

DETEKSI PENYAKIT *BACTERIAL FRUIT BLOTCH* PADA MELON MENGGUNAKAN ELISA

DETECTION OF BACTERIAL FRUIT BLOTCH OF MELON USING ELISA

Utik Windari¹⁾, Tri Joko^{2)*}, & Siti Subandiyah²⁾

¹⁾Balai Karantina Pertanian Kelas II Yogyakarta
Jln. Laksda Adisucipto km 8, Maguwoharjo, Sleman, Yogyakarta 55282

²⁾Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan, Fakultas Pertanian, Universitas Gadjah Mada
Jln. Flora 1, Bulaksumur, Sleman, Yogyakarta 55281

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

ABSTRACT

Bacterial fruit blotch (BFB) caused by Acidovorax citrulli is a serious seedborne disease in Cucurbitaceae causing 90–100% yield losses. The aim of this study was to explore BFB symptom on melon and also to detect A. citrulli infection in commercial seed and symptomatic fruits from the field in Yogyakarta Special Region province and its surrounding using DAS-ELISA method. Samples include melon from Sleman, Bantul, Kulon Progo, Gunung Kidul, Magelang, Purworejo regencies while commercial seeds i.e. Action 434, Glamour and Mai 116 were collected. DAS-ELISA detection method used reagent set from Agdia. Based on the field observation, this study found melon commercial fruit shares similar symptom with BFB, which showed discrete oily dark green spots, while the netting failed to develop over necrotic areas, resulting in smooth sunken spots. DAS-ELISA detection revealed that samples collected from Jetak village, district of Mungkid, Magelang and from Bligo village, district of Ngluwar, Magelang and in commercial seed Mai 116 were positively infected by A. citrulli.

Keywords: Acidovorax citrulli, bacterial fruit blotch, ELISA, melon

INTISARI

Bacterial fruit blotch (BFB) merupakan penyakit penting pada famili Cucurbitaceae yang disebabkan oleh Acidovorax citrulli. Penyakit ini dilaporkan dapat menurunkan hasil mencapai 90-100%. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gejala penyakit BFB pada melon dan deteksi A. citrulli pada benih komersial dan sampel buah bergejala dengan metode DAS-ELISA di DIY dan sekitarnya. Pengambilan sampel dilakukan di kabupaten Sleman, Bantul, Kulon Progo, Gunung Kidul, Purworejo dan Magelang. Selain dari lapangan, diuji pula benih melon komersial yaitu Action-434, Glamour dan Mai 116. Metode deteksi dengan ELISA menggunakan reagent set dari Agdia. Dari hasil pengamatan di lapangan ditemukan buah melon dengan gejala yang mirip dengan gejala BFB yaitu adanya becak berwarna hijau tua kebasahan pada permukaan buah, jaring tidak terbentuk sempurna dan pada bagian daging buah di bawah becak tadi membusuk. Hasil deteksi dengan DAS-ELISA mengindikasikan bahwa A. citrulli terdeteksi pada sampel yang berasal dari desa Bligo, kecamatan Ngluwar dan desa Jetak, kecamatan Mungkid, kabupaten Magelang, serta pada benih komersial MAI 116.

Kata kunci: Acidovorax citrulli, bacterial fruit blotch, ELISA, melon

PENGANTAR

Melon (*Cucumis melo* L.) merupakan salah satu tanaman hortikultura dari famili Cucurbitaceae yang potensial untuk dikembangkan dan dapat menjadi produk unggulan hortikultura di Indonesia. Menurut catatan Direktorat Jenderal Hortikultura (Anonim, 2014), nilai impor buah segar melon dan semangka pada tahun 2012 lebih besar yaitu US\$ 873.237, sementara nilai eksportnya hanya US\$ 521.390. Selain impor buah segar, beberapa benih Cucurbitaceae juga masih impor dari beberapa negara. Menurut data dari Badan Karantina Pertanian, benih melon diimpor dari Thailand, Taiwan, Jepang, India, Vietnam,

