

# Kajian Penyebaran & Karakterisasi Molekuler

Perlakuan Benih Untuk Mengeliminasi  
*Clavibacter Michiganensis subsp.  
michiganensis* (Smith) pada Tomat



Dr. Aprizal Zainal, SP., M.Si.

**Sanksi Pelanggaran Pasal 113**  
**Undang-undang No. 28 Tahun 2014 Tentang Hak Cipta**

1. **Setiap Orang** yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).
3. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf a, huruf b, huruf e, dan/atau huruf g untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah).
4. Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada ayat (3) yang dilakukan dalam bentuk pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah).

# **KAJIAN PENYEBARAN & KARAKTERISASI MOLEKULER**

Perlakuan Benih Untuk Mengeliminasi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Pada Tomat

**Aprizal Zainal**



# **KAJIAN PENYEBARAN & KARAKTERISASI MOLEKULER**

Perlakuan Benih Untuk Mengeliminasi *Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis* (Smith) Pada Tomat

**Diterbitkan pertama kali oleh CV Amerta Media**  
**Hak cipta dilindungi oleh undang-undang *All Rights Reserved***  
**Hak penerbitan pada Penerbit Amerta Media**  
**Dilarang mengutip atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini**  
**tanpa seizin tertulis dari Penerbit**

**Anggota IKAPI**  
Cetakan Pertama: Desember 2021  
15,5 cm x 23 cm

**ISBN**  
**978-623-419-022-9**

**Penulis:**  
Aprizal Zainal

**Editor:**  
Dimas Rahman Rizqian

**Desain Cover:**  
Adji Azizurrachman

**Tata Letak:**  
Amar Al Farizi

**Diterbitkan Oleh:**  
CV. Amerta Media

**NIB. 0220002381476**

Jl. Raya Sidakangen, RT 001 RW 003, Kel, Kebanggan, Kec. Sumbang,  
Banyumas 53183, Jawa Tengah. Telp. 081-356-3333-24

Email: [mediaamerta@gmail.com](mailto:mediaamerta@gmail.com)

Website: [www.penerbitbuku.id](http://www.penerbitbuku.id)

Whatsapp : 081-356-3333-24

Isi di luar tanggung jawab penerbit Amerta Media

---

## KATA PENGANTAR

---

*Assalamualaikum warahmatullahi wabarakatuh*

Segala puji dan syukur atas rahmat Allah SWT, karena berkat rahmat serta karunia-Nya buku dengan berjudul *Kajian Penyebaran & Karakterisasi Molekuler: Perlakuan Benih Untuk Mengeliminasi Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Smith) Pada Tomat* selesai disusun. Salawat dan salam senantiasa teruntuk kepada Nabi besar Muhammad SAW yang telah mengantarkan nilai-nilai ilahiah dan jalan keselamatan kepada umat manusia.

Bahan dasar buku ini merupakan pengembangan dari disertasi penulis yang memiliki judul asli *Penyebaran dan Karakterisasi Molekuler Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Smith) Serta Perlakuan Benih untuk Mengeliminasi Cmm Pada Tomat*. Demi memperoleh manfaat yang lebih luas, maka penulis membukukannya.

Buku ini ditulis sebagai media berbagi penulis sekaligus melaporkan keberadaan *Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis (Cmm)* di berbagai sentra penanaman tomat di Sumatera dan Jawa. Berdasarkan tipe serangan *Cmm* yang menginfeksi tomat, gejala serangan penyakit masih rendah tetapi *Cmm* telah ada di sejumlah sentra produksi tomat di Indonesia. Usaha pengendaliannya belum ditemukan yang efektif. Penggunaan varietas tahan sangat menguntungkan bagi petani, pendekatan lain adalah ketersediaan benih bebas patogen.

Keberhasilan buku ini tentu tidak akan terwujud tanpa adanya dukungan dan bantuan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada istri Dr. Maihasni dan anak-anak tercinta Muthia Septaprima (mahasiswa koas FK Unand tahun 2020, Maudia Azhara Raisa (mahasiswa FK Unand tahun 2019, Achmad Faridzi (siwsa MA Ar Risalah Padang tahun 2019) yang senantiasa mendukung dan memberikan do'a terbaik dalam setiap perjalanan. Serta ucapan terima kasih kepada kedua orang tua dan mertua kami (almarhum-almarhumah) semoga diberi kelapangan, penerangan, kesejukan

dalam alam kuburnya, kepada anggota keluarga besar penulis yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang turut mendukung penulis. Terima kasih juga kepada Penerbit Amerta Media yang bersedia mewujudkan disertasi penulis menjadi sebuah buku yang diharapkan bermanfaat bagi dunia akademik maupun non akademik.

Penulis menyadari tak ada gading yang tak retak, karena itu penulis memohon maaf atas ketidak sempurnaan buku ini. Kritik dan saran dari pembaca sangat diharapkan untuk kesempurnaan buku ini.

Padang, Desember 2021  
Penulis,

Aprizal Zainal

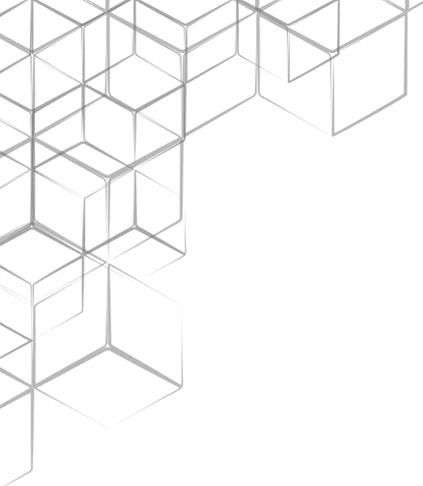
---

# DAFTAR ISI

---

|   |     |
|---|-----|
| Halaman Judul .....   | i   |
| Tentang Buku .....  | iv  |
| Kata Pengantar .....  | v   |
| Daftar isi .....  | vii |
| <b>BAB I</b>  |     |
| Pendahuluan .....   | 1   |
| <b>BAB II</b>   |     |
| Landasan Teori .....  | 5   |
| <b>BAB III</b>  |     |
| Penyebaran <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i><br>di Berbagai Sentra Produksi Tomat di Sumatera dan Jawa .....                                 | 17  |
| <b>BAB IV</b>   |     |
| Deteksi dan Karakterisasi Molekuler<br><i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i><br>Berdasarkan Sekuen Gen <i>Serine Protease</i> dan 16S rRNA ..... | 31  |
| <b>BAB V</b>  |     |
| Reaksi Ketahanan Berbagai Genotipe Tomat Terhadap<br>Inokulasi <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>Michiganensis</i> .....                                       | 59  |
| <b>BAB VI</b>   |     |
| Efektivitas Ekstrak Tumbuhan<br>untuk Mengeliminasi <i>Clavibacter</i><br><i>michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Secara <i>In Vitro</i> .....                 | 79  |
| <b>BAB VII</b>  |     |
| Efektivitas Perlakuan Benih Dengan<br>Ekstrak Tumbuhan Untuk Mengeliminasi <i>Cmm</i><br>dan Perbaikan Mutu Fisiologis Benih Tomat Terinfeksi .....                     | 95  |
| <b>BAB VIII</b>   |     |
| Penutup .....   | 113 |
| Daftar Pustaka .....  | 120 |
| Profil Penulis .....  | 134 |
| Indeks .....  | 135 |





# **BAB I**

## **Pendahuluan**

---

## Pengantar

Bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) merupakan penyebab penyakit kanker bakteri pada tanaman tomat. Dalam *Crop Protection Compendium* (2002) dinyatakan bahwa penyakit kanker bakteri yang dapat ditransmisikan melalui benih (*seed-transmitted pathogen*), telah tersebar di hampir seluruh penjuru dunia. Tahun yang sama belum ada laporan tentang penyakit ini di Indonesia. Bakteri *Cmm* merupakan patogen tanaman yang termasuk dalam daftar patogen karantina di negara-negara Eropa bahkan di dunia Internasional (European Union (1995) dalam Jahr *et al.* (2000), Dreier *et al.* (1997). Tahun 2006 karantina telah melakukan pemantauan *Cmm* di lokasi pertanaman tomat di Solok Sumatera Barat. Sejak tahun 2007 dinyatakan bahwa *Cmm* telah ada di areal pertanaman tomat di Indonesia, *Cmm* telah masuk dalam bakteri kategori A2, yang artinya keberadaannya ada di Indonesia, tetapi terbatas di suatu daerah (Departemen Pertanian Republik Indonesia 2009). Tetapi selanjutnya balai karantina akan melakukan pemeriksaan *Cmm* antar pulau, menganalisis resiko kerusakan oleh *Cmm* di suatu lokasi, dan mempelajari bagaimana perkembangan penyakit tersebut lebih lanjut. Hasil penelitian Anwar *et al.* (2004a) mengindikasikan patogen ini sudah masuk ke Indonesia, karena beberapa lot benih tomat komersial Indonesia yang diuji ternyata positif membawa *Cmm*.

Penyakit kanker bakteri telah menyebabkan kerugian yang serius di Amerika Utara, Eropa, Australia dan New Zealand (Neergaard 1988), serta Afrika, Amerika Selatan dan China, terutama selama cuaca panas dengan suhu 26-28 °C (Hayward & Waterston 1964). Chang *et al.* (1992) menyatakan dari berbagai laporan di berbagai negara, kerugian mencapai 80% dapat disebabkan oleh penyakit ini. Begitu patogen ini menyebar ke tanah dan sisa tanaman, dia dapat bertahan sampai lebih dari 26 bulan (Fatmi & Schaad 2002) karena itu sulit dikendalikan.

Pada tahun 1988, Asandhi dan Sastrosiswojo melaporkan bahwa hanya sekitar 5% dari seluruh areal produksi sayuran komersial yang menggunakan benih bermutu dan semuanya berasal dari luar negeri (impor), namun semenjak era 90-an kondisi tersebut mulai berubah. Beberapa perusahaan produsen benih mulai didirikan, seperti PT. *East West Seed* Indonesia, PT. Tanindo, dan PT.

Riawan Tani, sementara Perum *Sang Hyang Seri* yang semula mandatnya menyediakan benih tanaman pangan khususnya padi, juga mulai meramaikan pasar perbenihan sayuran di Indonesia.

Konsekuensi dari impor benih yang telah berlangsung selama ini dan lalu lintas plasmanutrafik untuk perakitan varietas-varietas baru adalah semakin besarnya kemungkinan terbawanya patogen bersama benih-benih tersebut, karena benih merupakan wahana yang sangat cocok bagi patogen untuk menyebar melintasi batasan alamnya (Neergard 1988; Agrios 2005). Dengan menempel di permukaan benih atau berada di dalamnya, patogen dapat melintasi gunung, atau bahkan lautan luas sekalipun. Kenyataan ini, disadari atau tidak telah turut menyebarkan bahkan memasukkan patogen baru ke Indonesia diantaranya adalah bakteri *Cmm* penyebab penyakit kanker bakteri pada tomat.

Sampai sejauh ini belum banyak laporan tentang gejala penyakit ini di berbagai sentra produksi tomat Indonesia. Berdasarkan laporan Sumarti (2009) *Cmm* sudah ada di Indonesia dan berhasil diisolasi dari batang tanaman tomat bergejala asal Kabupaten Solok, Sumatera Barat. Penyakit ini sudah ada di Indonesia tetapi gejalanya belum diketahui oleh pihak pengamat hama dan penyakit, begitu juga petani. Berdasarkan wawancara langsung kami dengan pihak-pihak tersebut, memperkuat keyakinan penyakit ini sudah ada di sentra produksi tomat di Indonesia. Gejala dan ciri-ciri penyakit ini belum dikenal mereka. Kemungkinan lain, persentase tanaman terserang masih jauh di bawah ambang ekonomis sehingga belum menjadi perhatian.

Berdasarkan kondisi tersebut di atas, pada tahap pertama dari kegiatan penelitian ini telah dilakukan upaya pelacakan penyakit kanker bakteri di enam propinsi Indonesia. Keenam propinsi tersebut adalah Sumatera Utara, Sumatera Barat, Bengkulu, Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Jawa Timur. Masing-masing propinsi tersebut merupakan sentra produksi tomat Indonesia (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura Departemen Pertanian 2005). Diharapkan dari sini dapat diperoleh informasi tentang keberadaan penyakit ini di sentra produksi tomat Indonesia dan sejauh mana penyebarannya. Pada tahap ini dikumpulkan isolat bakteri penyebab penyakit kanker pada tomat dari semua daerah sentra produksi. Selanjutnya dideteksi, analisis karakter molekuler isolat tersebut dan upaya pengendaliannya. Kegiatan ini merupakan bagian dari

penelitian yang berjudul : Penyebaran dan karakterisasi molekuler *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) serta perlakuan benih untuk mengeliminasi *Cmm* pada tomat.

### **Fokus Pembahasan Buku**

Penelitian yang penulis sajikan dalam buku ini memiliki tujuan untuk (1) Memantau keberadaan *Cmm* dengan mengumpulkan sampel buah dan tanaman tomat yang bergejala serangan, memperkirakan serangan penyakit di lapangan, mengidentifikasi keberadaan *Cmm*, dan menentukan penyebaran *Cmm* di Sumatera and Jawa. (2) Mendeteksi dan mengkarakterisasi molekuler *Cmm* melalui amplifikasi PCR terhadap gen *serine protease* dan 16S rRNA, menentukan sekuen nukleotida gen *serine protease* dan 16S rRNA tersebut, mengidentifikasi bakteri-bakteri yang berasosiasi dengan penyakit kanker pada tomat, dan menganalisis diversitas sekuen nukleotida gen *serine protease* dan 16S rRNA dari *Cmm* yang diteliti. (3) Mempelajari reaksi ketahanan genotipe tomat terhadap *Cmm* melalui cara inokulasi yang efektif dan melihat korelasi ketahanan genotipe tomat terhadap aktivitas peroksidase. (4) Menskrining minyak dan ekstrak tumbuhan yang mampu menghambat *Cmm* secara *in vitro*, dan mengevaluasi penghambatan minyak dan ekstrak tumbuhan terpilih secara *in vitro* tersebut terhadap benih tomat terinfeksi *Cmm*. (5) Bagian terakhir dari penelitian ini adalah mengevaluasi efektivitas perlakuan benih untuk mengeliminasi *Cmm* dengan tetap mempertahankan mutu fisiologis benih tomat terinfeksi.

Kegiatan penelitian dalam buku ini meliputi lima topik kegiatan yaitu; (1) Penyebaran *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* di berbagai Sentra Produksi Tomat di Sumatera dan Jawa, (2) Deteksi dan Karakterisasi Molekuler *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* berdasarkan Sekuen Gen Serine Protease dan 16S rRNA, (3) Reaksi Ketahanan Berbagai Genotipe Tomat terhadap Inokulasi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, (4) Efektivitas Ekstrak Tumbuhan untuk Mengeliminasi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* secara *in Vitro*, (5) Efektivitas Perlakuan Benih dengan Ekstrak Tumbuhan untuk Mengeliminasi *Cmm* dan Perbaikan Mutu Fisiologis Benih Tomat Terinfeksi.



# **BAB II**

## **Landasan Teori**

## Tanaman Tomat

Sistem klasifikasi tumbuhan, tomat (*Lycopersicum esculentum* L.) termasuk ke dalam divisi *Spermatophyta* (tumbuhan berbiji), sub divisi *Angiospermae* (berbiji tertutup), kelas *Dicotyledoneae*, ordo *Tubiflorae*, famili *Solanaceae* dan genus *Lycopersicum*. Tomat merupakan tanaman semusim berbentuk perdu dengan jumlah kromosom somatik  $2n = 2x = 24$  (Jaya 1997). Tomat berasal dari daerah dataran tinggi Andes di Amerika Selatan. Tanaman ini diperkirakan masuk ke Asia Tenggara, termasuk Indonesia pada abad ke 16-17 (Siemonsma & Piluek 1994).

Tomat mempunyai akar tunggang dengan batang berbentuk silinder dan ditutupi oleh bulu-bulu halus. Tipe pertumbuhannya ada yang determinate (contohnya kultivar Intan) dan indeterminate (contohnya kultivar Moneymaker). Bunga tomat berkelamin dua (Jaya 1997). Bunga pertama muncul sekitar 5-7 minggu setelah tanam pada kondisi optimum. Aslinya tomat adalah menyerbuk silang, namun kultivar-kultivar baru cenderung menyerbuk sendiri. Penyerbukan umumnya dibantu oleh serangga, pada umumnya adalah lebah (Siemonsma & Piluek 1994). *Pollen tube* tumbuh lambat dan fertilisasi terjadi 50-55 jam setelah polinasi. Buah akan masak 6-8 minggu kemudian.

Berat 1000 benih tomat sekitar 2,5-3,5 g. Benih berukuran 3-5 mm x 2-4 mm berbentuk bulat pipih berwarna coklat terang dan berambut, terdiri dari embrio, endosperm dan kulit benih. Jumlah biji dalam satu buah berkisar antara 50-80 pada tomat kecil (*cherry tomatoes*) sampai 250 pada tomat besar (*fresh market cultivar*). Tipe perkecambahan epigeal. Benih akan berkecambah 6 hari setelah dikecambahkan pada suhu optimum 20-25 °C dan daun pertama akan terbentuk seminggu kemudian. Benih kering, kadar air 5,5 % dapat bertahan viabilitasnya 90-95 % sampai beberapa tahun pada penyimpanan suhu kamar 18-24 °C (Siemonsma & Piluek 1994; Desai *et al.* 1997; Jaya 1997).

