

## ISOLASI DAN KARAKTERISASI *Ralstonia syzygii*

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Ralstonia syzygii*

**Yanuar Danaatmadja\***

*Program Studi Fitopatologi, Pascasarjana Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

**Siti Subandiyah, Tri Joko**

*Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta*

**Cavrina Ulita Sari**

*PT. Cengkeh Zanzibar, Semarang*

*\*Penulis untuk korespondensi. E-mail: yanoe\_gisawa@yahoo.co.id*

#### ABSTRACT

*Ralstonia syzygii* is one of important pathogens of cloves. This study was aimed at obtaining pure culture of *R. syzygii* from diseased plant tissue samples. The bacterium was isolated from infected clove plantations in Ungaran, Central Java. It had the ability to make clove seedlings show symptoms and then die 41 days after inoculation. The reisolated bacterium also showed its ability to kill clove seedlings after 17 days. The bacterium is gram negative, able to utilize glucose, sucrose, maltose, mannitol, sorbitol, dulcitol, and glycerol, able to hydrolyze starch, grow well at 27°C, able to catalyze and release water and oxygen from hydrogen peroxyde ( $H_2O_2$ ) and aerobically.

*Key words: clove seedling, Ralstonia syzygii*

#### INTISARI

*Ralstonia syzygii* merupakan salah satu patogen penting pada tanaman cengkeh. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan isolat murni *R. syzygii* dari jaringan tanaman terinfeksi. Bakteri diisolasi dari pertanaman cengkeh sakit yang berasal dari daerah Ungaran, Jawa Tengah. Bakteri menunjukkan kemampuan untuk menyebabkan bibit tanaman cengkeh sakit dan kemudian mati 41 hsi. Bakteri hasil reisolasi juga menunjukkan kemampuannya menyebabkan sakit dan kematian pada bibit tanaman cengkeh setelah 17 hsi. Bakteri yang diperoleh bersifat gram negatif, mampu memanfaatkan glukosa, sukrosa, maltosa, manitol, sorbitol, dulsitol, dan gliserol, mampu menghidrolisis pati, tumbuh baik pada suhu 27°C, mampu mengkatalisis dan melepaskan air dan oksigen dari *hydrogen peroxide* ( $H_2O_2$ ) dan bersifat aerob.

Kata kunci: bibit cengkeh, *Ralstonia syzygii*

#### PENGANTAR

*Ralstonia syzygii* dilaporkan pertama kali pada tahun 1920-an di Tapanuli pada tanaman cengkeh (Vanechoute *et al.*, 2003). Penyakit yang disebabkan oleh *R. syzygii* dikenal sebagai penyakit Sumatera (Waller & Sitepu, 1975) karena penyakit ini terhampar di Pulau Sumatera seperti di Provinsi Sumatera Barat, Sumatera Utara, Bengkulu, dan Lampung, meskipun saat ini telah muncul di Jawa Barat dan Jawa Tengah (Semangun, 2000). Penyakit juga dikenal sebagai “penyakit bakteri pembuluh kayu cengkeh” atau BPKC (Supriyadi, 1995; Semangun, 2000). Nama lain dari penyakit ini adalah penyakit “mati bujang” atau “mati gadis”, karena sering timbul pada tanaman cengkeh yang habis berbunga pertama kalinya (Semangun, 2000). Pada tahun 1931 gejala penyakit muncul di daerah

Sumatera Barat. Pada tahun 1960-an epidemi terjadi di daerah tersebut dan banyak sekali tanaman cengkeh yang mati sehingga disebut “mati massal” (*mass decline*) (Djafaruddin *et al.*, 1979). Antara tahun 1970 dan 1980, patogen ini telah merusakkan lebih dari 9 ribu ha cengkeh di wilayah tersebut (Semangun, 2000).