dan Cina. Impor benih maupun buah segar bukan tanpa risiko, salah satu risiko besar yang harus dihadapi adalah masuknya patogen yang belum ada di Indonesia. Salah satu penyakit penting pada melon yang sangat merugikan di dunia adalah *Bacterial Fruit Blotch* (BFB) yang disebabkan oleh bakteri *Acidovorax citrulli*. Sampai saat ini belum ada laporan mengenai penyakit ini di Indonesia, namun risiko masuk dan tersebarnya *A. citrulli* ke Indonesia sangat besar mengingat impor buah dan benih dari negara yang sudah melaporkan adanya bakteri ini masih terus berlangsung dan kondisi iklim di Indonesia yang cocok bagi perkembangan bakteri ini.

A. citrulli dilaporkan dapat menyerang berbagai spesies yang termasuk dalam famili Cucurbitaceae seperti semangka, melon, *squash*, labu dan timun (Burdman & Walcott, 2012). Di Israel pada tahun 1995 dilaporkan bahwa *A. citrulli* menginfeksi semai terong, selanjutnya pada tahun 1997 dilaporkan terdapat pada biji tomat (Assouline *et al.*, 1997). Pada tahun 2008 dilaporkan bahwa *A. citrulli* menyerang sirih di Taiwan (Deng *et al.*, 2010). *A. citrulli* termasuk dalam kelas Betaproteobacteria, ordo Burkholderiales, famili Comamonadaceae. Bakteri ini bersifat tular benih dan dapat menyebar melalui percikan air hujan maupun irigasi (*overhead irrigation*). Suhu yang optimal bagi perkembangan *A. citrulli* adalah 24–35°C dengan kelembaban relatif >70% (Walcott, 2008). Keberadaan bakteri ini telah dilaporkan di berbagai negara antara lain Kanada, USA, Mexico, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Brazil, Hungaria, Italia, Yunani, Turki, Israel, Nigeria, Cina, Korea Selatan, Jepang, Taiwan, Thailand, India, Australia, dan Mariana Island (Burdman & Walcott, 2012; Langston, 2013).

Kerusakan akibat bakteri ini dapat mencapai 90% bahkan dapat mencapai 100% (Walcott, 2005; Latin, 2014). Hal ini disebabkan karena buah yang terserang *A. citrulli* menjadi tidak menarik dan daging buahnya rusak. Di Amerika Serikat, BFB tersebar di lebih dari 10 negara bagian. Di negara bagian Georgia menyebabkan kerusakan ribuan hektar lahan semangka. Bahkan dilaporkan kerugian personal petani mencapai US\$ 100.000 (Anonim, 2015). Deteksi awal mengenai keberadaan *A. citrulli* baik pada buah maupun biji sangat penting di pintu-pintu pemasukan. Hal ini untuk mencegah masuk dan tersebarnya bakteri ini melalui media pembawa buah segar maupun benih. Untuk itu diperlukan suatu metode deteksi yang cepat dan akurat. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui gejala penyakit BFB pada melon dan deteksi *A. citrulli* pada benih komersial dan sampel buah bergejala dengan metode DAS-ELISA di DIY dan sekitarnya.

BAHAN DAN METODE

Pengamatan Gejala Penyakit dan Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di sentra per-tanaman melon di enam kabupaten di DIY dan sekitarnya yaitu Kabupaten Sleman, Bantul, Kulon Progo, Gunung Kidul, Magelang, dan Purworejo. Dari setiap kabupaten kemudian dipilih tiga lokasi pertanaman menggunakan metode *purposive random sampling* berdasarkan gejala khas dari penyakit BFB. Buah yang bergejala selanjutnya diambil bijinya lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan. Untuk benih komersial dipilih kultivar yang banyak

ditanam oleh petani DIY dan sekitarnya. Benih komersial antara lain Action 434 (PT Bisi International Tbk.), Glamour (PT Sakata), dan MAI 116 (CV Multi Global Agrindo).