Tanaman tomat dapat diusahakan di dataran rendah sampai tinggi. Namun produktifitas yang tinggi umumnya diperoleh di dataran sedang sampai tinggi. Temperatur ideal bagi tanaman tomat adalah 24–28 °C. Curah hujan yang dibutuhkan antara 750-1250 mm/tahun dengan irigasi yang baik. Tanah yang subur, sedikit berpasir dan kaya akan bahan organik dengan jenis tanah latosol,

andosol, dan alluvial dengan kisaran pH 5,5-6,5 merupakan lokasi yang ideal bagi pertanaman tomat (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura Departemen Pertanian 2005).

Cuaca yang hangat dengan cahaya matahari berlimpah dibutuhkan untuk perkembangan terbaik bagi tanaman tomat, namun suhu yang terlalu tinggi menyebabkan tanaman ini tak mampu berbuah (Desai *et al.* 1997). Pada kondisi yang optimum tomat dapat mencapai hasil lebih dari 40 t/ha. Hasil rata-rata dunia 25 t/ha pada tahun 1989. Produktivitas yang cukup tinggi tersebut belum dapat diikuti negara berkembang, seperti di negara-negara Asia Tenggara yang hasilnya masih sekitar 8-12 t/ha. Sedangkan hasil Indonesia selama lima tahun terakhir (2000-2004) masih sekitar 12 t/ha dengan luas panen sekitar 50 ribu hektar. Total areal tanaman tomat dunia sekitar 2,7 juta ha dengan produksi sekitar 68 juta ton (Siemonsma & Piluek 1994).

Hampir seluruh propinsi di Indonesia memproduksi tomat, namun produksi tertinggi dihasilkan oleh pulau Sumatera dan Jawa. Lebih dari 80 % produksi tomat Indonesia dihasilkan oleh kedua pulau tersebut (Jaya 1997). Setiap propinsi di Sumatera memproduksi tomat. Produksi tomat terbesar berasal dari Sumatera Utara (135.410 t), Bengkulu (17.141 t) dan Sumatera Barat (11.692 t) diikuti propinsi lainnya di bawah 10 ribu ton masing-masingnya. Sementara itu, lebih dari separuh produksi tomat Indonesia dihasilkan di Jawa. Penghasil tomat utama di Jawa adalah Jawa Barat (273.818 t), Jawa Timur (38.410 t), dan Jawa Tengah (13.845 t), sementara propinsi lainnya menghasilkan tomat dengan produksi jauh lebih rendah (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura Departemen Pertanian 2005).

Tahun 2004 luas pertanaman tomat di Indonesia mencapai 52.719 ha dengan produktivitas 11,89 ton/ha dan produksi 626.872 ton. Hasil ini lebih rendah dibandingkan produksi tahun 2003 yaitu sebesar 657.459 ton dan produktivitasnya 17,33 ton/ha, sedangkan luas pertanaman tomat hanya 47.884 ha (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura 2005). Salah satu kendala menurunnya produksi tomat karena serangan patogen seperti *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* atau *bacterial speck* yang disebabkan *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (bakteri gram negatif), *Erwinia carotovora* yang berupa busuk lunak (*soft-rot*), *damping-off* (cendawan patogen yakni *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium*, *Sclerotinia*

dan sebagainya) yang menimbulkan penyakit tanaman. Penyakit penting yang lain diantaranya kanker bakteri yang disebabkan oleh *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

### **Penyakit Kanker Bakteri pada Tomat**

Penyakit kanker bakteri pada tomat pertama kali dilaporkan pada tahun 1909 di Michigan, Amerika Serikat oleh Smith (Hayward & Waterston, 1964 dan Jones *et al.* 1993). Semenjak itu, berbagai laporan tentang penyakit ini terus dilaporkan dan dalam *Crop Protection Compendium* (2002) dinyatakan bahwa penyakit kanker bakteri yang disebabkan *Clavibacter* (*Corynebacterium*) *michiganensis* subsp. *michiganensis* adalah penyakit yang ditransmisikan melalui benih (*seed-transmitted pathogen*) telah tersebar di hampir seluruh penjuru dunia. Penyakit ini merupakan salah satu penyakit penting pada tanaman tomat di dunia karena dapat menimbulkan kerusakan mencapai 80% (Hadas *et al.* 2005). Inang utama *Cmm* adalah tomat (*Lycopersicon esculentum*), sedangkan inang sekundernya adalah paprika (*Capsicum annum*) dan tumbuhan liar *black nightshade* (*Solanum nigrum*) (CAB *International* 2007). Berdasarkan laporan Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian (BBUSKP) tahun 2006, 2007, dan 2008 *Cmm* telah terdeteksi pada tanaman tomat bergejala yang merupakan sampel pemantauan dari Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Teluk Bayur Sumatera Barat dengan uji ELISA. Saat ini belum banyak data yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut telah ditemukan di Indonesia dan sejauh mana penyebarannya.

Gejala awal yang dapat dilihat adalah bercak dan layu pada helaian daun terbawah. Daun yang layu menggulung ke atas, ke arah dalam dan kemudian berwarna coklat dan mengering tetapi tidak gugur. Seringkali daun yang menunjukkan gejala hanya pada satu sisi saja. Gejala layu akan menjalar dari satu daun ke daun berikutnya, bahkan sampai seluruh daun dan menghancurkan seluruh daun (Agrios 2005). Awalnya petiole daun yang layu akan tetap segar (Jones *et al.* 1993). Infeksi stadium awal bakteri *Cmm* mengkoloni pada pembuluh *xylem*, kemudian ke pembuluh *phloem*, inti sel, dan korteks. Gejala layu pada tanaman merupakan akibat dari tersumbatnya pembuluh *xylem* oleh koloni *Cmm* dalam konsentrasi

tinggi dan adanya produksi *exopolysaccharides* (EPS) dengan berat molekul yang tinggi (Jahr *et al.* 2000).

Goresan berwarna terang muncul di batang dan petiole, biasanya antara petiole dan batang. Rengkahan muncul pada goresan tersebut dan membentuk kanker. Kondisi cuaca yang panas dan lembab, massa bakteri berlendir keluar melalui bagian ini dan menyebar ke daun dan buah dan menyebabkan infeksi sekunder (Agrios 2005).

Gejala pada buah kelihatan seperti bercak putih kecil, pusatnya kemudian sedikit membengkak, berwarna gelap dan kasar. Akhirnya muncul bercak seperti mata burung (*bird's-eye-like spots*) dengan bagian tengah coklat dengan diameter sekitar 3 mm dan lingkaran (*halo*) putih sekelilingnya (Agrios 2005). Secara internal, jaringan pembuluh (*vascular*) di dalam buah yang menuju biji akan berwarna kuning, warna kuning dapat juga terjadi pada guratan kaliks. Gejala pada buah ini tak selalu terjadi, tetapi apabila ditemukan akan sangat membantu mengenalinya karena gejala ini sangat khas *Cmm* (Jones *et al.* 1993).

Irisan longitudinal batang yang terinfeksi garis berwarna putih-krem, kuning atau coklat kemerahan dapat dilihat pada jaringan yang mengayu dan sepanjang *phloem*. Jaringan pengangkut mengalami diskolorasi kecoklatan dan cavities besar muncul pada pith dan korteks dan meluas ke bagian luar batang dimana terbentuk kanker. Diskolorasi pada jaringan pengangkut berlanjut menuju buah, baik ke arah luar menuju permukaan dan ke dalam menuju biji, dan lobang kecil berwarna gelap akan berkembang di dalam buah tersebut (Agrios 2005).

Infeksi primer dapat berasal dari penyebaran bakteri dari benih ke kotiledon atau daun, tetapi kebanyakan infeksi berasal dari penetrasi bakteri melalui pelukaan pada akar, batang, daun dan buah. Bakteri menyebar pada bagian tersebut melalui penanganan selama transplanting, air tanah, hujan, dan melalui kultur teknis seperti pemangkasan, pengikatan dan perompesan. Begitu berada di dalam tanaman, bakteri memasuki sistem pembuluh dan bergerak dan memperbanyak diri pentingnya di jaringan *xylem* dan bergerak di dalamnya dan keluar menuju *phloem*, kambium, dan korteks, dimana akan membentuk luka dan menghasilkan kanker (Agrios 2005).

Menurut Neergaard (1988) *seed-borne bacteria* seringkali disebut sebagai “*deep-seated*” tetapi biasanya terbatas hanya sampai di *seed-coat*. Salah satu contoh *Corynebacterium michiganense* dari jaringan pembuluh terus menyebar melalui khalaza dan terus ke sel-sel bagian dalam *seed-coat* tetapi tidak ke *endosperm* dan embrio. Di dalam *Working Sheet ISTA Handbook of Seed Health testing* No. 67 dinyatakan bahwa lokasi *Cmm* adalah di permukaan benih dan di bawah kulit benih.

Bakteri *Cmm* merupakan bakteri gram positif, aerob, non motil, tidak berspora, katalase positif, oksidase negatif (CAB International 2007, Schaad *et al.* 2001). Medium SCM koloni *Cmm* agak cembung, ireguler, mukoida, dengan warna abu-abu sampai hitam (*gray-to-black*), sedangkan pada media YDC koloni *Cmm* berwarna kuning cerah sampai kuning tua, cembung, dan mukoida (Fatmi and Schaad 1998). Klement *et al.* (1990) menjelaskan bahwa genus *Clavibacter* membentuk koloni yang *convex*, mucoïd, fluidal dengan warna putih, kuning atau jingga (*orange*) pada 1% GNA. Aktivitas ureasenya negatif, pertumbuhan pada suhu 36 °C juga negatif. Isolat bakteri *coryneform* ini sebaiknya diinkubasi pada suhu 27 °C.

Uji patogenesis dan hipersensitivitas merupakan tahapan pengujian patogen yang sangat penting. Kedua pengujian ini digolongkan oleh Lelliott & Stead (1987) sebagai uji inang (*host test*). Pengujian ini merupakan indikator yang sangat baik bagi sifat (*properties*) patogenik isolat bakteri dan merupakan metode yang paling tepat dalam menentukan identitas bakteri tersebut. Uji hipersensitivitas, disarankan menggunakan tumbuhan dengan daun yang lembut dan sukulen. Uji patogenesis, dianjurkan menggunakan kultivar yang peka.

Uji hipersensitivitas, penggunaan tanaman *Mirabilis jalapa* sudah dilaporkan oleh Gitaitis (1990), Alarcon *et al.* (1998) dan Anwar *et al.* (2005). Semua bakteri patogen tanaman punya kemampuan menginduksi HR pada tanaman bukan inang, terutama bakteri penyebab nekrotik. HR ditandai dengan kolapsnya jaringan tanaman dalam waktu (7-8 jam) setelah diinfiltrasi dengan bakteri dengan konsentrasi tinggi ( $> 10^7$  sel/ml). Kapasitas menginduksi HR dari bakteri merupakan prediket patogenesis dan digunakan dalam kriteria diagnose penyakit yang disebabkan bakteri. Tanaman *Nicotiana tabaccum* yang merupakan indikator standar untuk uji hipersensitivitas bakteri gram negatif, juga dapat digunakan untuk bakteri *Cmm*.

Berbagai metode uji patogenisitas bakteri *Cmm* telah dilaporkan, seperti memotong daun pertama dengan gunting yang sebelumnya direndam dengan suspensi *Cmm* (Moffett *et al.* 1983) atau memotong bagian epikotil sekitar 1 cm dari kotiledon dengan gunting yang sebelumnya direndam dengan suspensi *Cmm* (ISTA *Worksheet* No. 67). Umur/stadia bibit yang dianjurkan oleh van Vaerenbergh & Chauveau (1987) adalah setelah bibit mempunyai dua helai daun. Semua uji patogenisitas yang sudah dicoba adalah untuk isolat yang berasal dari subtropik dengan kondisi lingkungan subtropik. Belum dilaporkan metode uji yang tepat untuk isolat *Cmm* yang berasal dari Indonesia.

### **Identitas Patogen Berdasarkan Karakter Molekuler**

Metode karakterisasi bakteri dapat dilakukan dengan menggunakan analisis fenotipik yaitu dengan mempelajari sifat fisiologis atau biokimianya maupun analisis genotipik secara molekuler. Seringkali hasil uji biokimia atau fisiologis tersebut sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan atau kondisi sel itu sendiri karena perbedaan ekspresi gen. Karakterisasi strain-strain dalam satu spesies perlu dilihat sifat yang paling mendasar dan relatif stabil yaitu dengan analisis genotipik (Suwanto 1994).

Cara yang efektif mendeteksi bakteri *Cmm* adalah PCR menggunakan pasangan primer CM3/CM4 yang menghasilkan potongan DNA ukuran 645 bp (Hadas *et al.* 2005). Guna mengetahui nukleotida DNA 645 bp dapat disekuensi dan dianalisis menggunakan pangkalan data internet dengan program *Blast*. Sekuen hasil analisis ini ternyata belum dapat mengungkap filogeni dari taksa yang berdekatan terhadap identifikasi genus dan spesies bakteri.

Salah satu teknik standar yang digunakan untuk identifikasi bakteri yang belum diketahui spesiesnya adalah menggunakan sekuensing gen 16S-rRNA. Sekuensing gen 16S-rRNA merupakan kriteria penting dalam taksonomi mikroba (Krueze *ta al.* 1999). Semua organisme memiliki ribosomal RNA dan merupakan molekul target yang baik. Sekuen gen 16S-rRNA sering spesifik spesies dan memiliki copy ganda dalam genom mikroba (Dickstein *et al.* 2001). Molekul RNA merupakan kerangka dari ribosomal yang sangat berperan dalam proses translasi (Gutell *et al.* 1994). Peran fungsional semua rRNA identik yaitu berperan dalam proses translasi. Peran

fungsional semua rRNA identik yakni berperan dalam produksi protein, namun ada bagian tertentu dari sekuen tersebut terus berevolusi dan mengalami perubahan pada tingkat struktur primer sambil terus mempertahankan struktur sekunder dan tersier yang homologus.

Gen 16S rRNA pada bakteri sangat konservatif dengan variasi sangat kecil. Adapula beberapa segmen RNA sangat lambat evolusinya sehingga filogeni dari taksa yang berdekatan dapat dikonstruksi kembali. Kombinasi dari persamaan dan sekuen yang bervariasi ini sangat berguna dalam identifikasi genus dan spesies bakteri, dan mengungkap bagaimana proses keberadaan bakteri itu (Alizadeh *et al.* 1997).

Sekuensing gen 16S-rRNA dapat dilakukan pertama-tama dengan mengamplifikasi bagian 16S-rRNA dengan menggunakan teknik PCR dan primer universal untuk *prokaryot*. Teknik PCR merupakan teknik yang dapat mengamplifikasi DNA secara *in vitro* dengan sensitivitas dan spesifitas yang tinggi untuk deteksi dan identifikasi bakteri patogen (Browns *et al.* 2002; Horita & Tsuchiya 2001; Lee *et al.* 1997; Pstrik & Rainey 1999).

Produk amplifikasi PCR dapat langsung disekuen atau dipurifikasi dahulu dan diligasi ke dalam vector. Sel *E. coli* ditransformasikan dengan plasmid yang berisi insersinya. Sel ini kemudian ditumbuhkan pada kultur cair dan selanjutnya plasmid diisolasi dan dipurifikasi kembali. Hasil klon atau produk amplifikasi dapat disekuensing menggunakan *kit* sekuensing yang tersedia secara komersial atau menggunakan system sekuensing otomatis. Primer universal dapat digunakan untuk PCR maupun sekuensing. Hasil sekuensing dapat dianalisis dengan menggunakan pangkalan data internet dengan menggunakan fasilitas program *Blast*. Program *Blast* ini disediakan oleh *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (Dickstein *et al.* 2001).

### **Ketahanan Tomat terhadap *Cmm***

Ketahanan atau resistensi adalah kemampuan organisme untuk meniadakan atau mengatasi secara lengkap atau dalam beberapa tingkat pengaruh dari patogen atau faktor yang merusak lainnya (Agrios 2005). Resistensi terhadap penyakit pada tanaman ditunjukkan dengan terbatasnya gejala, yang mencerminkan ketidak

mampuan patogen untuk tumbuh, memperbanyak diri dan menyebar ke jaringan lainnya.

Ketahanan tanaman terhadap patogen bakteri terjadi dalam dua kelompok yaitu ketahanan pasif dan ketahanan yang terinduksi atau ketahanan aktif. Sistem ketahanan aktif meliputi pertahanan struktural, fisis, juga senyawa kimia yang bersifat antimikroba atau anti toksin yang telah ada pada tanaman sebelum terinfeksi bakteri fitopatogen. Ketahanan pasif meliputi induksi ketahanan dan reaksi hipersensitif oleh *elisor* atau *fitoaleksin* (Habazar & Rivai 2004).

Infeksi antara patogen yang tidak mampu menginfeksi tanaman inangnya dikelompokkan dalam interaksi yang bersifat inkompatibel. Interaksi inkompatibel tanaman mempunyai berbagai ragam sistem pertahanan yang rumit yang menyebabkan tahan terhadap serangan patogen. Selama interaksi inkompatibel, terjadi aktivitas metabolisme setelah terinfeksi patogen, terutama peningkatan respirasi, penyembuhan luka, suberisasi, kebocoran membran, produksi *fitoaleksin*, akumulasi dan oksidasi *fenolik* atau sintesis aglutinin (Mansfeid *et al.* 1987; Vance *et al.* 1980).