Gejala penyakit pada tanaman cengkeh yang terserang *R. syzygii* dikenal 2 tipe ekstrim, yaitu mati cepat atau mati layu (*wilt die-back*) dan mati lambat atau mati karena tanaman menua (*senescense die-back*). Gejala penyakit mati cepat atau mati layu (*wilt die-back*) yaitu daun-daun gugur mendadak, ranting-ranting pada cabang dekat pucuk atau pada pucuk mati. Daun gugur dari atas ke bawah terjadi selama beberapa minggu atau bulan. Kadang-kadang cabang atau seluruh tanaman muda layu secara mendadak, sehingga daun yang

kering dan berwarna coklat tetap melekat pada pohon untuk beberapa waktu. Daun tua pada umumnya berwarna kekuningan dan cepat gugur. Cabang dapat mati apabila banyak daun yang gugur. Beberapa cabang bagian bawah dapat bertahan lama setelah bagian atas pohon mati. Seluruh tanaman mati dalam waktu 2 tahun sejak permulaan timbulnya gejala. Akar-akar pun mati sejalan dengan matinya bagian atas pohon (Semangun, 2000).

Gejala penyakit mati lambat atau mati karena tanaman menua (*senescense die-back*) terjadi secara bertahap. Seluruh daun menguning, lalu gugur bagian demi bagian. Daun-daun dewasa menjadi tua sebelum waktunya. Masa daun gugur dapat berganti dengan pulihnya sebagian pohon dan berkembangnya daun muda serta kuncup bunga, akan tetapi jumlahnya sangat sedikit. Mati ranting dan mati cabang terjadi di seluruh pohon. Tanaman mati 3–6 tahun sesudah tampaknya gejala (Semangun, 2000).

*Ralstonia syzygii* memiliki kekerabatan yang dekat dengan bakteri penyebab penyakit darah pada pisang atau *blood disease bacterium* (BDB) secara genotipe. *R. syzygii* dan BDB sama-sama masuk ke dalam filotipe IV. Filotipe merupakan sistem klasifikasi untuk membedakan spesies *R. solanacearum* yang sangat kompleks berdasarkan analisis sekuen daerah ITS, gen *hrpB* dan gen endoglukanase. Sistem ini memisahkan spesies *R. solanacearum* menjadi empat filotipe (Fegan & Prior, 2005). Untuk dapat mempelajari karakteristik dari *R. syzygii* lebih jauh, maka diperlukan isolat murni bakteri ini dari sampel tanaman yang telah terinfeksi. Penelitian ini dimaksudkan untuk memperoleh isolat murni *R. syzygii* dari sampel tanaman sakit.

## BAHAN DAN METODE

### *Isolasi Bakteri dari Sampel Tumbuhan Sakit*

Isolat bakteri diperoleh dari bagian sampel tanaman yang terinfeksi penyakit Sumatera. Sampel ranting sakit didesinfeksi dengan alkohol 70% lalu dipotong menjadi bagian kecil (5 mm) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi air steril dan dibiarkan 3 jam. Suspensi yang terbentuk digoreskan di atas medium *periwinkle wilt* (PW) dalam cawan petri. Kultur diinkubasikan selama 6 hari pada suhu 28°C. Pengamatan bentuk koloni pada medium PW meliputi koloni berwarna bening, berbentuk bulat dan berukuran ±1 mm setelah 4 hari (Supriyadi, 1995) dan bersifat gram negatif (Lelliot & Stead, 1987)

### *Uji Reaksi Hipersensitivitas*

Reaksi hipersensitivitas dilakukan dengan menyuntikkan suspensi bakteri ke dalam jaringan daun tembakau (Fahy & Persley, 1982). Perkembangan gejala klorosis di amati hingga 4 hari.

### *Uji Patogenisitas*

Isolat bakteri yang menunjukkan reaksi hipersensitif diuji patogenisitasnya pada bibit cengkeh berumur 3 bulan. Metode inokulasi bakteri dilakukan dengan metode *infectivity titration*, yaitu dengan membuat lubang luka ke bagian batang tanaman kemudian dimasukkan tip yang berisi 10–20 µl suspensi bakteri ( $1 \times 10^6$  CFU/ml) ke bagian lubang tersebut (Schaad *et al.*, 2001).

