari semua strain-strain *R. solanacearum* dan bakteri yang memiliki kekerabatan dekat dengannya, yakni *Pseudomonas syzygii* dan *Blood Disease Bacterium* pada panjang fragmen 282 pb secara konsisten.

Kemajuan teknik molekuler membantu dalam identifikasi cepat suatu jasad pengganggu tanaman untuk diagnosis. Sifat efisien dari teknik-teknik molekuler akan memudahkan deteksi patogen karena tidak perlu mengkulturkannya pada medium buatan, atau dapat langsung dari bagian tanaman yang dicurigai membawa patogen. Analisis molekuler untuk mendeteksi keberadaan mikroba pengganggu di dalam tanaman sangat membantu efisiensi waktu dan akurasi untuk kepentingan diagnosis.

## KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa patogen penyakit darah pada pisang di Indonesia adalah *Blood Disease Bacterium*, bukan *Ralstonia solanacearum*.



Gambar 1. Amplifikasi DNA genom BDB dengan PCR menggunakan primer 121F dan 121R menunjukkan seluruh isolat positif sebagai bakteri penyebab penyakit darah

Keterangan:

- |           |            |              |            |                                     |
|-----------|------------|--------------|------------|-------------------------------------|
| 1. Slk-31 | 6. Skh-06  | 11. Bal-50   | 16. Lmp-28 | 21. Smrd-45                         |
| 2. Slk-33 | 7. Pwr-07  | 12. Plu-32   | 17. Mdo-53 | K. Kontrol ( <i>R. solanacearum</i> |
| 3. Lpg-29 | 8. Sal-48  | 13. Mks-52   | 18. Bpn-46 | isolat tembakau)                    |
| 4. Sln-03 | 9. Byl-35  | 14. Mkasr-51 | 19. Bpn-47 |                                     |
| 5. Btl-11 | 10. Klt-34 | 15. Btp-22   | 20. Bpn-44 |                                     |

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada: Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR) dalam proyek *Diagnosis and Management of Banana Wilt in Indonesia* (ACIAR CP 2004/034) sebagai penyandang dana penelitian ini. Dr. Mark Fegan (Queensland University, Australia) yang telah mendesain spesifik primer untuk deteksi BDB.

## DAFTAR PUSTAKA

Ausubel, F.M., R. Brent., R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, & K. Struhl (eds.). 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Association; Wiley-Interscience, New York.

Baharuddin. 1994. *Pathological, Biochemical, and Serological Characterization of the Blood Disease Bacterium Affecting Banana and Plantain*. Cuvillier Verlag, Gottingen, Doctoral Dissertation.

Eden-Green, S.J. 1994. Diversity of *Pseudomonas solanacearum* and Related Bacteria in South Asia: New Direction of Moko Disease, p. 25–34. In A.C. Hayward & G.L. Hartman (eds.), *Bacterial Disease and its Causative Agent Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wellington.

Fahy, P.C. & A.C. Hayward. 1983. Media and Methods for Isolation and Diagnostic Tests, p. 337–378. In P.C. Fahy & G.J. Persley (eds.), *Plant Bacterial Diseases: a Diagnostic Guide*. Academic Press, Sidney.

Fegan, M., M. Taghavi, Sly Li, & A.C. Hayward. 1998. Phylogeny, Diversity, and Molecular Diagnostic of *Ralstonia solanacearum*, p. 19–33. In P.C. Prior, C. Allen, J. Elphinstone. (eds.), *Bacterial Wilt, Molecular, and Ecological Aspects*. Berlin Heidelberg, Germany and Paris, Frances. Springer-Verlag and INRA Edition.

Fegan, M. & P. Prior. 2005. How Complex is the "*Ralstonia solanacearum* species complex"?, p. 449–461. In C. Allen, P. Prior, & A.C. Hayward (eds.), *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota.

Fegan, M. & P. Pror. 2006. Diverse Members of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex Cause Bacterial Wilt of Banana. *Australian Plant Pathology* 35: 93–101.

French, E.R. & L. Sequeira. 1970. Strains of *Pseudomonas solanacearum* from Central and South America: Comparative Study. *Phytopathology* 60: 506–512.

Hayward, A.C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. *Encyclopedia of Microbiology* 4: 32–42.

Kelman, A. 1953. *The Bacterial Wilt Caused by Pseudomonas solanacearum. A Literary Review and Bibliography*. Technical Bulletin of North Carolina Agricultural Experiment Station No. 99. Raleigh, North Carolina. 194 p.

Lelliot, R.A. & D.E. Stead. 1987. *Methods in Plant Pathology*. Vol. 2. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. British Society for Plant Pathology by Blackwell Scientific Publication, Oxford. 216 p.

Opina, N., F. Tavner, G. Holloway, J. Wang, T. Li, R. Maghirang, M. Fegan, A. Hayward, V. Krishnapillai, W. Hong, B. Holloway, & J. Timmis. 1997. A Novel Method for Development of Species and Strain-Specific DNA Probes and PCR Primers for Identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*). *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 5: 19–30.

Roberts, S.J. Eden-Green, P. Jones, & D.J. Ambler. 1990. *Pseudomonas syzygii* sp. Nov., the Cause of Sumatera Disease of Cloves. *Systematic and Applied Microbiology* 13: 34–43.

Seal, S.E., L. Jackson, & M.J. Daniels. 1992a. Isolation of a *Pseudomonas solanacearum*, specific DNA probe by subtraction hybridization and Construction of Species-species Oligonucleotida Primers for Sensitive Detection by Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3751–3758.

Seal, S.E. & J.G. Elphinstone. 1994. Advances in Identification and Detection of *Pseudomonas solanacearum*, p. 35–57. In A.C. Haywards & G.L. Hartman (eds.), *Bacterial Wilt: the Disease and its Causative Agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International. Wallingford, UK.

Sequeira, L. 1997. Bacterial Wilt: The Missing Element in International Banana Improvement Programs, p. 6–14. In P. Prior, C. Allen, & J. Elphinstone (eds.) *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspect*, Reports of the Second International Bacterial Wilt Symposium. France.

Subandiyah, S. 1991. *Bacterial Wilt of Peanut Caused by Pseudomonas solanacearum F.F. Smith*. Thesis master. The University of Queensland, St. Lucia, Queensland, Australia.

Thagavi, M., A.C. Hayward, L.I. Sly, & M. Fegan. 1996. Analysis of Phylogenetic Relationship of Strains *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, Blood Disease Bacterium based on 16S rRNA Gene Sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 10–15.