Upaya pemuliaan tomat yang resisten terhadap *Cmm* telah dimulai di USSR semenjak tahun 1949 (Hayward & Waterston 1964) dan diteruskan di beberapa negara lain, namun sampai saat ini belum didapatkan varietas yang benar-benar resisten (Francis *et al.* 2001). Thompson (1986) dalam Dreier *et al.* (1997) menyatakan bahwa tidak ada kultivar tomat yang resisten terhadap penyakit kanker bakteri ini dan belum ada pengendalian secara kimia yang efektif. Habazar (1987) menguji di Jerman ketahanan 97 varietas dan galur tomat yang berasal dari berbagai negara termasuk 6 varietas dari Indonesia dan menemukan bahwa pada umumnya varietas tersebut tergolong rentan, hanya 7 varietas yang tergolong tahan yaitu IRAT-L3 (dari Perancis); MSU 792009, MSU-79 2112, Heinz 2990 (dari Amerika); *Okitsu Sozai* No.1-20 (dari Taiwan).

Bakteri *Cmm* dapat bertahan lama di dalam tanah tanpa tanaman inang, dimana kelembaban yang tinggi adalah sangat menunjang penyebaran penyakit ini. Penyebaran dapat melalui tanah dan benih serta sisa tanaman yang terinfeksi yang merupakan sumber inokulum di lapangan. Menurut Strider (1969) *C. michiganensis* dapat bertahan pada kotiledon yang mengering selama 5 bulan.

Pemberantasan secara total terhadap penyakit ini sulit dilakukan, sekalipun telah dilakukan berbagai cara seperti cara bercocok tanam yang optimal, tindakan higienis dan perlakuan benih atau pemberantasan secara kimia (Bonn & Mac Neill 1983). Tindakan pengendalian tersebut sering tidak berhasil bila epidemi penyakit ini telah terjadi (Gitatitis *et al.* 1992). Salah satu cara yang penting dan sering berhasil dalam pengendalian penyakit ini adalah melalui penanaman varietas yang tahan.

Ketahanan genotipe tomat terhadap *C. michiganensis* telah banyak dilakukan penelitian, sebagai sumber ketahanan adalah *Lycopersicon peruvianum*, *L. pimpinellifolium* dan *L. hirsutum* (Russel 1978). Ketahanan tomat terhadap *Cmm* di Indonesia belum diketahui mengingat patogen ini masih baru dilaporkan. Melalui percobaan ini perlu dilakukan uji ketahanan genotipe tomat terhadap *Cmm* untuk menskrining genotipe tomat tahan akibat inokulasi *Cmm*. Genotipe tomat lokal yang ada di Indonesia diduga punya sifat ketahanan terhadap *Cmm*, mengingat genotipe ini sangat adaptif meskipun timbul cekaman abiotik (iklim dan pH tanah) dan biotik (serangan patogen) di habitatnya. Pekerjaan ini merupakan langkah awal program pemuliaan tanaman terhadap pengembangan kultivar unggul tahan penyakit kanker bakteri. Langkah pertama adalah menguji cara inokulasi suspensi *Cmm* yang efektif pada tomat, sehingga cara inokulasi suspensi yang efektif ini bisa diterapkan untuk menguji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat termasuk tomat lokal terhadap *Cmm*.

### **Eliminasi *Cmm* pada benih dengan ekstrak tumbuhan**

Pengendalian penyakit kanker bakteri termasuk sulit jika sudah terdapat di areal pertanaman. Sampai sejauh ini belum ada rekomendasi khusus untuk mengendalikannya di lapangan. Mengingat penyakit ini tertular melalui benih maka pengendalian yang efektif diperkirakan adalah dengan perlakuan benih (*seed treatment*). Hasil penelitian perlakuan benih sudah dilaporkan seperti perendaman benih dengan HCl (Fatmi *et al.* 1991 dan Desai *et al.* 1997), air hangat, pengaliran udara panas (Maude 1987) dan Anwar *et al.* (2004a) melaporkan bahwa minyak cengkeh cukup efektif menekan populasi bakteri *Cmm* pada benih tomat terinfeksi.

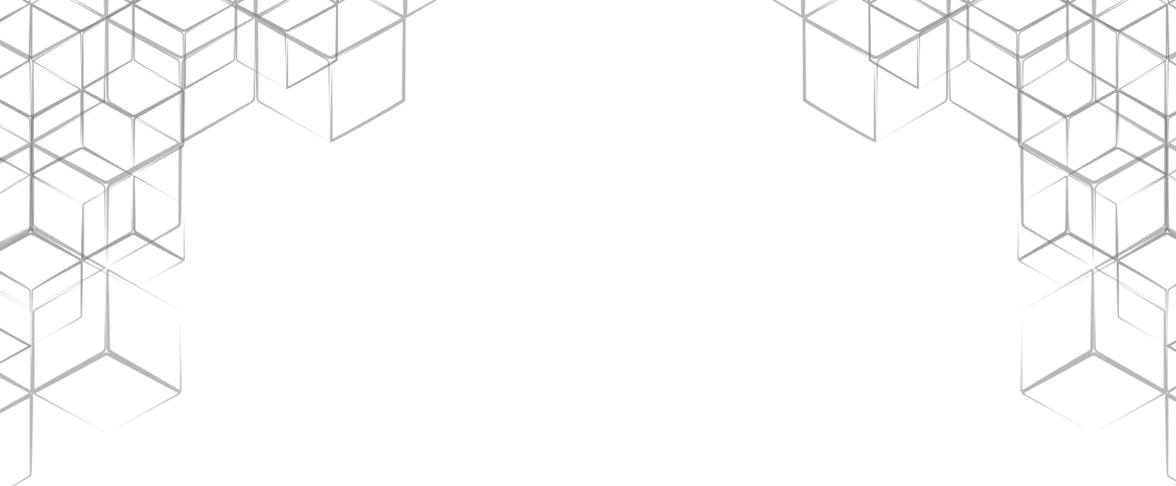
Pendekatan pengendalian penyakit dewasa ini juga beralih dengan menekankan metode yang ramah lingkungan. Bahan alami (ekstrak tumbuhan) seperti minyak atsiri dalam pengendalian penyakit merupakan pilihan yang banyak disarankan akhir ini. Indonesia memiliki kekayaan bahan alam yang banyak dan sangat terbuka lebar untuk menggali potensi ini. Saat ini belum ada laporan mengenai efektivitas ekstrak tumbuhan untuk pengendalian *Cmm* pada benih tomat, kecuali minyak cengkeh. Pemilihan bahan ekstrak tumbuhan yang baik untuk perlakuan benih adalah bahan yang dapat mengontrol patogen secara efektif, tidak berbahaya bagi benih, ekonomis, mudah didapat, tidak merusak, stabil dalam waktu yang panjang, tidak berbahaya/beracun bagi lingkungan (ternak dan manusia) (Nurdin *et al.* 2001).

Minyak cengkeh sebagai antimikrobia sudah banyak dilakukan seperti Arora & Kaur (1999), Dorman & Deans (2000), menghambat bakteri gram positif dan negatif yang menyebabkan pembusukan daging (Quattara *et al.* 1996). Minyak atsiri *Azadirachta indica* (Paul & Sharma 2002), sirih hutan menghambat parasit *Leishmania amazonensis* (Torres-Santos *et al.* 1996), daya insektisida, anti bakteri dan *molluscicidal* (Rali *et al.* 2007; Gomez *et al.* 1997; Orjala *et al.* 1998; Torres-Santos *et al.* 1999; Novotny *et al.* 2003). Temulawak bahan aktif *xanthorizol* mempunyai aktivitas fungisida (Rukayadi *et al.* 2006), mempunyai efek anti-*inflammantory*, karsinogenik, *hepatoprotective* (Fuganti & Serra 2000; Park *et al.* 2003). Kulit kayu manis manis sebagai antifungi (*Saccharomyces cerevisiae*) (Belitz & Grosch 1999; Maidment *et al.* 2006) dan antimikroba gram positif (*Staphylococcus albus*) dan gram negatif (*Escherichia coli*) (Friedman *et al.* 2002), antibakteri *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Shigella dysentria*, *Bacillus cereus* dan *Staphylococcus aureus* (Burt 2004).

Perbaikan mutu fisiologis benih menjadi pertimbangan utama ketika eliminasi patogen dengan ekstrak tumbuhan karena benih yang terserang patogen akan mengalami kemunduran mutu lebih cepat. Perlu diuji kemampuan bahan ekstrak tumbuhan dalam mengeliminasi *Cmm* yang terinfeksi pada benih yang diinkorporasikan dalam *matriconditioning*. Media yang biasa digunakan untuk *matriconditioning* adalah karbon aktif, abu gosok, serbuk gergaji dan arang sekam (Yunitasari & Ilyas 1994). *Matriconditioning* bertujuan untuk mencegah terjadinya infeksi yang

disebabkan oleh patogen yang terbawa benih baik di dalam, di permukaan maupun bersama benih sehingga akan didapatkan benih yang sehat. Perlakuan benih dapat pula melindungi benih dari serangan patogen yang berada dalam tanah.

*Conditioning* adalah peningkatan proses fisiologi dan biokimia selama penghambatan perkecambahan dengan penambahan air terkontrol pada media imbibisi dengan potensial air rendah sehingga dicapai keseimbangan potensial air pada benih dan media imbibisi (Khan 1992). *Matriconditioning* dengan media karbon aktif dengan atau tanpa penambahan fungisida sintesis ataupun botani seperti minyak cengkeh telah dilakukan untuk menguji efektivitas perlakuan benih terhadap kemampuannya melindungi benih cabai dari patogen *seedborne Colletotrichum capsici*, dengan nisbah 2 : 1 : 1 (benih : ekstrak tumbuhan : karbon aktif) pada suhu 22 °C selama 3 hari (Ilyas & Sudarsono 2002). Penelitian lainnya bubuk arang sekam (210 μ) digunakan sebagai media *matriconditioning* benih cabai dengan nisbah 2 : 2 : 1,5 pada suhu 20 °C selama 4 hari. Penelitian Untari (2004), pada benih cabai merah yang diberi perlakuan fungisida nabati yang dikombinasikan dengan *matriconditioning* menunjukkan penurunan tingkat kontaminasi *Colletotrichum capsici*.



## **BAB III**

Penyebaran *Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis* di Berbagai Sentra  
Produksi Tomat Di Sumatera dan Jawa

---

## Pengantar

Kanker bakteri, disebabkan oleh *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) adalah penyakit baru pada tomat di Indonesia. Keberadaannya secara resmi dilaporkan tahun 2004. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memonitor keberadaan *Cmm* diberbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa. Sampel tomat menunjukkan gejala infeksi *Cmm* dikumpulkan dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa dan agen penyebab penyakit diisolasi dari sampel. Berdasarkan type serangan *Cmm* yang menginfeksi tomat, gejala serangan berkisar antara 1-20%. Terhadap sejumlah 74 sampel tanaman tomat, diperoleh 24 isolat memiliki koloni morfologi sama dengan *Cmm*. Setelah uji fisiologis, reaksi hipersensitif dan patogenisitas, 18 isolat berasal dari 15 sentra produksi tomat di enam propinsi Sumatera dan Jawa diidentifikasi sebagai *Cmm*. Walaupun serangan penyakit masih rendah, penelitian menunjukkan bahwa *Cmm* telah ada di Indonesia dan telah menyebar di sejumlah sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa. Identifikasi positif *Cmm* dari sampel tomat seharusnya menjadi peringatan bagi semua pihak yang terkait terhadap produksi tomat di Indonesia, khususnya bertanggungjawab dalam regulasi perdagangan benih, importasi dan karantina tumbuhan.

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*), menyebabkan penyakit kanker bakteri pada tomat, adalah bakteri patogen yang dapat ditularkan melalui benih. Kanker bakteri telah menyebabkan kerusakan serius pada tanaman tomat (Hayward & Waterston 1964). Penurunan hasil akibat infeksi *Cmm* pada tomat bisa mencapai 80% (Chang & Pataki 1992; Vasinauskienė 2002). Pertumbuhan *Cmm* dan perkembangan penyakit optimal pada cuaca panas dengan suhu 26 – 28 °C (Hayward & Waterston 1964).

Kanker bakteri merupakan penyakit baru di Indonesia sejak negara ini dilaporkan bebas dari penyakit kanker bakteri hingga tahun 2002. Deteksi *Cmm* pada benih tomat yang diperdagangkan secara komersial di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Anwar et al. (2004a,b). Ada kemungkinan patogen ini telah menyebar ke sejumlah sentra produksi tomat di Indonesia.

*Cmm* bisa saja dimasukkan ke pusat-pusat produksi melalui benih yang terinfeksi. *Cmm* dapat dengan cepat menyebar di antara tanaman tomat melalui berbagai cara dan infeksi *Cmm* skala besar pada tanaman tomat dapat terjadi hanya dalam beberapa musim. Akan sulit untuk membasmi *Cmm* setelah patogen dikenal dan terbentuk di daerah tertentu (Ark 1994; Fatmi & Schaad 2002). Oleh karena itu, pemantauan keberadaan patogen ini dan seberapa luas penyebarannya di lapangan merupakan langkah yang diperlukan dalam mencegah penyebaran kanker bakteri lebih lanjut. Pengumpulan langsung *Cmm* yang dicurigai dari tomat yang ditanam di lapangan yang terinfeksi diikuti dengan analisis menggunakan prosedur laboratorium standar untuk identifikasi *Cmm* perlu dilakukan.

Penelitian ini bertujuan untuk memantau keberadaan *Cmm* di berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa. Tujuan khusus penelitian ini adalah (1) mengumpulkan sampel buah dan tanaman tomat yang menunjukkan gejala infeksi *Cmm*, (2) memperkirakan kejadian penyakit di lapangan berdasarkan gejala infeksi *Cmm*, (3) mengidentifikasi adanya *Cmm* antara sampel tomat yang dikumpulkan, dan (4) untuk mengetahui sebaran *Cmm* di berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa.

### **Koleksi Sampel Tomat yang Terinfeksi *Cmm***

Sampel *Cmm* dari jaringan dan buah tanaman tomat yang terinfeksi dikumpulkan sampai dengan Juli 2006. Sampel yang dikumpulkan terdiri dari daun, batang, dan buah yang menunjukkan berbagai gejala yang berhubungan dengan infeksi *Cmm*. Pengambilan sampel dilakukan dengan stratified random sampling dari berbagai sentra produksi tomat utama di Sumatera dan Jawa. Lihat bagian hasil untuk lokasi pengambilan sampel tomat.

Bahan tanaman yang dikumpulkan diambil dari masing-masing lokasi dan dibawa kembali secara langsung atau dikirim melalui pos kilat (Titipan Kilat - TIKI) dari lokasi ke Padang, Sumatera Barat. Isolasi bakteri patogen dari sampel tomat dilakukan di Lab Bakteriologi Jurusan Fitopatologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Sumatera Barat.

Peristiwa pendugaan infeksi *Cmm* dievaluasi dengan observasi lapangan langsung di setiap lokasi. Jumlah tanaman tomat yang menunjukkan gejala infeksi *Cmm* dicatat dan persentase kemunculan gejala di antara perkebunan tomat dihitung.

### **Isolasi *Cmm* Terduga dari Sampel Tomat**

Sampel tomat yang dikumpulkan (5 g) dicelupkan selama 15 menit dalam 15 ml buffer fosfat tris (PBT) pada suhu 4 °C dan dihomogenkan menggunakan mortar dan alu. Setelah sentrifugasi pada 1,844 xg selama 5 menit, ekstrak tumbuhan supernatan dipindahkan ke dalam tabung sentrifus mikro steril dan diberi label sebagai stok murni. Pengenceran serial 10-1 dan 10-2 dibuat dari masing-masing stok yang tidak diencerkan menggunakan PBT steril. Selanjutnya, masing-masing ekstrak yang tidak diencerkan dan diencerkan (100 l) dilapiskan dua kali ke media agar nutrisi (NA) dan diinkubasi pada suhu 23-27 °C.

Kemunculan koloni bakteri pada media NA dievaluasi 2 minggu setelah pelapisan. Semua koloni bakteri yang menunjukkan karakter yang mirip dengan koloni *Cmm* referensi dipindahkan ke media YDC. Koloni bakteri terpilih yang tumbuh pada media YDC yang menunjukkan kesamaan karakteristik koloni *Cmm* referensi (kuning, basah, dan mukoid) diisolasi dan dievaluasi berbagai karakter fisiologisnya. Suspensi isolat *Cmm* 542 (Anwar et al. 2004b; Anwar et al. 2005) pada 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, dan 10<sup>4</sup> cfu.ml<sup>-1</sup> disepuh pada media NA dan YDC dan digunakan sebagai kontrol.

### **Identifikasi Isolat Bakteri yang Dicurigai**

Koloni *Cmm* yang dicurigai diidentifikasi dari media YDC menjadi sasaran reaksi Gram (Suslow et al. 1982; Kritzman 1991; Fatmi dan Schaad 1998), produksi pigmen fluoresen, aktivitas pektinase, oksidasi dan uji reduksi nitrat, berturut-turut. Isolat yang dicurigai juga ditumbuhkan pada media TTC dan diuji toleransinya terhadap NaCl 6%. *Cmm* isolat 542 juga dikenai pengujian yang sama dan digunakan sebagai kontrol.

Setelah serangkaian uji fisiologis, isolat bakteri yang secara fisiologis diidentifikasi mirip dengan *Cmm* menjadi sasaran uji reaksi hipersensitif (HR) menggunakan daun *Nicotiana tabacum* dan

*Mirabilis jalapa* (Gitaitis 1990; Alarcon et al. 1998) dan diuji patogenisitasnya menggunakan tomat bibit. Pengujian HR dilakukan dengan menyuntikkan isolat bakteri yang diuji ke dalam daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* menggunakan jarum suntik 1 ml (Alarcon et al. 1998; Anwar et al. 2005). Terjadinya lesi nekrotik pada daun yang disuntik setelah 24 jam menunjukkan hasil positif untuk tes HR.