### *Reisolasi Bakteri dari Sampel Tanaman yang Diinokulasi Buatan*

Patogen yang menyebabkan sakit kemudian direisolasi untuk mendapatkan kultur murni bakteri dan kemudian diinokulasikan ke tanaman sehat. Untuk isolasi bakteri, 1 ranting sakit dicuci dengan alkohol 70% kemudian dipotong menjadi bagian kecil (5 mm) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi air steril dan dibiarkan 3 jam. Suspensi biakan yang terbentuk digoreskan di atas medium PW dalam cawan petri. Kultur diinkubasikan selama 6 hari pada suhu 28°C. Pengamatan bentuk koloni pada medium PW meliputi koloni berwarna bening, berbentuk bulat dan berukuran ± 1 mm setelah 4 hari. Setelah kultur murni diperoleh, bakteri kemudian diinokulasikan ke bibit cengkeh berumur 4 bulan dengan metode *infectivity titration* (Schaad, *et al.*, 2001).

### *Uji Sifat Bakteri*

Pengujian sifat-sifat bakteriologi meliputi pengujian sifat gram dan kemampuan memanfaatkan sumber karbon (manitol, sorbitol, gliserol, dulcitol, maltosa, sukrosa, dan glukosa), kemampuan menghidrolisis pati, pertumbuhan pada suhu 37°C dan 40°C, pigmen fluoresen, uji levan, uji oksidase Kovac's, uji katalase, uji arginin, uji katalase, dan pencairan gelatin. Hasil-hasil pengujian sifat-sifat bakteriologi dibandingkan dengan sifat-sifat bakteriologi *R. syzygii* yang telah dideskripsikan oleh Eden-Green (1994) dan Vaneechoute *et al.* (2003).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### *Isolasi Bakteri dari Sampel Sakit*

Hasil isolasi bakteri patogen pada medium PW menunjukkan bahwa koloni bakteri berbentuk bulat,

berwarna jernih, berukuran sekitar 1 mm setelah 4 hari pada suhu kamar (Gambar 1). Menurut Djafaruddin *et al.* (1970); Supriyadi (1995) dan Vaneechoute *et al.* (2003) bakteri penyebab penyakit Sumatera ini disebabkan oleh *Ralstonia syzygii*.

Hasil isolasi dan pengamatan morfologi bakteri patogen merupakan karakterisasi awal dari *R. syzygii* yang diduga sebagai penyebab penyakit Sumatera. Selanjutnya untuk memastikan isolat bakteri patogen yang diuji merupakan *R. syzygii* maka perlu dilakukan pengujian hipersensitivitas dan patogenisitas

#### **Uji Hipersensitivitas**

Hasil pengujian hipersensitivitas menunjukkan isolat bakteri tersebut dapat menimbulkan reaksi hipersensitivitas terhadap daun tembakau (Gambar 2). Gejala klorosis timbul setelah 3 hari diinokulasi. Hipersensitif pada tembakau merupakan pengujian yang penting pada prosedur penyaringan pada hampir kebanyakan patogen potensial meskipun

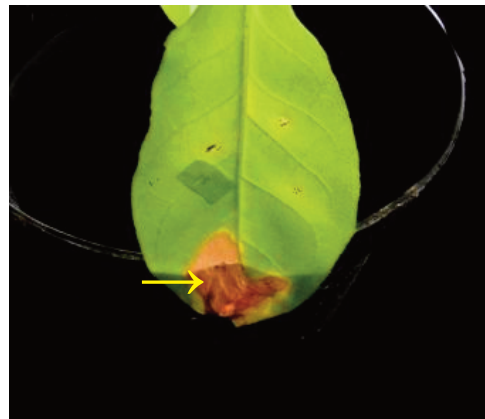
beberapa patogen tidak memberikan hasil positif. Hipersensitif merupakan mekanisme pertahanan yang menghasilkan penghambatan dari serbuan mikroorganisme. Secara karakteristik, peningkatan permeabilitas, kekurangan, dan kematian dari sel-sel inang terjadi pada sel sebelah sel terinfeksi. *Pseudomonas* grup 1 akan dapat berkembang dan menyebabkan reaksi hipersensitif sekurang-kurangnya pada kerapatan suspensi bakteri  $5 \times 10^6$  sel/ml (Fahy & Persley, 1983).