Deteksi Patogen dengan ELISA

Untuk mendeteksi bakteri *A. citrulli* pada buah yang bergejala khas penyakit BFB digunakan metode serologi yaitu *double antibody sandwich* (DAS-ELISA) menggunakan antiserum spesifik *A. citrulli* dan *conjugate Goat anti-Rabbit* (IgG-AP) (Clark & Adams, 1977). Adapun langkahnya adalah *microplate* dilapisi dengan *capture antibody* sebanyak 100 µl lalu diinkubasi selama 4 jam pada suhu ruang atau 4°C selama semalam. Setelah itu *microplate* dicuci dengan bufer PBST. Sampel biji digerus dengan perbandingan 1:10 yaitu untuk 1 g sampel digerus dalam 10 ml *general extract buffer 2*. Enzim (alkalin fosfatase) konjugat dilarutkan dalam enzim RUB3, perbandingan dapat dilihat pada kemasan. Selanjutnya enzim konjugat tadi dituang ke dalam *microplate* sebanyak 100 µl, 5 menit kemudian sampel, kontrol negatif, kontrol positif dan bufer dituang dalam *microplate* tadi lalu dihomogenkan. *Microplate* diinkubasi selama 2 jam pada suhu ruang atau pada suhu 4°C selama semalam. Setelah itu disiapkan p-PNP (*p-nitrophenylphosphate*) tablet substrat yang dilarutkan dalam bufer PNP substrat, lalu *microplate* tadi dicuci dengan bufer PBST hingga bersih. Setelah itu, PNP substrat dimasukkan sebanyak 100 µl ke dalam *microplate* lalu diinkubasi selama 1 jam dalam kondisi gelap. Selanjutnya diamati perubahan warna. Hasil dikatakan benar bila terjadi perubahan warna pada kontrol positif dari bening menjadi kuning, sedangkan bufer dan kontrol negatif tetap bening. Pembacaan hasil juga dilakukan secara kuantitatif dengan *ELISA reader* pada panjang gelombang 405 nm. Pembacaan absorbansi terhadap sampel dinyatakan positif apabila nilai absorbansi *ELISA* (NAE) sampel uji lebih besar atau sama dengan 2 kali rata-rata NAE kontrol negatif (Dijkstra & de Jager, 1998).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Gejala Penyakit

Hasil survei di lapangan terhadap melon menunjukkan ada dua tipe kerusakan pada buah. Kerusakan tipe pertama buah retak hingga pecah, retakan buah berwarna hitam (Gambar 1A). Buah yang mengalami kerusakan seperti ini sudah tidak dapat dikonsumsi karena daging buah busuk kering. Kerusakan pada buah seperti ini terjadi secara luas pada lokasi-lokasi penanaman yang diamati. Kerusakan tipe kedua, terdapat becak berwarna hijau tua kebasahan pada

permukaan buah (Gambar 1B). Pada tingkat lebih lanjut becak-becak tersebut bertambah banyak dan dapat menyebabkan daging buah hancur. Kerusakan tipe kedua ini terjadi secara sporadik pada lokasi pertanaman yang diamati. Buah yang mengalami kerusakan tipe dua tidak dapat dikonsumsi karena daging buah hancur. Menurut Walcott (2005), gejala penyakit BFB pada buah melon akan nampak sebelum panen yaitu berupa becak hijau tua. Becak ini tidak bertambah besar namun akan masuk ke dalam daging buah sehingga daging buah menjadi busuk. Pada jenis melon yang membentuk jaring, jika terdapat becak ini akan menyebabkan jaring tidak terbentuk pada permukaan buah. Menurut Walcott (2008), *A. citrulli* dapat menyerang semua fase pertumbuhan. Gejala awal dapat diamati pada permukaan bawah kotiledon, yaitu berupa becak lesi kebasahan yang kemudian menyatu memanjang di sepanjang tulang daun. Lama-kelamaan lesi ini mengering berwarna cokelat kemerahan. Namun gejala pada daun ini sulit diamati karena rancu dengan gejala karena infeksi jamur. Dari deskripsi di atas, kerusakan tipe kedua yang mendekati gejala BFB. Untuk tanaman melon yang terserang BFB menunjukkan daun tetap terlihat hijau dan segar, sehingga dari jauh tetap terlihat sehat.