Uji patogenisitas dilakukan dengan menggunakan bibit tomat rentan *Cmm* umur empat minggu cv. Marta. Inokulasi bibit dengan isolat bakteri uji dilakukan dengan memotong epikotil pada 1 cm di atas kotiledon menggunakan gunting. Gunting sebelumnya telah dicelupkan ke dalam suspensi bakteri yang diuji (107 cfu.ml<sup>-1</sup>). Bibit yang diinokulasi ditutup dengan kantong plastik transparan untuk menjaga kelembaban dan diinkubasi selama 48 jam di rumah kaca. Terjadinya gejala khas yang terkait dengan infeksi *Cmm* seperti layu kotiledon, perubahan warna jaringan, dan layu atau kematian bibit dicatat dan digunakan untuk menentukan patogenisitas isolat yang diuji terhadap tanaman tomat.

### **Distribusi *Cmm* di Berbagai Sentra Produksi Tomat**

Survei yang dilakukan di berbagai lokasi di Jawa dan Sumatera (Tabel 1) menghasilkan 74 sampel tomat yang menunjukkan gejala infeksi *Cmm*. Sampel terdiri dari daun atau batang (72 sampel) dan buah yang menunjukkan gejala bercak mata burung (2 sampel). Berbagai gejala yang ditunjukkan oleh tanaman tomat dari beberapa sentra produksi tomat disajikan pada Tabel 1. Representatif gejala yang ditunjukkan oleh tanaman tomat dan tepat pada buah dari Solok, Kediri, Banjarnegara dan Cianjur disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1 Contoh tomat yang menunjukkan gejala khas yang dicurigai infeksi *Cmm* yang diamati di lapangan. (a) Buah tomat menunjukkan gejala bercak mata burung (panah) dari Danau Kembar, Solok, Sumatera Barat dan tanaman tomat menunjukkan (b) nekrosis batang (perubahan warna jaringan) dari Cipanas, Cianjur, Jawa Barat (c) daun layu dan nekrosis pada lingkaran daun Matus, Kediri, Jawa Timur (d) batang menghitam, daun layu dan nekrosis di lingkaran daun Wanayasa, Banjarnegara, Jawa Tengah dan (e) sekret batang pecah dan menunjukkan perubahan warna empulur (panah) dari Lembah Gumanti, Solok, Sumatera Barat.

### Kejadian Dugaan Infeksi *Cmm* di Lapangan

Peneliti melakukan wawancara dengan petani lokal menunjukkan bahwa sebagian besar dari mereka tidak mengenali gejala infeksi *Cmm* pada tomat. Survei yang dilakukan berdasarkan kejadian gejala khas infeksi *Cmm* pada tanaman tomat menunjukkan bahwa kejadian dugaan infeksi *Cmm* berkisar antara 1–20% (Tabel 1). Insiden penyakit tertinggi (sampai 20%) diamati di Pejawanan, Banjarnegara, Jawa Tengah, dan di Pujon, Malang, Jawa Timur (Tabel 1). Insiden penyakit berkisar antara 10-12 % diamati di Ngantang, Malang, Jawa Timur; Wanayasa, Banjarnegara, Jawa Tengah; Baso

dan Banuhampu, Agam, Sumatera Barat, dan Peceran, Berastagi/Karo, Sumatera Utara. Insiden hingga 5-7% diamati di Logumba, Berastagi/Karo, Sumatera Utara, Cipanas dan Pacet, Cianjur, Jawa Barat.

Tabel 1. Lokasi pengambilan sampel tomat, pengamatan gejala sampel yang dikumpulkan, kejadian penyakit dan jumlah isolat bakteri yang teridentifikasi positif sebagai *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa.

| <b>Provinsi: Lokasi, Kabupaten</b> | Gejala yang diamati pada sampel tomat yang dikumpulkan         | Insiden penyakit (%) * | Jumlah isolat <i>Cmm</i> ** |
|------------------------------------|--|------------------------|-----------------------------|
| <b>Sumatera Utara:</b>             |  |                        |                             |
| Peceran, Berastagi/ Karo           | Batang tomat kerdil yang menghitam                             | 2-10                   | 3                           |
| Logumba, Berastagi                 | Batang tomat kerdil yang menghitam                             | 1-5                    | 1                           |
| <b>Sumatera Barat:</b>             |  |                        |                             |
| Danau Kembar, Solok                | Gejala bintik mata burung                                      | 1-3                    | 2                           |
| Lembah Gumanti, Solok              | Membagi sekresi batang   | 0.8                    | 1                           |
| Tanjung Baru, Tanah Datar          | Daun layu dan nekrosis pada tepi daun                          | 1-4                    | 1                           |
| Baso, Agam                         | Daun layu dan nekrosis pada tepi daun                          | 2-11                   | 1                           |
| Banuhampu, Agam                    | Nekrosis batang (perubahan warna jaringan)                     | 2-10                   | 1                           |
| IV Angkek, Agam                    | Daun layu dan nekrosis pada tepi daun                          | 1-2                    | 1                           |
| <b>Bengkulu:</b>                   |  |                        |                             |
| Selupu Rejang, Rejang Lebong       | Daun layu dan nekrosis pada tepi daun, nekrosis batang         | 0.8                    | 1                           |
| Talang Rimbo, Kepahiang            | Batang tomat kerdil yang menghitam                             | 0.8                    | 1                           |
| <b>Jawa barat:</b>                 |  |                        |                             |
| Cipanas, Cianjur                   | Daun layu dan nekrosis pada tepi daun                          | 1- 5                   | 2                           |
| Pacet, Cianjur                     | Membagi sekresi batang   | 1-7                    | 1                           |
| <b>Jawa Tengah:</b>                |  |                        |                             |
| Pejawanan, Banjarnegara            | Nekrosis batang, daun layu dan nekrosis pada tepi daun         | 2-20                   | 1                           |
| Wanayasa, Banjarnegara             | Membagi sekresi batang dan menunjukkan perubahan warna empulur | 5-10                   | 2                           |
| <b>Jawa Timur:</b>                 |  |                        |                             |
| Matus, Kediri                      | Daun layu dan nekrosis   | 2-4                    | 1                           |
| Kepung, Kediri                     | Membagi sekresi batang dan menunjukkan perubahan warna empulur | 2                      | 2                           |
| Pujon, Malang                      | Nekrosis batang, daun layu dan nekrosis pada tepi daun         | 3-20                   | 1                           |
| Ngantang, Malang                   | Nekrosis batang  | 5-12                   | 1                           |

Keterangan:

\*Kejadian penyakit dihitung berdasarkan jumlah gejala yang dicurigai yang diamati pada tanaman di lapangan.

\*\*Identifikasi isolat bakteri yang dicurigai sebagai *Cmm* dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi dan fisiologis isolat.

Di berbagai lokasi yang disurvei, tomat cv. Marta merupakan kultivar tomat yang paling banyak menunjukkan gejala infeksi *Cmm*. Kultivar ini direkomendasikan untuk dibudidayakan di dataran tinggi. Varietas tomat lain yang menunjukkan gejala infeksi *Cmm* di lapangan adalah tomat cvs. Permata, Montera, dan Cosmonot. Keempat kultivar tomat tersebut merupakan kultivar yang paling banyak ditanam di Sumatera Utara, Sumatera Barat, Bengkulu, Jawa Timur, dan Jawa Barat.

### **Isolasi *Cmm* dari Sampel Tomat**

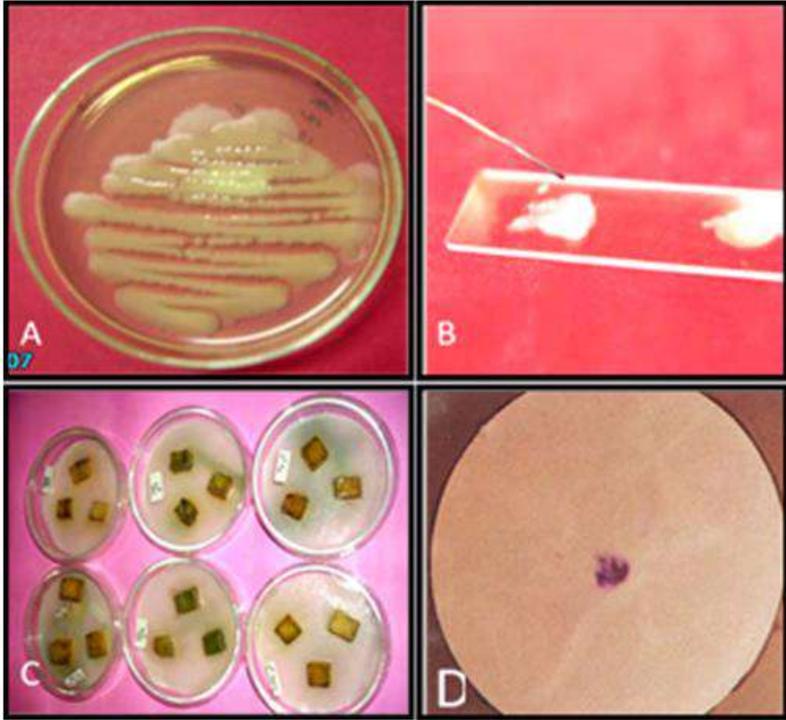
Isolat bakteri yang ditumbuhkan pada media NA menunjukkan banyak morfologi koloni yang berbeda. Dari koloni yang dievaluasi, hanya 24 yang menunjukkan morfologi yang mirip dengan isolat *Cmm* referensi 542 dan 24 isolat ini dipilih untuk percobaan lebih lanjut.

Untuk mendapatkan koloni tunggal murni, 24 isolat disebarkan ke media YDC dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu kamar. Koloni *Cmm* yang diharapkan pada media YDC harus tumbuh lambat, berlendir, dan berwarna kuning hingga jingga pucat (Anwar et al. 2005). Hasil pemurnian koloni tunggal menunjukkan bahwa enam isolat bukan *Cmm* dan hanya 18 isolat (Tabel 2) yang berwarna kuning dan merupakan koloni berlendir dan basah (Gambar 2a). Keenam isolat bakteri lainnya tumbuh cepat dan tidak menunjukkan koloni berlendir maupun kuning hingga pucat pada media YDC.

### **Identifikasi Isolat Bakteri**

Berbagai tes fisiologis dilakukan untuk mengkonfirmasi identitas isolat sebagai *Cmm*. Hasil evaluasi menunjukkan 18 isolat terpilih adalah gram positif (Tabel 2). Hasil juga menunjukkan bahwa 18 isolat tersebut semuanya menunjukkan hasil uji fisiologis yang sama dengan isolat *Cmm* 542 (Tabel 2), yang menunjukkan bahwa mereka adalah *Cmm*.

Isolat kontrol *Cmm* 542 jelas menginduksi respon HR positif pada daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* (Tabel 2). Hasil tes HR menunjukkan bahwa 17 dari 18 isolat juga menginduksi respon HR pada daun kedua spesies (Tabel 2). Satu isolat (KAR19), meskipun secara fisiologis menunjukkan karakter yang mirip dengan isolat *Cmm* 542, tidak menginduksi respon HR baik pada *N. tabacum* atau *M. jalapa*.



Gambar 2. Hasil representatif uji fisiologis terhadap isolat yang dicurigai *Cmm* diperoleh dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa. (a) Morfologi koloni bakteri yang dicurigai sebagai *Cmm* pada media TSA 24 jam setelah pelapisan. (b) Hasil positif uji Gram dengan larutan KOH pada isolat SLK 11 asal Danau Kembar, Solok, Sumatera Barat, (c) Uji pektinase pada isolat AGM-3 dari Baso, Agam, Sumatera Barat dan (d) Uji oksidasi pada isolat RJL -74 dari Talang Rimbo, Kepahiang, Bengkulu.

Hasil uji patogenisitas selanjutnya menegaskan identitas isolat sebagai *Cmm*. Inokulasi 11 dari 18 isolat ke bibit tomat menghasilkan gejala yang mirip dengan isolat *Cmm* 542 (Tabel 2) dan 11 isolat ini diidentifikasi positif sebagai *Cmm*. Meskipun menunjukkan hasil yang tidak konsisten, uji patogenisitas dari enam isolat lainnya juga positif mengidentifikasi mereka sebagai *Cmm*. Setelah inokulasi bibit tomat dengan enam isolat yang dicurigai, beberapa bibit menunjukkan gejala khas infeksi *Cmm* sementara yang lain tidak. Selain itu, bibit yang diinokulasi juga menunjukkan berbagai tingkat keparahan gejala.

Meskipun isolat KAR19 tidak menginduksi respon HR, bibit tomat yang diinokulasi dengan isolat ini menunjukkan gejala khas infeksi *Cmm* pada setidaknya satu bibit tomat. Hasil tersebut menunjukkan bahwa isolat KAR19 juga *Cmm*. Inokulasi isolat BJN28 pada bibit tomat menghasilkan gejala negatif infeksi *Cmm* (Tabel 2). Namun, karakter fisiologis isolat BJN28 mirip dengan isolat *Cmm* 542 dan memang menginduksi respon HR pada *N. tabacum* dan *M. jalapa* (Tabel 2). Uji patogenisitas lebih lanjut perlu dilakukan untuk memastikan identitas isolat BJN28. Ini tetap harus dilakukan.

Tabel 2. Karakteristik isolat bakteri yang diduga sebagai *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa.

| Nomor Kode Isolasi | Asal pendugaan Isolasi Bakteri | Karakteristik isolat |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|--------------------|--------------------------------|----------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                    |                                | A                    | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | L |
| KAR-15             | Peceran, Berastagi/Karo        | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| KAR-17             | Peceran, Berastagi/Karo        | +                    | + | - | + | * | - | - | + | + | + | - | + |
| KAR-19             | Peceran, Berastagi/Karo        | +                    | + | - | - | * | - | - | + | + | + | - | + |
| KAR-22             | Logumba, Berastagi/Karo        | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| AGM-1              | IV Angkek, Agam                | +                    | + | - | + | * | - | - | + | + | + | - | + |
| AGM-3              | Baso, Agam                     | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| AGM-7              | Banuhampu, Agam                | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| SLK-9              | Danau Kembar, Solok            | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| SLK-11             | Danau Kembar, Solok            | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| SLK-13             | Lembah Gumanti, Solok          | +                    | + | - | + | * | - | - | + | + | + | - | + |
| TND-5              | Tanjung Baru, T. Datar         | +                    | + | - | + | * | - | - | + | + | + | - | + |
| RJL-74             | Talang Rimbo, Kepahiang        | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| CJR-45             | Cipanas, Cianjur               | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| CJR-53             | Pacet, Cianjur                 | +                    | + | - | + | * | - | - | + | + | + | - | + |
| BJN-28             | Wanayasa, Banjarnegara         | +                    | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + |
| MLG-65             | Pujon, Malang                  | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| MLG-66             | Kepung, Kediri                 | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| KDR-68             | Matus, Kediri                  | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |
| <i>Cmm</i> 542     | PRI, Wageningen-Holland        | +                    | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | + |

Kunci: Karakteristik isolat bakteri:: (A) Uji Reaksi Gram, (B) Uji Pektinase, (C) Uji Oksidasi, (D) Uji Respon Hipersensitif (HR), (E) Uji Patogenisitas

pada Bibit Tomat cv. Marta, (F) Uji Pigmen Fluorescent pada medium King's B, (G) Uji Reduksi Nitrat, (H) Uji Aerobik, (I) Toleransi terhadap NaCl 6%, (J) Uji Protease, (K) Uji Sulfida (H<sub>2</sub>S) , (L) Uji Katalase \*Menunjukkan hasil uji Patogenisitas yang tidak konsisten pada bibit tomat yang diuji.

Enam isolat bakteri yang diidentifikasi non-*Cmm* berdasarkan morfologi koloninya juga menunjukkan karakteristik fisiologis yang berbeda dibandingkan dengan isolat *Cmm* 542. Keenam isolat bakteri non-*Cmm* juga tidak menginduksi respon HR pada daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* maupun gejala khas infeksi *Cmm* pada bibit tomat (Data tidak disajikan). Hasil tersebut mengkonfirmasi identitas isolat ini sebagai non-*Cmm*.

## Diskusi

Masuknya suatu penyakit baru ke daerah atau negara tertentu seperti Indonesia merupakan salah satu konsekuensi dari banyak perdagangan dan pertukaran benih antar negara (Chang et al. 1989, 1991). Impor benih gratis ke Indonesia dan pertukaran plasma nutfah untuk program pemuliaan pada tahun 2000 mungkin telah memperkenalkan patogen tertentu yang sebelumnya tidak ada di Indonesia, seperti *Cmm*. Hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa *Cmm*, agen penyebab kanker bakteri pada tomat, telah ada di Indonesia dan tersebar di beberapa sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa.

Hasil positif identifikasi *Cmm* dari sampel tomat yang dicurigai harus dilihat sebagai tanda peringatan bagi semua pemangku kepentingan produksi tomat di Indonesia, terutama yang bertanggung jawab dalam mengatur perdagangan benih, impor dan karantina tanaman.

Di beberapa lokasi, infeksi *Cmm* hanya terjadi pada satu atau dua tanaman, menunjukkan bahwa penyebaran patogen ini masih terbatas. Namun, jika tidak dikelola dengan benar, kondisi tersebut dapat berkembang menjadi infeksi yang menyebar luas di antara perkebunan tomat dan mengakibatkan wabah kanker bakteri yang akan menyebabkan kerugian besar bagi petani tomat. Oleh karena itu, petani tomat di daerah yang disurvei harus waspada terhadap penyakit tomat yang baru diperkenalkan ini untuk mencegah kemungkinan wabah kanker bakteri. Wabah kanker bakteri akibat

infeksi *Cmm* telah dilaporkan di berbagai negara (Hausbeck et al. 2000; Sahin et al. 2002).