#### **Uji Patogenisitas**

Hasil pengujian patogenisitas isolat bakteri patogen yang diuji mampu menginfeksi tanaman cengkeh dengan gejala daun yang menguning, kering lalu berguguran. Hal ini menunjukkan isolat bakteri tersebut merupakan ciri dari gejala bakteri penyebab penyakit Sumatera (*R. syzygii*) (Semangun, 2000). Gejala penyakit muncul dengan ditandai daun menguning dan kering setelah 28 hari setelah inokulasi (HSI) dan daun berguguran hingga keseluruhan daun tidak ada lagi pada tanaman



Gambar 1. Koloni bakteri umur 4 hari hasil isolasi dari sampel sakit di atas medium *periwinkle wilt*



Gambar 2. Reaksi hipersensitivitas bakteri yang diuji pada tanaman tembakau (tanda panah)



Gambar 3. Bibit cengkeh kontrol (kiri) dan yang diinokulasi bakteri uji (kanan) pada 57 HSI

setelah 56 HSI (Gambar 3). Pada *R. solanacearum* terdapat 3 protein yang disekresikan dalam lingkungan sekitar ekstraseluler oleh sistem sekresi Hrp-nya yaitu: PoA, PopB, dan PopC, yang dikode oleh batas sebelah kiri pada cluster *Hrp* dan diatur oleh HrpB regulator transkripsional. PopA menyebabkan reaksi mirip-hipersensitif ketika diinfiltrasi ke dalam jaringan tanaman dengan konsentrasi yang tinggi (Arlat *et al.*, 1994). PopB dan PopC memiliki ciri struktur yang biasanya ditemukan dalam protein eukariotik dan beberapa effektor dependen-TipeIII dari patogen bakteri. PopB mengandung signal lokalisasi inti bipartit yang menaikkan transportnya ke dalam nukleus sel tanaman dan popC membawa leucine ke dalamnya yang ditemukan pada beberapa produk gen resisten (Gueneron *et al.*, 2000). Cluster *hrp* *Ralstonia solanacearum* dibutuhkan sebagai patogenisitas pada spesies inangnya dan menginduksi respon hipersensitif pada tanaman non inang (Boucher *et al.*, 1987). Pengujian patogenisitas untuk menegaskan sebuah identifikasi dilakukan dengan menginokulasikan ulang (reisolasi) bakteri patogen yang diperoleh ke tanaman inang yang sehat dengan jenis spesies dan kultivar yang sama.

Hasil uji hipersensitivitas dan uji patogenisitas yang diperoleh menunjukkan bakteri patogen yang diuji mampu menginfeksi daun tembakau dan cengkeh diperkirakan adalah *R. syzygii*.

### Reisolasi Bakteri dari Sampel Sakit

Untuk membuktikan jika bakteri tersebut sebagai penyebab tanaman sakit, maka patogen tersebut perlu diisolasi ulang dari tanaman sakit (Semangun, 2000). Ooze yang keluar dari sampel sakit menunjukkan massa bakteri yang terdapat di dalam tanaman sakit. Massa bakteri yang telah keluar dari sampel sakit kemudian diisolasi ke dalam medium PW padat untuk mendapatkan koloni murni bakteri patogen tersebut. Setelah diinkubasi selama 3 hari, koloni bakteri di atas medium nampak seperti bentuk koloni bakteri yang diperoleh dari sampel sakit pertama kali. Koloni bakteri berbentuk bulat, berwarna jernih, berukuran sekitar 1 mm.