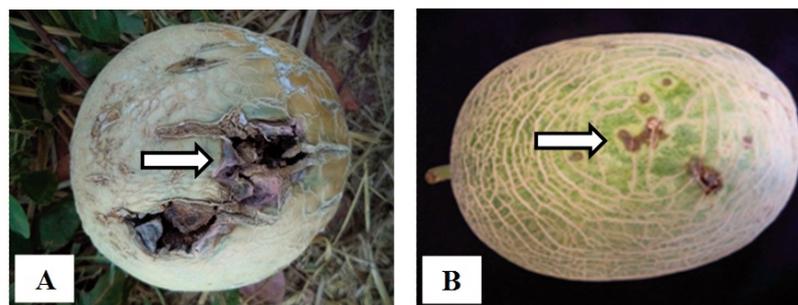
Deteksi *Acidovorax citrulli* dengan ELISA

Deteksi menggunakan metode serologi dan variasinya umum digunakan untuk mendeteksi *A. citrulli* di lapangan karena sederhana, murah, dan tidak memerlukan peralatan yang mahal, selain itu tidak memerlukan isolasi patogen. Spesifitas dan sensitivitas metode ini tergantung dari antibodi yang digunakan. Antigen disiapkan dengan menggerus biji atau kecambah, hal ini dilakukan karena *A. citrulli* terletak pada permukaan kulit biji dan endosperm. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Himananto *et al.* (2011), bahwa maserasi biji memberikan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan pencucian biji.

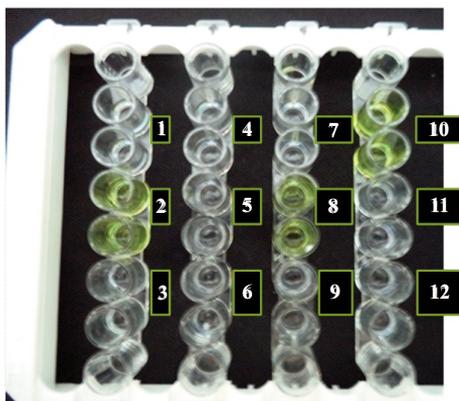
Hasil uji serologi *DAS-ELISA* menunjukkan bahwa benih komersial MAI 116 dan sampel buah yang berasal dari 2 lokasi di Kabupaten Magelang yaitu Desa Bligo, Kecamatan Ngluwar dan Desa Ngrajek, Kecamatan Mungkid, terindikasi positif terinfeksi *A. citrulli* yang ditunjukkan dengan perubahan warna pada sampel uji lebih besar dan buffer tetap tidak berwarna (Gambar 2).

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada sentra produksi melon di DIY dan sekitarnya yaitu Kabupaten Sleman, Gunung Kidul, Kulon Progo, Bantul, Magelang, dan Purworejo telah ditemukan penyakit yang gejalanya mirip dengan BFB pada melon. Akan tetapi, berdasarkan analisis serologi dengan metode *DAS-ELISA* diketahui hanya sampel yang berasal dari Kabupaten Magelang yang terdeteksi adanya *A. citrulli*, sedangkan pada sampel yang dikoleksi dari Kabupaten Sleman, Gunung Kidul, Kulon Progo, Bantul, dan Purworejo tidak terdeteksi adanya *A. citrulli* (Tabel 1). Sampel positif yang berasal dari Desa Ngrajek, Kecamatan Mungkid, Kabupaten Magelang memiliki nilai absorbansi ELISA (NAE) sebesar 2,847 dan kontrol positif 3,141, sedangkan sampel yang diambil dari Desa Bligo, Kecamatan Ngluwar memiliki NAE sebesar 3,88 dan kontrol positif 3,205. Untuk benih komersial, MAI 116 terindikasi positif terinfeksi *A. citrulli* ditunjukkan dengan nilai absorbansi sampel sebesar 3,065 (Tabel 2). Nilai absorbansi sampel yang tinggi menunjukkan konsentrasi antigen pada sampel tinggi. Kontrol positif adalah larutan yang telah diketahui konsentrasi antigen, sehingga hasil absorbansi yang diperoleh dari kontrol positif ini dijadikan sebagai tolok ukur. Intensitas warna yang terbentuk berkorelasi dengan jumlah antigen yang ada pada sampel (Goulter & Randles, 2015).