Gejala infeksi *Cmm* yang diamati di lapangan antara lain daun layu dan nekrosis pada tepi daun (Basim et al. 2004), buah menunjukkan gejala bercak mata burung (Medina-Mora 2001), serta kanker batang dan batang pecah (Burokiene et al. .2005). Gejala layu daun pada tanaman tomat terjadi karena infeksi *Cmm* berkembang secara unilateral dari posisi bawah ke atas pada batang dan akhirnya merusak seluruh daun. Pada percobaan ini diamati gejala bird's eye spot di Danau Kembar, Solok, Sumatera Barat; sekret batang terbelah dan perubahan warna empulur diamati di Lembah Gumanti, Solok, Sumatera Barat; daun layu dan nekrosis pada tepi daun di Matus, Kediri, Jawa Timur; batang menghitam, daun layu dan nekrosis pada tepi daun diamati di Wanayasa, Banjarnegara, Jawa Tengah;

Inkonsistensi antara survei lapangan dan pengamatan laboratorium tidak dapat mengesampingkan fakta bahwa *Cmm* telah diidentifikasi secara positif di sejumlah lokasi yang disurvei. Gejala infeksi *Cmm* di lapangan seringkali mirip dengan *Xanthomonas* spp. Infeksi (bakteri gram negatif) pada tomat. Dalam kasus seperti itu, survei lapangan berdasarkan gejala mungkin menghasilkan insiden penyakit yang lebih tinggi daripada yang diidentifikasi secara positif sebagai infeksi *Cmm* berdasarkan studi laboratorium. Gejala yang salah diidentifikasi di lapangan yang disebabkan oleh *Xanthomonas* spp. dapat dengan mudah dihilangkan di laboratorium dengan uji reaksi Gram sederhana, karena *Xanthomonas* spp. adalah gram negatif sedangkan *Cmm* adalah gram positif.

Selanjutnya, uji HR menggunakan daun *N. tabacum* dan *M. jalapa* (Gitaitis 1990) dapat digunakan sebagai indikator cepat untuk memverifikasi keberadaan *Cmm*. Dengan menggunakan tes HR ini, identifikasi *Cmm* positif hanya dapat dilakukan setelah 12 jam inokulasi bakteri yang dicurigai ke dalam daun *N. tabacum* dan *M. jalapa*. Di sisi lain, pengujian patogenisitas menunjukkan hasil yang bervariasi dalam penelitian ini. Identifikasi positif *Cmm* yang diharapkan adalah bibit tomat yang diinokulasi menunjukkan gejala layu kotiledon, hipokotil, kematian bibit yang diinokulasi (Gitaitis et al. 1991; Anwar et al. 2005). Namun, dalam beberapa kasus dalam percobaan ini, hasil pemotongan yang jelas tidak diamati dan bibit tomat yang diinokulasi tidak menunjukkan gejala infeksi *Cmm* yang jelas.

Inkonsistensi dalam uji patogenesis mungkin karena (i) kondisi lingkungan mungkin tidak optimal untuk perkembangan penyakit setelah inokulasi *Cmm*, (ii) tomat cv. Marta mungkin bukan indikator terbaik untuk uji patogenesis, dan (iii) isolat yang diuji mungkin menunjukkan tingkat virulensi yang berbeda terhadap tomat cv. Marta. Dalam penelitian ini, uji patogenesis dilakukan di rumah kaca. Suhu di dalam rumah kaca terkadang mencapai 30 °C. Suhu seperti itu mungkin tidak cocok untuk perkembangan penyakit setelah infeksi *Cmm*.

Kultivar tomat yang paling umum digunakan untuk uji patogenesis terhadap *Cmm* adalah tomat sangat rentan cv. Money Maker. Namun, kultivar tomat ini tidak tersedia di Indonesia. Oleh karena itu, tomat kultivar Marta yang banyak ditanam digunakan sebagai indikator dalam penelitian ini. Tanggapan dari tomat cv. Marta terhadap infeksi *Cmm* belum dilaporkan di tempat lain. Sejumlah isolat *Cmm* yang dicurigai diuji dan hasil uji patogenesis tidak konsisten. Namun hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kultivar tomat Ratna rentan terhadap infeksi dari sebagian besar isolat *Cmm* yang teridentifikasi. Perbedaan virulensi antara isolat *Cmm* dapat mengakibatkan inkonsistensi dalam pengujian patogenesis (Berry et al. 1989). Tampaknya isolat *Cmm* yang teridentifikasi dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa terdiri dari banyak isolat yang berbeda derajat virulensinya terhadap tomat cv. Marta. Untuk menguji hipotesis ini, bagaimanapun, analisis lebih lanjut dari isolat *Cmm* yang diidentifikasi menggunakan penanda molekuler diperlukan. Identifikasi lebih lanjut dari isolat *Cmm* yang diisolasi akan dilakukan dan hasilnya akan disajikan pada laporan selanjutnya.



## **BAB IV**

Deteksi dan Karakterisasi Molekuler  
*Clavibacter michiganensis* subsp.  
*michiganensis* Berdasarkan Sekuen Gen  
*Serine Protease* dan 16S rRNA

---

## Pengantar

Infeksi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) pada tomat menyebabkan penyakit serius dan kehilangan hasil. Tujuan penelitian ini adalah (i) mengamplifikasi gen *serine protease* dan gen 16S rRNA untuk *Cmm* menggunakan primer spesifik; (ii) menentukan sekuen nukleotida dari gen *serine protease* dan sekuen nukleotida gen 16S rRNA hasil amplifikasi PCR; (iii) mengidentifikasi bakteri-bakteri yang berasosiasi dengan penyakit kanker pada tomat; dan (iv) menganalisis diversitas sekuen nukleotida dan asam amino prediksi dari gen *serine protease* dan diversitas sekuen nukleotida dari gen 16S rRNA di antara isolat-isolat yang diidentifikasi. Isolasi DNA total dari isolat-isolat yang diduga *Cmm* dari sampel tanaman tomat yang menunjukkan gejala umum terinfeksi *Cmm* dari lokasi yang berbeda di Sumatera dan Jawa. Amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) menggunakan asam nukleat total dan primer spesifik *Cmm* untuk gen *serine protease*, primer universal spesifik *prokaryot Cmm* untuk gen 16S rRNA, sekuensing secara langsung dari hasil PCR, dan analisis sekuen asam nukleat dan asam amino menggunakan *BLAST* telah dilakukan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah (i) adanya pita DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR membuktikan bahwa sampel-sampel tanaman tomat yang sakit terinfeksi oleh *Cmm*, (ii) hasil analisis *Blast* menggunakan sekuen nukleotida dan asam amino menunjukkan bahwa fragmen DNA hasil amplifikasi PCR adalah gen *serine protease* dan 16S rRNA dari *Cmm*, (iii) identitas sekuen nukleotida dari gen 16S rRNA di antara isolat-isolat *Cmm* mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut punya kemiripan homologi 100% dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*), ini memperlihatkan bahwa Jepang dan Indonesia diduga dapat isolat dari negara ketiga yang sama, dan (iv) hasil filogenetik berdasarkan sekuen gen *serine protease* dan 16S rRNA dari enam isolat *Cmm* (intra spesies) merupakan satu kelompok, isolat tersebut adalah strain yang sama dari satu sumber dan keberadaan patogen ini baru di Indonesia.

Analisis genotipik secara molekuler untuk karakterisasi bakteri dapat dilakukan untuk mengkonfirmasi analisis fenotipik yang sudah dilakukan. Menurut Louws & Cuppels (2001) metode molekuler yang berbasiskan DNA memiliki keuntungan karena keakuratan

identifikasi tidak tergantung pada kondisi lingkungan, umur, atau sifat fisiologi dari patogen, namun lebih tergantung pada kualitas DNA yang diekstraksi. Alvarez (2004) menyatakan bahwa perkembangan yang cepat dari teknik genomik untuk karakterisasi bakteri benar-benar sangat menyederhanakan dan memajukan deteksi dan identifikasi patogen. Sekuen primer dapat dipergunakan bersama dengan *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengidentifikasi berbagai bakteri patogen tanaman yang umum.

Analisis PCR dengan primer spesifik CM3/CM4 menghasilkan potongan DNA ukuran 645 bp, metode ini efektif mendeteksi bakteri *Cmm* (Dreier *et al.* 1995; Lee *et al.* 1997; Louws *et al.* 1998; Pastrik & Rainey 1999; Burokienė *et al.* 2005; Hadas *et al.* 2005). Namun demikian analisis sekuen DNA ukuran 645 bp menggunakan pangkalan data internet dengan program *Blast* dapat mengetahui spesies bakteri tetapi belum menjawab filogeni dari taksa yang berdekatan terhadap identifikasi spesies. Sekuensing gen 16S rRNA merupakan salah satu metode yang digunakan untuk identifikasi bakteri yang belum diketahui spesiesnya (*unknown bacteria*). Lafontaine & Tollervey (2007) menyebutkan bahwa ribosomal RNA merupakan gen yang sangat konservatif (hanya sedikit variasinya) dalam sel. Menurut Bavykin *et al.* (2004) analisis dari sekuen gen 16S rRNA adalah metode yang sederhana dan umum digunakan untuk identifikasi mikroorganisme. Meskipun secara umum sekuen gen 16S rRNA sangat konservatif, gen 16S rRNA sebenarnya menunjukkan variasi yang besar dalam beberapa bagian. Perbedaan ini dapat digunakan sebagai dasar untuk merancang probe asam nukleat dari bermacam-macam spesifisitas, berkisar dari probe yang targetnya semua organisme hidup sampai spesifik grup dan spesifik spesies. Keuntungan lain, molekul ini secara alami diamplifikasi dalam sel. Secara umum, rRNA mewakili sekitar 80% dari asam nukleat total dalam sel mikroba, dengan demikian ada ribuan kopi per sel.

Sekuensing gen 16S rRNA dapat dilakukan dengan mengamplifikasi gen 16S rRNA dengan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR) dan primer universal untuk *prokaryot*. Hasil amplifikasi PCR dapat disekuensing menggunakan *kit* sekuensing yang tersedia secara komersial atau menggunakan sistem sekuensing otomatis (Louws & Cuppels 2001). White *et al.* (1990) menyatakan bahwa PCR dan sekuensing langsung memiliki beberapa keuntungan antara lain metode ini relatif menggunakan persiapan kasar dari DNA

total seperti *minipreps*, hanya membutuhkan sejumlah kecil DNA yakni antara 0,1 sampai 10 ng per amplifikasi, kedua utas benang gen DNA dapat disekuensi sehingga dapat mengurangi kesalahan, dan metode ini kompatibel dengan alat sekuensing DNA otomatis yang menggunakan primer sekuensing berlabel *fluoresens* atau *dinukleotida trifosfat*.

Tulisan ini melaporkan analisis sekuensi gen *serine protease* dan 16S rRNA isolat positif *Cmm* di berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa hasil penelitian sebelumnya. Sangat penting untuk mengkarakterisasi molekuler *Cmm* sebagai dasar ditemukannya patogen tersebut di Indonesia dan pengembangan strategi pengendalian penyakit.

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler PAU IPB, Laboratorium Biologi Molekuler dan Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai dengan Desember 2007.

## **Pengumpulan Isolat Bakteri**

Isolasi dan identifikasi *Cmm* dari tanaman tomat yang bergejala serangan penyakit kanker bakteri telah dikoleksi dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa dari hasil penelitian sebelumnya. Isolasi yang diduga *Cmm* dilakukan isolasi DNA untuk dideteksi dan dikarakterisasi terhadap runutan sekuensi nukleotidanya.

## **Ekstraksi DNA dan Analisis *Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Isolasi DNA total dari delapan belas isolat yang diduga *Cmm* hasil penelitian sebelumnya (Tabel. 2) dilakukan menurut metode Lee *et al.* (2001) yang dimodifikasi sebagai berikut. Koloni bakteri ditumbuhkan pada media YDC dan diinkubasi pada suhu 27 °C selama 48-72 jam. Koloni yang tumbuh disuspensikan dalam akuades steril. Masing-masing isolat sebanyak 5 µl suspensi dimasukkan ke dalam tabung mikro dan disentrifugasi pada 16000 g selama 10 menit. Pelet disuspensikan dalam 25 µl NaOH (0,25N) dan direbus selama 2 menit. Suspensi ditambah 25 µl HCl (0,25N), dan 12,5 µl Tris-HCl (pH 8) yang mengandung 0,1% (v/v) Tween 20, dan disentrifugasi 6000 g selama 2 menit. Kemudian pelet disuspensikan

dalam 62,5 µl TE buffer (pH 7,5). Ekstrak DNA disimpan pada suhu -20 °C untuk penggunaan PCR.

Amplifikasi PCR terhadap gen *serine protease* dari isolasi 18 sampel DNA yang diduga *Cmm* menggunakan 1 µl DNA *template* dan sepasang primer spesifik CM<sub>3</sub>-CCTCGTGAGTGCCGGGAACGTATCC3' dan CM<sub>4</sub>-5'CC ACGGTGGTT GATGCTCGCGAGAT3' (Santos *et al.* 1997). Reaksi PCR sejumlah 25 µl terdiri dari 1,5 unit *Tag DNA Polimerase*, 10 mM Tris HCl (pH 9,0 pada suhu kamar), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM tiap-tiap dNTP, dan bahan penstabil termasuk BSA. Protokol PCR yang digunakan adalah pra denaturasi 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 1 menit, penempelan (*annealing*) 62 °C selama 1 menit, sintesis 72 °C selama 30 detik, dan pasca PCR 72 °C selama 5 menit dengan jumlah siklus sebanyak 40 kali (Hadas *et al.* 2005). Hasil PCR dianalisis pada gel agarose (1%) dan *staining* dengan *ethidium bromide* dan visualisasi di bawah sinar UV menggunakan *Chemidoc gel system*.

Amplifikasi PCR gen 16S rRNA dilakukan terhadap sampel DNA yang positif *Cmm* berdasarkan PCR dengan primer CM<sub>3</sub>/CM<sub>4</sub> sebelumnya. Amplifikasi PCR menggunakan 1 µl DNA *template* dan *universal primer* spesifik *prokaryot* (Marchesi *et al.* 1998) yaitu *Forward primer* 63f (5'-CAGGCCTAAC ACATGCAAGTC-3') dan *Reverse primer* 1387r (5'-GGGCGWGTGTACAAG GC-3'). Reaksi PCR sejumlah 25 µl terdiri dari 1,5 unit *Tag DNA Polimerase*, 10 mM Tris HCl (pH 9,0 pada suhu kamar), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM tiap-tiap dNTP, dan bahan penstabil termasuk BSA. Protokol PCR yang digunakan adalah pra denaturasi 94 °C selama 2 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, penempelan (*annealing*) 55 °C selama 30 detik, sintesis 72 °C selama 2 menit, dan pasca PCR 72 °C selama 5 menit dengan jumlah siklus sebanyak 30 kali. Hasil PCR dianalisis pada gel agarose (1%) dan *staining* dengan *ethidium bromide* dan visualisasi di bawah sinar UV menggunakan *Chemidoc gel system* (Biorad).

### **Penentuan Runutan (Sequencing) DNA**

Fragmen DNA hasil PCR dengan primer spesifik CM<sub>3</sub>/CM<sub>4</sub> ditentukan runutan nukleotidanya dengan memanfaatkan layanan *Automatic DNA Sequencing* (*First BASE Laboratories* Malaysia). Data runutan nukleotida yang didapat ditranslasi ke asam amino

selanjutnya dibandingkan dengan koleksi runutan asam amino yang ada di pangkalan data *GeneBank*, NCBI untuk identifikasi. Fragmen DNA *Cmm* hasil PCR dengan primer universal spesifik *prokaryot* juga ditentukan runutan nukleotidanya dengan memanfaatkan layanan *Automatic DNA Sequencing (First BASE Laboratories Malaysia)*. Data runutan nukleotida gen 16S rRNA yang didapat selanjutnya dibandingkan dengan koleksi runutan nukleotida gen 16S rRNA yang ada di pangkalan data *GeneBank*, NCBI untuk identifikasi sekuen yang dianalisis.

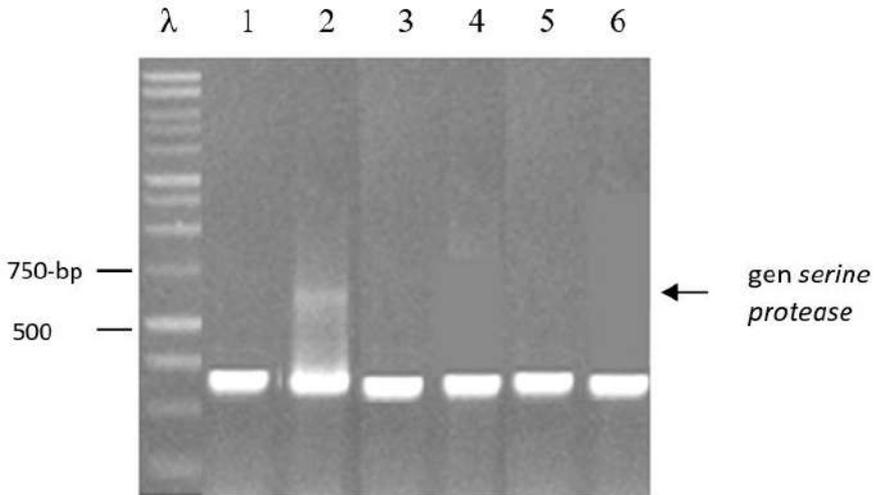
### **Analisis Runutan Gen *Serine Protease* dan 16S rRNA *Cmm***

Data runutan nukleotida gen *serine protease Cmm* Indonesia ditranslasi ke asam amino, homologi antar isolat dan runutan asam amino gen *serine protease Cmm* yang ada di pangkalan data *GeneBank* NCBI menggunakan program *Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) (Altschul *et al.* 1990). Penentuan variasi runutan asam amino gen *serine protease Cmm* Indonesia dengan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank*, NCBI dilakukan analisis pensejajaran menggunakan program *Multiple pensejajaran Sequence Genebee Clustal-W version 1.83* (<http://www.genebee.msu.Su/clustal/advanced.html>). Jarak matrik runutan asam amino pensejajaran berganda digunakan untuk menentukan jarak genetik antar isolat yang dideterminasi. Hasil pensejajaran juga digunakan untuk analisis filogenetik. Data runutan asam amino gen *serine protease Cmm* Indonesia yang dideterminasi dan runutan asam amino gen *serine protease Cmm* di pangkalan data *GeneBank*, NCBI digunakan sebagai kelompok *Cmm* pembanding dalam analisis filogenetik. Hubungan filogenetik ditentukan berdasarkan *Topological Algorithm Rectangular 2* berdasarkan analisis *Bootstrap* dengan menggunakan *ClustalW 1.83* <http://www.genebee.msu.su/clustal/advanced.html>).