Bakteri patogen ini kemudian diinokulasikan ke bibit cengkeh sehat berumur 4 bulan. Setelah 10 hari perkembangan penyakit nampak terlihat dengan gejala daun yang menguning, kering lalu berguguran dan menunjukkan gejala penyakit yang sama seperti yang dihasilkan oleh bakteri yang diperoleh pertamakali dari sampel sakit hasil isolasi dari lapangan. Berdasarkan hasil reisolasi dan patogenisitas pada bibit cengkeh menunjukkan bahwa bakteri reisolasi kemungkinan besar merupakan bakteri yang mirip dengan bakteri yang telah diperoleh pertama kali yang juga menunjukkan patogenisitasnya pada bibit cengkeh.

Tabel 1. Sifat-sifat bakteriologi isolat bakteri yang diperoleh

Karakter	Isolat bakteri yang diperoleh	<i>R. syzygii</i> (Eden-Green, 1994)	<i>R. syzygii</i> (Vanechoute <i>et al.</i> , 2003)
Gram		-*	-*
Koloni (diameter)	Bulat bening 1 mm	Bulat bening < 1 mm	5 mm pada medium yang baik
Penggunaan:			
Glukosa	+	+	Tidak diujikan
Sukrosa	+	+	Tidak diujikan
Maltosa	+	Tidak diujikan	-
Manitol	+	Tidak diujikan	-
Sorbitol	+	Tidak diujikan	Tidak diujikan
Dulsitol	+	Tidak diujikan	Tidak diujikan
Gliserol	+	-	-
Hidrolisis pati	+	Tidak diujikan	+
Pigmen fluoresen	-	Tidak diujikan	Tidak diujikan
Pertumbuhan pada suhu:			
27°C	+	+	+
37°C	+	-	-
40°C	-	Tidak diujikan	-
Reduksi nitrat	-	±	Tidak diujikan
Levan	-	Tidak diujikan	-
Oksidase	-	Tidak diujikan	+
Oksidatif/fermentatif	O	Tidak diujikan	O
Katalase	+	Tidak diujikan	+
Arginin	-	Tidak diujikan	-
Pencairan gelatin	-	Tidak diujikan	Tidak diujikan

Catatan: + = bereaksi positif, - = bereaksi negatif, O = oksidatif. \* hasil positif pada pengujian gram.

### Uji Sifat-Sifat Bakteriologi

Berdasarkan sifat-sifat bakteriologi, isolat bakteri yang diperoleh merupakan bakteri gram negatif dan mampu memanfaatkan semua sumber karbon yang diujikan (Tabel 1).

Hasil pengujian bakteriologi menunjukkan terdapat persamaan dan perbedaan karakteristik dari isolat bakteri yang diuji bila dibandingkan dengan *R. syzygii* yang dideskripsikan oleh Eden-Green (1994) dan Vaneechoute *et al.*, (2003). Kesamaannya adalah sifat bakteri yang diuji adalah gram negatif dan mampu memanfaatkan sukrosa dan glukosa, mampu menghidrolisis pati, tumbuh baik pada suhu 27°C, mampu mengkatalisis dan melepaskan air dan oksigen dari *hydrogen peroxide* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dan bersifat aerob. Bakteri tidak mampu tumbuh pada suhu 40°C, tidak dapat mereduksi nitrat, tidak membentuk gelembung pada medium yang mengandung sukrosa 5%, tidak mampu memanfaatkan gliserol dan maltosa

Perbedaan yang dijumpai yaitu bakteri hasil isolasi mampu memanfaatkan mannitol, dulcitol, gliserol, dan maltosa yang hasil ini adalah negatif dari sifat *R. syzygii* yang dideskripsikan oleh Eden-Green (1994) maupun Vaneechoute *et al.* (2003). Hasil karakterisasi bakteriologi yang berbeda dimungkinkan apabila bakteri yang diperoleh merupakan *R. syzygii* yang memiliki aktivitas metabolisme yang berbeda dari *R. syzygii* Eden-Green (1994) dan Vaneechoute *et al.* (2003) meskipun hasil uji patogenisitas membuktikan jika isolat bakteri yang diperoleh mampu menimbulkan gejala sakit seperti yang dikarenakan terserang *R. syzygii*. Perbedaan aktifitas metabolisme pada suatu strain bakteri juga terdapat pada spesies *R. solanacearum* yang mana perbedaan ini kemudian menjadikan pengelompokan spesies *R. solanacearum* menjadi beberapa biovar (Schaad *et al.*, 2001).