A. citrulli merupakan bakteri tular benih. Bakteri ini terakumulasi pada embrio dan lapisan perisperm endosperm (Duta *et al.*, 2012). Bakteri ini dapat masuk ke dalam biji melalui bunga, buah, stomata



Gambar 1. Kerusakan pada buah melon yang banyak dijumpai di lahan (tanda panah): buah retak hingga pecah, retakan buah berwarna hitam (A); terdapat becak berwarna hijau tua kebasahan pada permukaan buah (B)



Gambar 2. Pengujian DAS-ELISA pada sampel benih komersial dan sampel yang diambil dari enam kabupaten di DIY dan sekitarnya: Action 434 (1); MAI116 (2); Glamour (3); sampel melon Sleman 1 (4); sampel melon Bantul 1 (5); sampel melon Kulon Progo 3 (6); sampel melon Gunung Kidul 1 (7); sampel melon Magelang 1 (8); sampel melon Purworejo 1 (9); kontrol positif (10); bufer (11); kontrol negatif (12)

Tabel 1. Hasil deteksi dengan DAS-ELISA sampel melon dari beberapa kabupaten di DIY dan Jawa Tengah

No.	Komoditas	Kabupaten	Lokasi	Hasil
1	Melon	Sleman	1. Wukirsari, Cangkringan 2. Ambarketawang, Gamping 3. Pendowoharjo, Sleman	- - -
2		Gunung Kidul	1. Kemadang, Tanjung Sari 2. Logandeng, Playen 3. Siraman, Wonosari	- - -
3		Kulon Progo	1. Kalidengen, Temon 2. Plumbon, Temon 3. Demen, Temon	- - -
4		Bantul	1. Tirenggo, Bantul 2. Pendowoharjo, Sewon 3. Guwosari, Pajangan	- - -
5		Magelang	1. Jetak, Mungkid 2. Bligo, Ngluwar 3. Ngrajek, Mungkid	+ + -
6		Purworejo	1. Tegal Kuning, Banyu Urip 2. Wingko Mulyo, Ngombol 3. Bagelen, Bagelen	- - -

Tabel 2. Hasil deteksi dengan DAS ELISA sampel melon benih komersial

No.	Varietas	Produksi	Hasil
1	Action 434	PT Bisi International Tbk.	-
2	Glamour	PT Sakata	-
3	MAI116	CV Multi Global Agrindo	+

daun atau luka. Hasil penelitian Walcott *et al.* (2003), menunjukkan bahwa infeksi yang terjadi ketika berbunga menghasilkan buah yang tidak bergejala meskipun biji telah terinfeksi. Mekanisme seperti ini dapat memberikan penjelasan terhadap adanya biji yang terkontaminasi berdasarkan pemeriksaan visual di lapangan. Biji yang terkontaminasi ini adalah sumber inokulum bagi penyebaran BFB. Sampai saat ini belum ada perlakuan yang dapat mengeliminasi bakteri ini pada biji (Walcott, 2005; Feng *et al.*, 2009) dan kemampuan bakteri ini bertahan pada biji yang disimpan cukup lama mencapai 7,5 tahun (Walcott, 2008).

Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi *A. citrulli* antara lain diagnostik agar, uji perkecambahan, serologi dan molekuler. Namun dengan adanya biji yang terinfeksi *A. citrulli* namun tidak menimbulkan gejala pada buah, maka metode deteksi yang sensitif menjadi sangat perlu dilakukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2014. *Nilai Impor dan Ekspor Buah Tahun 2012*. Direktorat Jenderal Hortikultura, diakses 1/2/14.
- Anonim. 2015. *Acidovorax citrulli* (Fruit Blotch)-Crop Protection Compendium. CAB International. Oxfordshire.
- Assouline, I., H. Milshtein, M. Mizrahi, E. Levy, & I.S. Ben-Ze'ev. 1997. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* Transmitted by Solanaceous Seeds. *Phytoparasitica* 25: 117–118.
- Burdman, S. & R. Walcott. 2012. *Acidovorax citrulli*: Generating Basic and Applied Knowledge to Tackle a Global Threat to the Cucurbit Industry. *Molecular Plant Pathology* 13: 805–815.
- Clark, M.F. & A.N. Adams. 1977. Characterization of the Microplate Method of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Plant Viruses. *Journal of General Virology* 34: 475–483.
- Deng, W.L., T.C. Huang, & Y.C. Tsai. 2010. First Report of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* as the Causal Agent of Bacterial Leaf Blight of Betelvine in Taiwan. *Plant Disease* 94: 1065–1065.
- Dijkstra, J. & C.P. de Jager. 1998. *Practical Plant Virology Protocols and Exercises*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 459 p.
- Dutta, B., U. Avci, M.G. Hahn, & R.R. Walcott. 2012. Location of *Acidovorax citrulli* in Infested Watermelon Seeds is Influenced by the Pathway of Bacterial Invasion. *Phytopathology* 102: 461–468.
- Feng, Z.T., A. Sechler, P. Randhawa, J. Li, & N.W. Schaad. 2009. An Improved Assay for Detection of *Acidovorax citrulli* in Watermelon and Melon Seed. *Seed Science and Technology* 37: 337–349.
- Goulter, K. & J. Randles. 2015. Serological and Molecular Techniques to Detect and Identify Plant Pathogenes. [http://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/11identification of pathogenes KCG& JWR.pdf](http://www.appsnet.org/Publications/Brown_Ogle/11identification%20of%20pathogens%20KCG%20JWR.pdf), diakses 23/5/15.
- Himananto, O., P. Thummabenjapone, P. Luxananil, M. Kumpoosiri, R. Hongprayoon, W. Kositratana, & O. Gajanandana. 2011. Novel and Highly Specific Monoclonal Antibody to *Acidovorax citrulli* and Development of ELISA-Based Detection in Cucurbit Leaves and Seed. *Plant Disease* 95: 1172–1178.
- Langston, D.B. 2013. *Acidovorax citrulli* Bacterial Fruit Blotch of Cucurbit. European and Mediterranean Plant Protection Organization.
- Latin, R.X. 2000. Bacterial Fruit Blotch of Cucurbit. *Plant Health Progress*, doi:10.1094/PHP-2000-0602-01-HM.
- Latin, R.X. & D.L. Hopkins. 1995. Bacterial Fruit Blotch of Watermelon The Hypothetical Exam Question Become Reality. *Plant Disease* 79: 761–765.
- Latin, R.X. 2014. Diseases and Pests of Muskmelons and Watermelons. Cooperative Extension Service. Purdue University, West Lafayette.
- Walcott, R.R. 2005. Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits. The Plant Health Instructor, DOI: 10.1094/PHI-I-2005-1025-02.
- Walcott, R.R., Gitaitis, R.D., & A.C. Castro. 2003. Role of Blossom in Watermelon Seed Infestation by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. The American Phytopathology Society. Publication no. P-2003-0227-01R.
- Walcott, R.R. 2008. Integrated Pest Management of Bacterial Fruit Blotch of Cucurbits in Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, p. 187–205. A. Ciancio & K.G. Mukerji (eds.), *Phytoplasma and Bacteria*. Springer, Netherland.