Analisis runutan nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* Indonesia dan runutan nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* di pangkalan data *GeneBank* NCBI dilakukan menurut pola yang sama dengan analisis runutan gen *serine protease*. Analisis gen 16S rRNA menggunakan runutan nukleotida. Runutan nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* Indonesia, runutan nukleotida gen 16S rRNA spesies *Clavibacter* sp, genomic 16S rRNA *Cmm*, dan spesies lain di pangkalan data *GeneBank*, NCBI digunakan sebagai pembanding dalam analisis filogenetik.

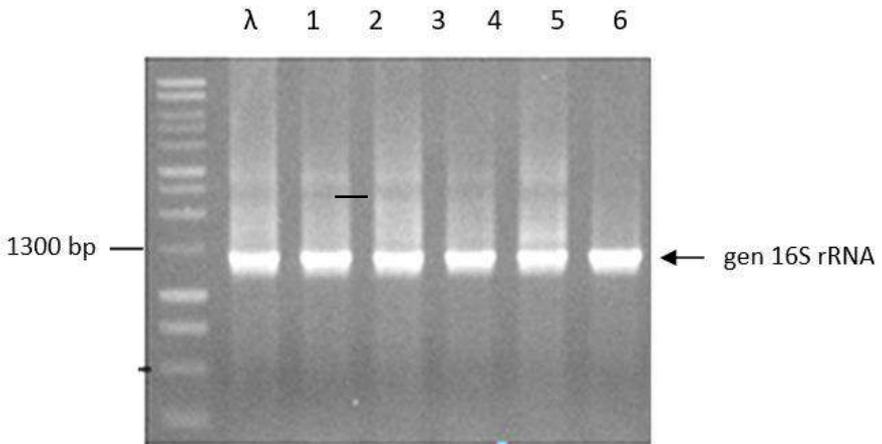
## Amplifikasi PCR Gen *Serine Protease* dan 16S rRNA

Deteksi *Cmm* dengan PCR menggunakan primer spesifik CM3/CM4 dihasilkan fragmen DNA tunggal berukuran 645 bp pada 6 *Cmm* dari berbagai sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa (Gambar 4). Enam *Cmm* tersebut yaitu; (1) AGM-7, Agam-Sumatera Barat; (2) SLK-11, Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat; (3) RJL-74, Rejang Lebong- Bengkulu; (4) CJR-45, Cianjur-Jawa Barat; (5) MLG-65, Malang-Jawa Timur; dan (6) KDR-68, Kediri-Jawa Timur. Fragmen DNA tunggal ini akan ditentukan runutan nukleotidanya untuk karakterisasi terhadap gen *serine protease*. Oligonukleotida primer CM3/CM4 yang digunakan adalah spesifik mengamplifikasi gen *serine protease Cmm*, hasil penelitian ini mempertegas bukti keberadaan *Cmm* di sentra tanaman tomat di Indonesia.



Gambar 3. Elektroforesis gel agarose fragmen DNA amplifikasi *Polymerase Chain Reaction* (PCR) gen *serine protease*. Fragmen DNA diamplifikasi PCR menggunakan primer spesifik CM3/CM4 dari sejumlah asam nukleat bakteri yang diisolasi dari tanaman tomat terserang penyakit kanker bakteri; (1) AGM-7, Agam-Sumatera Barat; (2) SLK-11, Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat; (3) RJL-74, Rejang Lebong- Bengkulu; (4) CJR-45, Cianjur-Jawa Barat; (5) MLG-65, Malang-Jawa Timur; dan (6) KDR-68, Kediri-Jawa Timur. λ (Marker) : marka DNA 1 kb plus (*Invitrogen*).

Amplifikasi PCR dengan primer universal spesifik *prokaryot* dihasilkan fragmen DNA tunggal berukuran 1300 bp terhadap 6 *Cmm* yang dideteksi positif hasil uji sebelumnya (Gambar 5). *Oligonukleotida* primer universal yang digunakan untuk PCR adalah spesifik mengamplifikasi gen 16S rRNA.



Gambar 4 Elektroforesis gel agarose fragmen DNA PCR gen 16S rRNA. Fragmen DNA diamplifikasi PCR menggunakan primer universal spesifik *prokaryot* dari sejumlah asam nukleat *Cmm*; (1) AGM-7, Agam-Sumatera Barat; (2) SLK-11, Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat; (3) RJL-74, Rejang Lebong- Bengkulu; (4) CJR-45, Cianjur-Jawa Barat; (5) MLG-65, Malang-Jawa Timur; dan (6) KDR-68, Kediri-Jawa Timur. λ (Marker) : marka DNA 1 kb plus (*Invitrogen*).

### Penentuan Runutan (*Sequencing*) DNA

Sekuensing hasil PCR dengan primer CM3/CM4 dapat mengidentifikasi sekuen gen *serine protease Cmm* ukuran 615 – 623 bp dari jumlah nukleotida yang ada pada gen tersebut (Tabel 3). Determinasi sekuen asam amino gen *serine protease* *disubmit* ke pangkalan data *GeneBank* DNA. Homologi inter spesies *Cmm* ini ditunjukkan ketika sekuen nukleotida disejajarkan untuk memprediksi sekuen asam amino parsial gen *serine protease* dari 6 *Cmm* yang diidentifikasi dan sekuen asam amino yang ada di pangkalan data *GeneBank* DNA (Gambar 5).

AGM-7 -----  
 SLK-11 -----  
 RJL-74 -----  
 CJR-45 -----  
 MLG-65 -----  
 KDR-68 -----  
 YP\_001220667 -----MPLTLLACS VGAASASAAPTSPVPASVTSFGSDPNAV  
 YP\_001222690 MPHRTAPPAR-----RRLAAVSAICLGAALLGAASSATAAER--PAAPASVT  
 YP\_001222689 MPSPHARTAR-----RSLAAVAALGLTASLLGVASASAASVHERSARAGAS  
 YP\_001222684 MTHPHRSAAR-----LIARALLHRPLLGAAGLAGLLALATVS--PAAAATT  
 YP\_001220789 ---MATRTGS-----TLIGAATCATLALITLMGAG-----AATAAT  
 YP\_001220781 ---MATRTGS-----TLIGAATCATLALITLMGAG-----AATAAT  
 YP\_001220814 MTALWKNRF-----SVLALLLVVMVQGQSSVARPAQAQPTGTAFS----  
 YP\_001220780 MKKIYPKRR-----HAASMAALSVGIGLVLCGPHDIGGESARAASSASG  
 YP\_001220783 MRKLPISRVPRASSSQGRRSVVRVLTMIAAATASVAAGGVIQGGALSAPALAAATPDVS

AGM-7 -----VDAREIN-----  
 SLK-11 -----VDAREIN-----  
 RJL-74 -----VDAREIN-----  
 CJR-45 -----VDAREIN-----  
 MLG-65 -----VVDAREIN-----  
 KDR-68 -----VDAREIN-----

YP\_001220667 SVITQSQHERDETQSYWTPERLREADTRAGVRQDADGVSAQLNSTVVDAREIN-----  
 YP\_001222690 LDASSATVGIHVSSEDAEEAVDFWTPERRAAIIDADAPAP-----ADGTSDSGAVATDA  
 YP\_001222689 IPVSAFVVGFSVSSAEAEAAVARWTERRAAIIDADGAADGATDGAAGSAPADDALASA  
 YP\_001222684 DDGTPAPTIVTRSAADAADAVAFWTPERLAGAASPVLTTRATGTPGTVDVDPVSADELTTSA  
 YP\_001220789 TAEFPASTLRHTISSSTETAAAGSTWSRARMHAAVNTNSFVDPDPADGNPPADDQDSALTTATS  
 YP\_001220781 TAEPTGTLRHTISSSTETAAAGSTWSRARMHAAVNTNSFVDPDPADGNPPADDQDSALTTATS  
 YP\_001220814 ----DDTGQSFSDAEASDAVRSWTPEALAAAADLDRPSDAVNA PVTGATEQALITQAG  
 YP\_001220780 PASGASDTGMSVSDADAAESENWYTPDKIAAAVPAADG---VTVTPQKQSPSLGASAVTS  
 YP\_001220783 AVSAAASLGSRAFSDEEMTSTSDYWTVDRILQRAIPDDG---SASVVGASDAGSGVVHVSVG

AGM-7 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 SLK-11 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 RJL-74 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 CJR-45 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 MLG-65 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 KDR-68 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 YP\_001220667 -----SLGVLFGRKDGPRWRCSANAVDARNLSVVSTAG  
 YP\_001222690 VAD-----SAHATQIEPIP-----HMGRIFYTQAGKGYACSANVVE SANRSTIATAG  
 YP\_001222689 AST-----VPVAEQVAPVP-----HMGRLFVHRDGEDFSCSANVVE SANRSTIATAG  
 YP\_001222684 ARDQRRARPVIVPAQEVDVPS-----HIGVVAYVVDGKEMSCTANAVESANGLTVATAG  
 YP\_001220789 TSDASPG-AASPHVSETTPVPGFTANDHLGVVFRSGGIDQRCTGNVVVSDSGNLVATAG  
 YP\_001220781 TSDASPG-AASPHVSETTPVPGFTANDHLGVVFRSGGIDQRCTGNVVVSDSGNLVATAG  
 YP\_001220814 TFEFVYW-----IGRLYFDVDRQYSCSGSSIRSDSOLVVATAA  
 YP\_001220780 VFEFVYW-----IGRLYTAGGIDYACTASSIKSDSKLVIATAG  
 YP\_001220783 SITATAW-----VGKIAFRRGGDLRCLCSASAVHSDSGYLVATAG

```

AGM-7          HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
SLK-11        HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
R.JL-74       HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
CJR-45        HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
MLG-65        HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
KDR-68        HCIAERGHTIDHLIFAAGYRGNSTPLFGTFDVLWLSVAPNGWTLQHGDFDIAFVKVDTR
YP_001220667 HCLTQKQVFS DHIVFYPAYDH--GSPQYGAWPVITGYVPSGWIYQ--RNDDQDQDSSFMVA
YP_001222690 HCLTVRQEFSTDMVFYPRYEE--GSPSLGAFVVGNGVITIGWYE--RNDDQDQEDTSFLAV
YP_001222689 HCAFPKGDPS--KMFVPGYVK--GQP-YTVWVPTSVTLPGAWRE--TLDP--ARDTAFITV
YP_001222684 RCVSAIKDAFVTDLVFVQYD--GTAPKGIWPATAVTVQSQWVTGRQVDFDTAFFQVKAP
YP_001220789 RCVSAIKDAFVTDLVFVQYD--GTAPKGIWPATAVTVQSQWVTGRQVDFDTAFFQVKAP
YP_001220781 HCLYDHGEWSTRVVFI PAWDG--ANKPLGVWGAFFYAVSRDWRTEDEPGHDAAFIKMAPK
YP_001220814 HCLYHKGEFSTNLRFI PAWDG--ANKPLLTWGANDYQVPRAWRYQEDDQHDAGFVQLKPK
YP_001220780 HCLLNDQDTATGVT FVPGWDG--KNMPYGTWIAKFYSVTP EWRVRADDSHDVGFIVKQPI
YP_001220783

AGM-7          RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
SLK-11        RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
R.JL-74       RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
CJR-45        RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
MLG-65        RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
KDR-68        RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
YP_001220667 RETRTDGSAHPGHPVLQSGPTMSGVAFRAATPTGYAAAAYGYPGAIQNGNVPVRCSDIEIQT
YP_001222690 --KRDDSGDDVQSAVGASPVLFDPGAEHASAYGYPAAGR-----FDGESLQWSCSG--
YP_001222689 --AHDDEGDDVQSAVGASPVVRF--APAAQEVSMYGYPAAGR-----FDGGELERCAGLG--
YP_001222684 --GSPD--GRTL TEAVGASPVVEFH--QPRTHYTTVIGYPAVGR-----FTGDAPFLCSGFARA
YP_001220789 --VGAAGTTLSSNVGASGVRFAGQEDDDDYRSTGYALDGG-----HDGTPKISVSESSVEP
YP_001220781 --VGAAGTTLSSNVGASGVRFAGQEDDDDYRSTGYALDGG-----HDGTPKISVSESSVEP
YP_001220814 TAWDGSKEYLASKAGAPAPTFSAAMPGLHFEAFGYRPLGG-----YVPAPLYTCAGEGRH
YP_001220780 RSWLGAKQYLADRAGATATNFGLAKTGLHYEAFGYEQVSG-----FTSHPLLTCSGNG--
YP_001220783 GSKS-----LADTVSALRVNFSLAKPQLHYFSLAYGNIGGG-----FQAKPLSTCVGPA--

AGM-7          LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
SLK-11        LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
R.JL-74       LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
CJR-45        LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
MLG-65        LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
KDR-68        LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYV-----
YP_001220667 LLPTVGPYLRIMDGCENFSGGASGGFPVQV--VSGHRRVTGTVEGYVPGTHEVRVITYWET
YP_001222690 ---EAVSAEQIALPCD--MNA GTSGGPILAGDFTDS---PQFGNVAERYEDDSHVLGPVWKD
YP_001222689 ---HVVYTEMQIDLGC--MTGGVSGGPILEGDGPDC--AQFGNVAERALDGMHNI GPVWQD
YP_001222684 T--HLEGQTGQELDCD--MKEGASGAPFLDGS GPGA--RQYSVLSGGLDEKPLVWVAPVWDR
YP_001220789 NPWMNKDYAIEGIE TD--LRAGISGSPWVNTDDSDGIQRGMTTFAYHQFTHAAFGPQWTA
YP_001220781 NPWMNKDYAIEGIE TD--LRAGISGSPWVNTDDSDGIQRGMTTFAYHQFTHAAFGPQWTA
YP_001220814 FRGFASIEPEYI ANCD--PPGGASGGFPVYHASTHGPNGTQYGVITETRRARDGSPLLIFVP
YP_001220780 YRRFSQFSLLSINDCA--MVGGS GGPVYHESGKGVNQTQVGVVSVIPQGEHS--INTFAP
YP_001220783 --YRLHDEQSLAMIGCK--AVGGMSGGFPVYHASTEEPRTQVGVIGRNVETAYGD--ATAFTP
* * * *

```

|              |                   |
|--------------|-------------------|
| AGM-7        | -----             |
| SLK-11       | -----             |
| RJL-74       | -----             |
| CJR-45       | -----             |
| MLG-65       | -----             |
| KDR-68       | -----             |
| YP_001220667 | AARNSWEYAQTH----- |
| YP_001222690 | VEHSAYDLTAAVAN--- |
| YP_001222689 | AAQSAYELTAAISV--- |
| YP_001222684 | VIEAAYRVAQSRVG--- |
| YP_001220789 | TLHATYRAAAA-----  |
| YP_001220781 | TLHATYRAAAA-----  |
| YP_001220814 | WGQVEYSLYRSVDLWPK |
| YP_001220780 | WGDAEYQVFRITVDWGR |
| YP_001220783 | FGKAELSTYKTVDSFTK |

Gambar 5. Pensejajaran parsial sekuen asam amino prediksi dari sekuen nukleotida gen *serine protease 6 Cmm* yang diidentifikasi dan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank* DNA. Akses (YP\_001220667, YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_00122078, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781) adalah *putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382 di pangkalan data *GeneBank* DNA pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

Sekuensing hasil PCR dengan primer universal spesifik *prokaryot* dapat mengidentifikasi sekuen gen 16S rRNA *Cmm* ukuran 1221-1238 bp dari jumlah nukleotida yang ada pada gen tersebut. Determinasi sekuen nukleotida gen 16S rRNA tersebut *disubmit* ke pangkalan data *GeneBank*. Homologi inter spesies *Cmm* ditunjukkan ketika sekuen nukleotida disejajarkan untuk memprediksi sekuen nukleotida parsial gen 16S rRNA enam *Cmm* yang dikarakterisasi dan sekuen nukleotida di pangkalan data *GeneBank* DNA (Gambar 7).