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terimakasih kepada *Australian Centre for International Agricultural Research* (ACIAR): Hort/2003/034 yang telah membiayai penelitian ini.

### DAFTAR PUSTAKA

Agrios, G.N. 2005. *Plant Pathology* 5<sup>th</sup> Edition. Elsevier Academic Press. London. UK. 922 p.

Anonim. 2009. Cengkeh. <http://id.wikipedia.org/wiki/Cengkeh>, modified 19/4/2009.

Arlat, M., F. Van Gijsegem, J.C. Huet, J.C. Pernollet, & C.A. Boucher. 1994. PopA1, a Protein which Induces a Hypersensitive-like Response on Specific *Petunia* Genotypes, is Secreted via the Hrp Pathway of *Pseudomonas solanacearum*. *EMBO Journal* 13: 543–553.

De Baere, T., S. Steyaert, G. Wauters, P. De Vos, J. Goris, T. Coenye, T. Suyama, G. Verschraegen, & M. Vaneechoute. 2001. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar3/'*thomasi*' Strains (Pickett 1994) and of New Isolates Related to Nosocomial Recurrent Meningitis as *Ralstonia mannitolytica* sp. nov. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology* 51: 547–558.

Djafaruddin, A. Hanafiah, D. Suud, M. Syafruddin, & Mardinus. 1979. Penelitian Penyebab Utama Mati Massal (*Mass Decline*) pada Tanaman Cengkeh di Sumatera Barat. *Fakultas Pertanian Universitas Andalas*, Padang 23: 83–96.

Fahy, P.C., & G.J. Persley. 1983. *Plant Bacterial Diseases; A Diagnostic Guide*. Academic Press, Australia. 393 p.

Fox, R.T.V. 1993. *Principles of Diagnosis Techniques in Plant Pathology*. CABInternational, UK. 213 p.

Guenoron M., A.C. Timmers, C. Boucher, & M. Arlat. 2000. Two Novel Proteins, PopB, which has Functional Nuclear Localization Signals, and PopC, which has a Large Luecin-rich Repeat Domain, are Secreted through the Hrp-secretion Apparatus of *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Microbiology* 36: 261–277

Hadiwijaya, T. 1956. Penyakit Mati Bujang pada Cengkeh (*Eugenia aromatica* Baill.). *Teknologi Pertanian* 143

Lelliot, R.A., & D.E. Stead. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Methods in Plant Pathology, British Society for Plant Pathology*. Blackwell Scientific Publications. (2). 212 p.

Reitsma, J. 1953. Penyakit Cengkeh. *Teknologi Pertanian* 2: 404.

Roberts, S.J., 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.

Schaad, N.W., J.B. Jones, & W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* 3<sup>rd</sup> edition. APS Press, Minnesota. 373 p.

Semangun, H. 2000. *Penyakit-Penyakit Tanaman Perkebunan di Indonesia*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 835 p.

Semangun, H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. 754 p.

Supriyadi. 1995. Karakteristik *Pseudomonas solanacearum*, *P. syzygii* dan Bakteri Penyebab Penyakit Darah (*blood disease bacterium*) pada Pisang. p. 557–581. *Kongres Nasional XIII dan Seminar Ilmiah Perhimpunan Fitopatologi Indonesia*.

Vaneechoutte, M., P. Kampf, T. De Baere, E. Falsen, & G. Verschraegen. 2004. *Wautersia* gen. nov., a Novel Genus Accomodating the Phylogenetic Lineage Including *Ralstonia eutropha* and Related Species, and Proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts *et al.*, 1990) comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 317–327.

Waller, J.M. & D. Sitepu. 1975. Sumatera Disease of Cloves in Indonesia. *PANS* 21, 141–147  
*Pembangunan Lembaga Penelitian Tanaman Industri* 25: 58–70, 1977.