Tabel 3. Identitas isolat, observasi gejala pada sampel tomat yang dikoleksi, lokasi pengambilan sampel, ukuran sekuen asam nukleat, dan prediksi sekuen asam amino berdasarkan amplifikasi *Polymerase chain reaction* gen *serine protease*.

| Identitas isolat | Observasi gejala pada sampel tomat                   | Lokasi sampel                   | Ukuran sekuen   |                                 |
|------------------|--|---------------------------------|-----------------|---------------------------------|
|                  |  |                                 | Nukleotida (bp) | Asam amino ( <i>residues</i> )* |
| AGM-7            | Nekrotik pada batang ( <i>tissue discoloration</i> ) | Agam-Sumatera Barat             | 616             | 205                             |
| SLK-11           | Gejala <i>Bird's eye spot</i> pada buah              | D. Kembar, Solok-Sumatera Barat | 618             | 206                             |
| RJL-74           | Kerdil, batang bewarna hitam                         | Rejang Lebong Bengkulu          | 619             | 207                             |
| CJR-45           | Daun layu dan nekrotik                               | Cianjur-Jawa Barat              | 615             | 205                             |
| MLG-65           | Nekrotik pada batang, daun layu dan nekrotik         | Malang-Jawa Timur               | 620             | 207                             |
| KDR-68           | Daun layu dan nekrotik                               | Kediri-Jawa Timur               | 623             | 208                             |

Catatan : \* Prediksi asam amino berdasarkan kepada penentuan sekuen nukleotida.

```

AM410696 -----GACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
EU685335 -----CATGC
CMU09762 -----AACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
AB299158 -----GATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
Genomic 16S CATTATGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
AGM-7 -----AGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
SLK-11 -----GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
R.JL-74 -----GAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
CJR-45 -----TGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
MLG-65 -----TTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
KDR-68 -----TTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
D84128 -----AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTTAACACATGC
FJ418769 -----CGATTTT-----CCATCGGTATGCGTGG-ACTTGC
* **
AM410696 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
EU685335 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
CMU09762 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
AB299158 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
Genomic 16S -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
AGM-7 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
SLK-11 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
R.JL-74 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
CJR-45 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
MLG-65 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
KDR-68 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
D84128 -AAGTCG-AACGGTGATGTCAG-AGCTTGCTCTGGCGGAT--CAGTGGCGAACGGGTGAG
FJ418769 CGATTTCGTAACAG-GGTACCCGTAAGATCCCGAGCCCGATATCTTTGGCGAACGGGTGAG
* * * * *
AM410696 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
EU685335 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
CMU09762 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
AB299158 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
Genomic 16S TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
AGM-7 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
SLK-11 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
R.JL-74 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
CJR-45 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
MLG-65 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
KDR-68 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
D84128 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
FJ418769 TAACACGTGAGTAACCTGCCCCCGACTCTGGGATAAAGTGTAGAAATGGTAGCTAATACC
*****

```

AM410696 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACC  
 EU685335 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 CMU09762 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 AB299158 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 Genomic 16S  
 AGM-7 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 SLK-11 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 RJL-74 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 CJR-45 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 MLG-65 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 KDR-68 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 D84128 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 FJ418769 GGATATGACGATTGGCCGCATGGTCTGGTCTGGTGGAAAGAATTTTC-GGTTGGGGATGGACT  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 AM410696 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 EU685335 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 CMU09762 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 AB299158 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 Genomic 16S  
 AGM-7 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 SLK-11 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 RJL-74 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 CJR-45 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 MLG-65 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 KDR-68 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 D84128 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 FJ418769 CGCGCCCTATCAGGTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGCCTACGACGGGTAGCCGGC  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 AM410696 CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 EU685335 CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 CMU09762 CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 AB299158 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 Genomic 16S  
 AGM-7 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 SLK-11 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 RJL-74 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 CJR-45 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 MLG-65 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 KDR-68 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 D84128 CTGAGAGG-TGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC-TACGGGAGGCAG  
 FJ418769 CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 AM410696 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 EU685335 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 CMU09762 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 AB299158 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 Genomic 16S  
 AGM-7 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 SLK-11 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 RJL-74 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 CJR-45 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 MLG-65 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 KDR-68 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 D84128 CAGTGGGGAATATTGCACAATGG-CGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 FJ418769 CAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAGGGATGA  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

AM410696 CGGCCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 EU685335 CGGCCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 CMU09762 CGGCCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 AB299158 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 Genomic 16S CGGCCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 AGM-7 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 SLK-11 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 RJL-74 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 CJR-45 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 MLG-65 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 KDR-68 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 D84128 CGGC-TTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 FJ418769 CGGCCCTTCGGGTTGTA AACCTCTTTTAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAG  
 \*\*\*\* \*

AM410696 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 EU685335 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 CMU09762 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 AB299158 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 Genomic 16S AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 AGM-7 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 SLK-11 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 RJL-74 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 CJR-45 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 MLG-65 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 KDR-68 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 D84128 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 FJ418769 AAAAAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTGT  
 \*\*\*\* \*

AM410696 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 EU685335 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 CMU09762 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 AB299158 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 Genomic 16S CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 AGM-7 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 SLK-11 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 RJL-74 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 CJR-45 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 MLG-65 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 KDR-68 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 D84128 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 FJ418769 CCGGAATTATTTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGGCGTTTGTCCGCTCTGCTGTGAAATCCCG  
 \*\*\*\* \*

AM410696 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 EU685335 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 CMU09762 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 AB299158 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 Genomic 16S AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 AGM-7 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 SLK-11 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 RJL-74 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 CJR-45 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 MLG-65 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 KDR-68 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 D84128 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 FJ418769 AGGCTCAACCTCGGGTCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCCGTAGGGGAGATTGG  
 \*\*\*\* \*

AM410696 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 EU685335 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 CMU09762 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 AB299158 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 Genomic 16S AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 AGM-7 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 SLK-11 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 RJL-74 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 CJR-45 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 MLG-65 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 KDR-68 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 D84128 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 FJ418769 AATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCCGAGATATCAGGAGGAACACCCGATGGCGAAGGCAG  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 EU685335 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 CMU09762 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 AB299158 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 Genomic 16S ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 AGM-7 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 SLK-11 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 RJL-74 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 CJR-45 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 MLG-65 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 KDR-68 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 D84128 ATCTCTGG-CCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 FJ418769 ATCTCTGGGCCGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATA  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGTCTCC  
 EU685335 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGTCTCC  
 CMU09762 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGTCTCC  
 AB299158 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACTATTCCACGGTCTCC  
 Genomic 16S CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGTCTCC  
 AGM-7 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 SLK-11 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 RJL-74 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 CJR-45 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 MLG-65 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 KDR-68 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 D84128 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGG-ACCATTCCACGGTCTCC  
 FJ418769 CCCTGGTAGTCCATGCCGTAACCGTTGGGAACCTAGATGTGGGGACCATTCCACGGTCTCC  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*  
 AM410696 GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 EU685335 GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 CMU09762 GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 AB299158 GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 Genomic 16S GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 AGM-7 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 SLK-11 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 RJL-74 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 CJR-45 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 MLG-65 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 KDR-68 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 D84128 GTGTCGCA-CTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 FJ418769 GTGTCGCAGCTAACGCATTAAGTTCCTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC  
 \*\*\*\*\* \* \* \* \* \*

AM410696 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 EU685335 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 CMU09762 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 AB299158 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 Genomic 16S AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 AGM-7 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 SLK-11 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 RJL-74 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 CJR-45 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 MLG-65 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 KDR-68 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 D84128 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 FJ418769 AAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGGGAGCATGCGGATTAATTTCGATGCAACGC  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 EU685335 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 CMU09762 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 AB299158 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 Genomic 16S GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 AGM-7 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 SLK-11 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 RJL-74 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 CJR-45 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 MLG-65 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 KDR-68 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 D84128 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 FJ418769 GAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATATACCGGAAACATGCAGAAATGTGTGCCCGCAA-  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 EU685335 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 CMU09762 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 AB299158 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 Genomic 16S GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 AGM-7 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 SLK-11 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 RJL-74 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 CJR-45 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 MLG-65 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 KDR-68 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 D84128 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 FJ418769 GGTCCGTATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 EU685335 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 CMU09762 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 AB299158 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 Genomic 16S TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 AGM-7 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 SLK-11 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 RJL-74 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 CJR-45 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 MLG-65 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 KDR-68 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 D84128 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 FJ418769 TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGTTCTATGTTGCCAGCAGTAATGGTGGGAACCTCATAG  
 \*\*\*\*\*

AM410696 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 EU685335 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 CMU09762 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 AB299158 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 Genomic 16S GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 AGM-7 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 SLK-11 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 RJL-74 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 CJR-45 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 MLG-65 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 KDR-68 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 D84128 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 FJ418769 GAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTA  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 EU685335 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 CMU09762 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 AB299158 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 Genomic 16S TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 AGM-7 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCG-----  
 SLK-11 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCG-----  
 RJL-74 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 CJR-45 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAA----  
 MLG-65 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGA-----  
 KDR-68 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGT-  
 D84128 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 FJ418769 TGCTTTGGGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGATACCGTAAGGTG  
 \*\*\*\*\*  
 AM410696 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 EU685335 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 CMU09762 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 AB299158 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 Genomic 16S GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 AGM-7 -----  
 SLK-11 -----  
 RJL-74 GA-----  
 CJR-45 -----  
 MLG-65 -----  
 KDR-68 -----  
 D84128 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA  
 FJ418769 GAGCGAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGAGGTCTGCAACTCGACCTCATGAA

```

AM410696      GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
EU685335     GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
CMU09762     GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
AB299158     GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
Genomic 16S  GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
AGM-7        -----
SLK-11       -----
RJL-74       -----
CJR-45       -----
MLG-65       -----
KDR-68       -----
D84128       GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
FJ418769     GTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG

AM410696      TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
EU685335     TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
CMU09762     TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
AB299158     TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
Genomic 16S  TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
AGM-7        -----
SLK-11       -----
RJL-74       -----
CJR-45       -----
MLG-65       -----
KDR-68       -----
D84128       TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG
FJ418769     TACACACCGCCCGTCAAGTCATGAAAGTCGGTAAC-ACCCGAAGCCAGTGGCCTAACCCG

AM410696      AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
EU685335     AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
CMU09762     AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
AB299158     AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
Genomic 16S  AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
AGM-7        -----
SLK-11       -----
RJL-74       -----
CJR-45       -----
MLG-65       -----
KDR-68       -----
D84128       AAGGG-AGGAGCTGTCTGAAGGTGGGATCGGTGATTAGGACTAAGTCGTAACCAAGTAGCC
FJ418769     AGCACCAGAAAT-----AGATCAGACGTCAG--CTCAGGCACTGCATGAC-TCA

AM410696      GTACCGGAA-----
EU685335     GTA-----
CMU09762     GTACCGGAAGGNNNGNTGG-ATCACCTCCTTTCT-----
AB299158     -----
Genomic 16S  GTACCGGAAGGTGCGGCTGG-ATCACCTCCTTTCTAAGGA
AGM-7        -----
SLK-11       -----
RJL-74       -----
CJR-45       -----
MLG-65       -----
KDR-68       -----
D84128       A-----
FJ418769     GCA-----

```

Gambar 6. Pensejajaran parsial sekuen gen 16S rRNA 6 isolat *Cmm* yang dikarakterisasi dan 6 *Cmm* di pangkalan data *GeneBank*. Aksesinya AB299158 - parsial sekuen 16S rRNA *Cmm* Jepang, Aksesinya D84128 - parsial sekuen 16S rRNA *Cmm* Jepang, Aksesinya AM410696 - parsial 16S rRNA *Cmm* type strain DSM 46364 Jerman, Aksesinya CMU09762 - 16S rRNA *Cmm* LMG 7333 Kanada, Aksesinya EU685335 parsial sekuen 16S rRNA *Cmm* Korea, dan Aksesinya FJ418769 parsial sekuen 16S rRNA *Cmm* Cina yang didapat dari *GeneBank* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.

\*) menunjukkan nukleotida yang sama.

## Determinasi Identitas *Cmm*

Perbandingan sekuen asam amino gen *serine protease* antara enam *Cmm* yang diidentifikasi dalam penelitian ini dengan sekuen asam amino gen *serine protease Cmm* di pangkalan data *GeneBank* DNA menunjukkan bahwa enam *Cmm* yang diteliti homologi 99% dengan aksesori YP\_001220667 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) (Garteman *et al.* 2008), dan homologi  $\pm$  20% dengan aksesori YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_0012207, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) (Garteman *et al.* 2008).

Matrik jarak sekuen asam amino gen *serine protease 6 Cmm* yang diidentifikasi dengan aksesori YP\_001220667 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) (Garteman *et al.* 2008) adalah  $\pm$  0,5%, sedangkan dengan aksesori YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_00122078, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) (Garteman *et al.* 2008) adalah  $\pm$  80% (Tabel 4).

Tabel 4. Matrik jarak (%) berdasarkan pada prediksi sekuen asam amino gen *serine protease* dari *Cmm* yang diidentifikasi, aksesori (YP\_001220667, YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_00122078, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781) *putative extracellular serine protease Cmm*.

|                 | 1    | 7    | 3    | 6    | 4    | 2    | 5    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   | 13   | 14   | 15  |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-----|
| 1 AGM-7         | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 7 SLK-11        | 0,0  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 3 RJL-74        | 0,0  | 0,5  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 6 CJR-45        | 0,0  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 4 MLG-65        | 0,0  | 0,5  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 2 KDR-68        | 0,0  | 0,5  | 0,5  | 0,0  | 0,0  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 5 YP_001220667  | 0,0  | 0,5  | 0,5  | 0,0  | 0,0  | 0,5  | 0,0  |      |      |      |      |      |      |      |     |
| 8 YP_001222690  | 75,9 | 76,1 | 76,2 | 75,9 | 76,1 | 76,3 | 80,5 | 0,0  |      |      |      |      |      |      |     |
| 9 YP_001222689  | 73,8 | 73,9 | 74,1 | 73,8 | 74,1 | 74,2 | 77,3 | 44,1 | 0,0  |      |      |      |      |      |     |
| 10 YP_001222684 | 75,7 | 75,8 | 75,9 | 75,7 | 75,9 | 76,1 | 80,8 | 64,2 | 64,1 | 0,0  |      |      |      |      |     |
| 11 YP_001220789 | 78,1 | 78,2 | 78,3 | 78,1 | 78,3 | 78,4 | 81,4 | 75,5 | 75,0 | 76,6 | 0,0  |      |      |      |     |
| 12 YP_001220781 | 78,1 | 78,2 | 78,3 | 78,1 | 78,3 | 78,4 | 81,8 | 75,6 | 75,4 | 76,7 | 0,6  | 0,0  |      |      |     |
| 13 YP_001220814 | 80,1 | 80,2 | 80,3 | 80,1 | 79,8 | 80,4 | 83,0 | 74,2 | 73,0 | 77,2 | 83,8 | 83,8 | 0,0  |      |     |
| 14 YP_001220780 | 79,9 | 80,0 | 79,6 | 79,9 | 79,6 | 79,7 | 83,8 | 73,0 | 73,6 | 77,0 | 82,2 | 83,0 | 54,6 | 0,0  |     |
| 15 YP_001220783 | 78,3 | 78,4 | 78,5 | 78,3 | 78,5 | 78,5 | 81,6 | 78,4 | 77,3 | 78,8 | 81,1 | 81,8 | 66,3 | 64,7 | 0,0 |

Catatan : aksesi (YP\_001220667, YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_00122207, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781) adalah *putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382 di pangkalan data *GeneBank* DNA pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Perbandingan nukleotida gen 16S rRNA 6 *Cmm* dikarakterisasi di penelitian ini dengan nukleotida gen 16S rRNA di pangkalan data *GeneBank* (inter spesies) menunjukkan bahwa 6 *Cmm* ini homologi 100% dengan aksesi D84128 (16S rRNA *Cmm* Jepang) (Sasaki *et al.* 1998), dan homologi 99,8% dengan genomic 16S rRNA *Cmm*, aksesi AB299158 (16S rRNA *Cmm* Jepang) (Takikawa *et al.* 2007), aksesi AM410696 (16S rRNA *Cmm* Jerman) (Stackebrandt *et al.* 2006), aksesi CMU09762 (16S rRNA *Cmm* Kanada) (Li *et al.* 1995), aksesi EU685335 (16S rRNA *Cmm* Korea) (Myung *et al.* 2008), serta homologi 97,4% dengan aksesi FJ418769 (16S rRNA *Cmm* Cina)(Gang 2008). Sekuen 16S rRNA *Cmm* yang dikarakterisasi dalam penelitian ini adalah parsial sekuen dari gen 16S rRNA *Cmm* (Tabel 5).

Tabel 5. Identitas sekuen gen 16S rRNA antar *Cmm* yang dikarakterisasi dengan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank* DNA.

| Identitas Isolat | Ukuran sekuen (bp) | Posisi pada genomic 16S rRNA <i>Cmm</i> | Identitas sekuen nukleotida gen 16S rRNA <i>Cmm</i> di pangkalan data <i>GeneBank</i> DNA (%) |        |          |          |          |          |          |
|------------------|--------------------|---|---|--------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                  |                    |   | Genomic 16S   | D84128 | AB299158 | AM410696 | CMU09762 | FJ418769 | EU685335 |
| AGM-7            | 1222               | 12 - 1240                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,4     | 99,8     |
| SLK-11           | 1229               | 11 - 1246                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,4     | 99,8     |
| RJL-74           | 1238               | 11 - 1255                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,5     | 99,8     |
| CJR-45           | 1227               | 16 - 1249                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,4     | 99,8     |
| MLG-65           | 1221               | 14 - 1241                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,4     | 99,8     |
| KDR-68           | 1232               | 14 - 1252                               | 99,8  | 100    | 99,8     | 99,8     | 99,8     | 97,4     | 99,8     |

Catatan : AB299158-16S rRNA *Cmm* Jepang, D84128-16S rRNA *Cmm* Jepang, AM410696-16S rRNA *Cmm* Jerman, CMU09762-16S rRNA *Cmm* Kanada, EU685335-16S rRNA *Cmm* Korea, FJ418769-16S rRNA *Cmm* Cina di pangkalan data *GeneBank* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>.

Matrik jarak nukleotida gen 16S rRNA 6 isolat *Cmm* yang dikarakterisasi di penelitian ini dengan aksesori D84128 (16S rRNA *Cmm* Jepang) (Sasaki *et al.* 1998) adalah 0%, dengan aksesori AB299158 (16S rRNA *Cmm* Jepang) (Takikawa *et al.* 2007), aksesori AM410696 (16S rRNA *Cmm* Jerman) (Stackebrandt *et al.* 2006), aksesori CMU09762 (16S rRNA *Cmm* Kanada) (Li *et al.* 1995), aksesori EU685335 (16S rRNA *Cmm* Korea) (Myung *et al.* 2008) adalah 0,2%, sedangkan dengan aksesori FJ418769 (16S rRNA *Cmm* Cina) (Gang 2008) adalah  $\pm$  2,6% (Tabel 6).

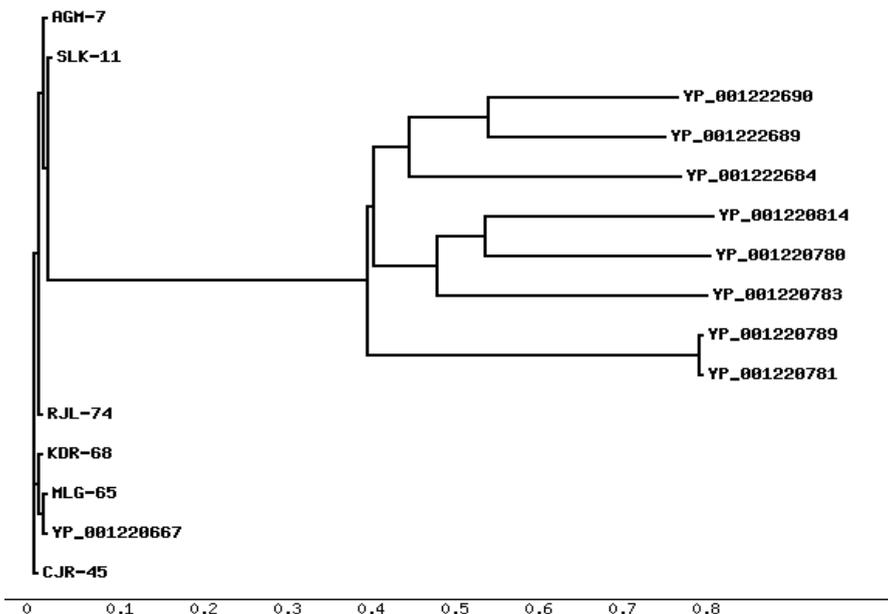
Tabel 6. Matrik jarak (%) berdasarkan sekuen nukleotida gen 16S rRNA yang dikarakterisasi, aksesori AB299158 (16S rRNA *Cmm* Jepang), aksesori D84128 (16S rRNA *Cmm* Jepang), aksesori AM410696 (16S rRNA *Cmm* Jerman), aksesori CMU09762 (16S rRNA *Cmm* Kanada), aksesori EU685335 (16S rRNA *Cmm* Korea), dan aksesori FJ418769 (16S rRNA *Cmm* Cina).

| Isolat                      | AGM-7 | SLK-11 | RJL-74 | CJR-45 | MLG-65 | KDR-68 |
|-----------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AGM-7                       | 0,0   |        |        |        |        |        |
| SLK-11                      | 0,0   | 0,0    |        |        |        |        |
| RJL-74                      | 0,0   | 0,0    | 0,0    |        |        |        |
| CJR-45                      | 0,0   | 0,0    | 0,0    | 0,0    |        |        |
| MLG-65                      | 0,0   | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 0,0    |        |
| KDR-68                      | 0,0   | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 0,0    |
| D84128                      | 0,0   | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 0,0    | 0,0    |
| Genomic 16S rRNA <i>Cmm</i> | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    |
| AB299158                    | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    |
| AM410696                    | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    |
| CMU09762                    | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    |
| FJ418769                    | 2,6   | 2,6    | 2,5    | 2,6    | 2,6    | 2,6    |
| EU685335                    | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2    |

Catatan : AB299158-16S rRNA *Cmm* Jepang, D84128-16S rRNA *Cmm* Jepang, AM410696-16S rRNA *Cmm* Jerman, CMU09762-16S rRNA *Cmm* Kanada, EU685335-16S rRNA *Cmm* Korea, FJ418769-16S rRNA *Cmm* Cina di pangkalan data *GeneBank* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast>.

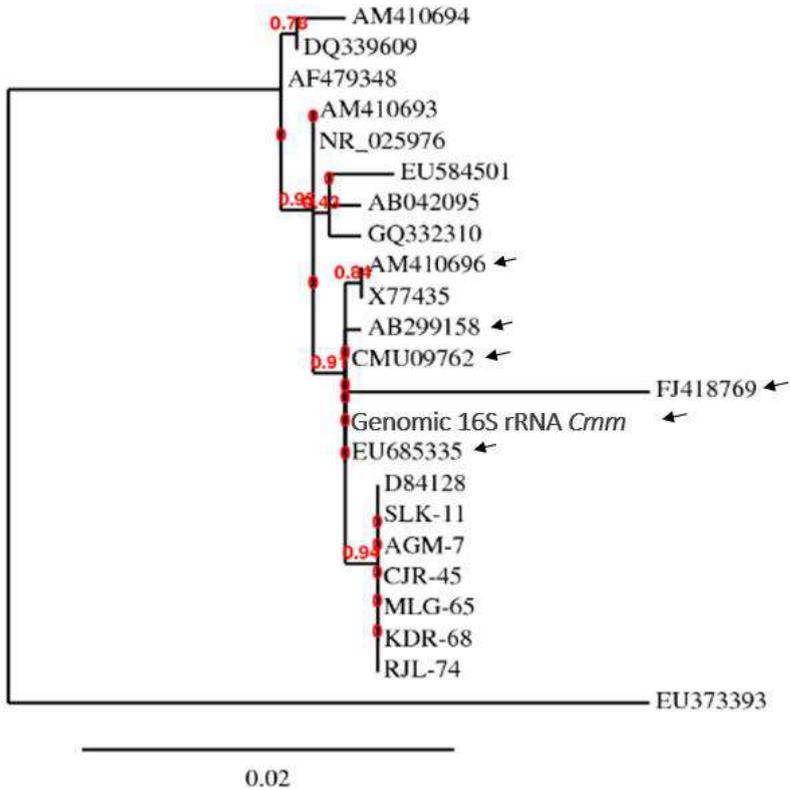
## Filogenetik Berdasarkan Sekuen Gen *Serine Protease* dan 16S rRNA

Filogenetik berdasarkan sekuen asam amino gen *serine protease Cmm* yang diidentifikasi di penelitian ini dan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank* DNA (inter spesies) ada pada (Gambar 8). Enam *Cmm* yang diidentifikasi dalam penelitian ini mengelompok dengan aksesori YP\_001220667 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) di pangkalan data *GeneBank* DNA. Aksesori YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_0012207, YP\_001220780, YP\_001220789, dan YP\_001220781 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382 di pangkalan data *GeneBank* DNA) mengelompok tersendiri.



Gambar 7. Hubungan filogenetik berdasarkan sekuen gen *serine protease Cmm* yang diidentifikasi dan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank*. *Putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382 (aksesori YP\_001220667, YP\_001222690, YP\_001222689, YP\_001220814, YP\_001222684, YP\_00122078, YP\_001220780, YP\_001220789, YP\_001220781) di pangkalan data *GeneBank* pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

Analisis filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen 16S rRNA enam *Cmm* yang dikarakterisasi di penelitian ini dan sekuen nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* dan *Clavibacter sp* di pangkalan data *GeneBank* (inter spesies) ada pada (Gambar 9). Enam *Cmm* ini mengelompok dengan aksesori D84128 (16S rRNA *Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*). Enam isolat (16S rRNA *Cmm* di pangkalan data *GeneBank*) (tanda panah) meliputi; aksesori AM410696, aksesori AB299158, aksesori CMU09762, aksesori FJ418769, Genomic 16S rRNA *Cmm*, aksesori EU685335 ada dalam satu kelompok. Sembilan isolat (16S rRNA *Clavibacter sp* di pangkalan data *GeneBank*) yakni; aksesori AM410694, aksesori DQ339609, aksesori AF479348, aksesori AM410693, aksesori NR\_025976, aksesori EU584501, aksesori AB042095, aksesori GQ332310, aksesori X77435 ada dalam satu kelompok lain. Satu isolat (16S rRNA *Bacillus subtilis* di pangkalan data *GeneBank*) yakni aksesori EU373393 ada dalam satu kelompok tersendiri.



Gambar 8. Hubungan filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* yang dikarakterisasi dan *Cmm* di pangkalan data *GeneBank* DNA. Gen 16S rRNA aksesinya AM410694 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* type strain DSM 20744 Jerman), aksesinya DQ339609 (*Clavibacter* sp. Enf37 Cina), aksesinya AF479348 (Glacial ice bacterium G50-PD1 Cina), aksesinya AM410693 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *tessellarius*, aksesinya NR\_025976 (*Clavibacter michiganensis* subspecies *tessellarius* strain 78181 Kanada), aksesinya EU584501 (*Clavibacter* sp. Everest-gws-100 Cina), aksesinya AB042095 (*Curtobacterium* sp. VKM Ac-2060 Jepang), aksesinya GQ332310 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* isolat Cmi18b1 Polandia), aksesinya AM410696 (*Cmm* type strain DSM-46364 Jerman), aksesinya X77435 (*C. michiganense* DSM 46364 Jerman), aksesinya AB299158 (*Cmm* Jepang), aksesinya CMU09762 (*Cmm* LMG 7333 Kanada), aksesinya FJ418769 (*Cmm* China, tipe strain DSM 20741 Jerman), Genomic 16S rRNA *Cmm*, aksesinya EU685335 (*Cmm* Korea), aksesinya D84128 (*Cmm* Jepang), aksesinya EU373393 (*Bacillus subtilis* strain TPL16 Korea). Data dari pangkalan data *GeneBank* DNA pada <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* adalah bakteri gram positif penyebab penyakit kanker pada tanaman tomat dan merupakan bakteri patogen tular benih (*seedborne pathogen*). Sejumlah lot benih tomat komersial yang beredar di Indonesia dilaporkan terkontaminasi bakteri *Cmm* (Anwar *et al.* 2004a,b). Sumber inokulum primer penyakit kanker bakteri adalah benih yang terinfeksi *Cmm* (Lelliot & Stead 1987; Chang *et al.* 1992). Adanya *Cmm* pada benih komersial yang beredar di Indonesia ternyata ditemukan juga pada tanaman tomat di lapangan (Zainal *et al.* 2008; Sumarti 2009). Tulisan ini, melaporkan tentang deteksi dan karakterisasi molekuler *Cmm* di berbagai sentra tanaman tomat di Sumatera dan Jawa, Indonesia. Deteksi dan karakterisasi molekuler berdasarkan sekuen nukleotida gen *serine protease* dan 16S rRNA *Cmm* hasil PCR. Sekuensing hasil PCR dilakukan setelah parameter PCR dioptimasi, metode ini punya satu keuntungan dibanding strategi lain, yakni sangat efisien menganalisis sejumlah besar sekuen dalam waktu yang singkat.

Analisis sekuen nukleotida gen *serine protease* menunjukkan bahwa bakteri penyebab penyakit kanker pada tomat di Sumatera dan Jawa adalah *Cmm*. Hasil NCBI *Blast* sekuen asam amino gen *serine protease* di penelitian ini homologi 99% dengan aksesori YP\_001220667 (*putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382) di pangkalan data *GeneBank* DNA (Garteman *et al.* 2008), tetapi dengan *putative extracellular serine protease Cmm* NCPPB 382 lain di pangkalan data *GeneBank* DNA homologi  $\pm$  20%. Perbedaan ini terjadi karena situs aktif sekuen asam amino itu adalah *serine protease* tetapi domain yang lainnya berbeda yang dikenal dengan iso enzim. Analisis sekuen asam amino gen *putative extracellular serine protease* tidak menjawab filogeni yang berdekatan dengan spesies bakteri, tetapi analisis ini hanya mendeteksi cepat, sensitif dan spesifik bahwa bakteri yang dideterminasi adalah benar *Cmm* (Santos *et al.* 1997; Hadas *et al.* 2005).

Analisis filogenetik berdasarkan sekuen nukleotida inter spesies gen 16S rRNA *Cmm* yang dikarakterisasi di penelitian ini homologi 100% dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA pada aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*) (Sasaki *et al.* 1998). Matrik jarak inter spesies antara 6 *Cmm* yang dikarakterisasi berdasarkan sekuen nukleotida gen 16S rRNA tersebut dengan sekuen nukleotida gen 16S rRNA dari aksesori D84128

(*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*) adalah 0%. Diduga bahwa sekuen nukleotida gen 16S rRNA *Cmm* yang dikarakterisasi dari jumlah nukleotida yang ada pada gen tersebut punya kemiripan dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*).

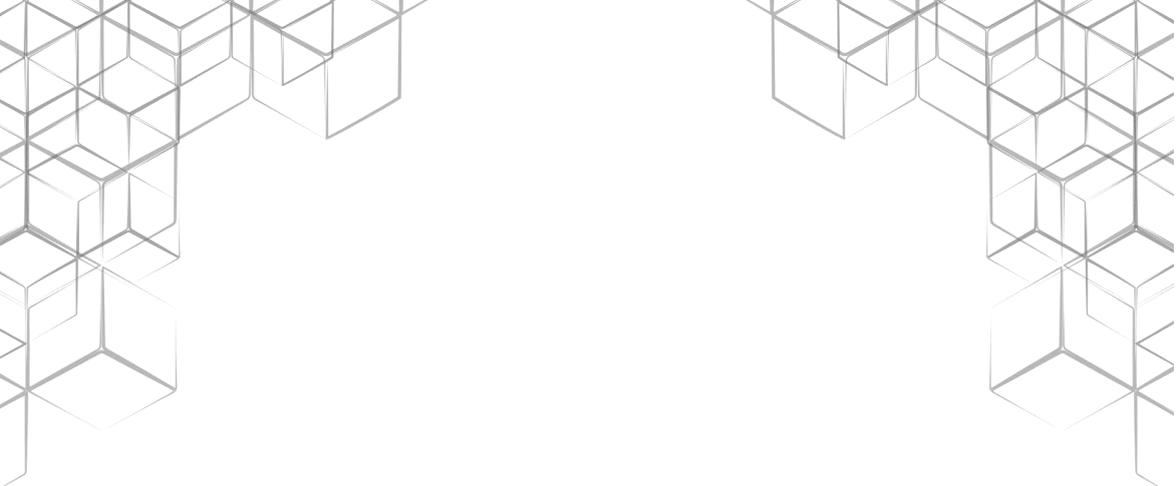
Data sekuen nukleotida gen 16S rRNA ini menunjukkan bahwa *Cmm* di Sumatera dan Jawa ini berasal dari introduksi. Patogen ini dilaporkan belum ada di Indonesia sampai tahun 2002 dan tergolong sebagai organisme pengganggu tumbuhan karantina (OPTK). Konsekuensi dari perdagangan benih antar negara atau pertukaran plasma nutfah untuk perakitan varietas baru diduga menyebabkan masuknya *Cmm* ke Indonesia. Data sekuen nukleotida gen *serine protease* dan 16S rRNA intra spesies enam isolat *Cmm* yang dikarakterisasi ini menunjukkan bahwa patogen ini satu strain yang sama (homologinya 99%), walaupun sampel dari lokasi yang berbeda, patogen ini diduga berasal dari satu sumber, dan keberadaannya baru di Indonesia. Patogen ini mungkin belum mengalami mutasi untuk beradaptasi dengan iklim dan keragaman tanaman inang yang berbeda. Masuknya penyakit baru ke wilayah tertentu atau negara seperti Indonesia adalah salah satu konsekuensi perdagangan dan pertukaran plasmanutfah antar negara (Chang *et al.* 1989, 1991).

Kemiripan karakterisasi molekuler *Cmm* dari berbagai lokasi di Sumatera dan Jawa dengan karakterisasi molekuler aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*) bukan berarti patogen ini berasal dari Jepang. Secara langsung Jepang memang tidak mengekspor benih ke Indonesia, jadi Jepang dan Indonesia diduga dapat isolat dari negara ketiga yang sama.

Ditemukannya *Cmm* di lapangan dan ditingkat petani di Indonesia perlu diwaspadai untuk masa yang akan datang, perlu disusun strategi pengendalian penyakit yang efektif untuk menghindari timbulnya ledakan penyakit (*outbreak*) yang akan merugikan petani. Salah satu pendekatan yang tepat dalam pengendalian penyakit ini adalah penanaman kultivar tomat tahan atau rotasi tanaman. Langkah awal dalam pengembangan kultivar tomat tahan adalah menguji ketahanan berbagai genotipe tomat terhadap *Cmm*. Reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat terhadap inokulasi *Cmm* telah diuji dalam penelitian ini dan ditampilkan secara lengkap pada bab berikutnya.

## Simpulan

1. Adanya pita DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR membuktikan bahwa sampel-sampel tanaman tomat yang sakit terinfeksi oleh *Cmm*.
2. Hasil analisis *Blast* menggunakan sekuen nukleotida dan asam amino menunjukkan bahwa fragmen DNA hasil amplifikasi PCR adalah gen *serine protease* dan 16S rRNA dari *Cmm*.
3. Identitas sekuen nukleotida dari gen 16S rRNA di antara isolat-isolat *Cmm* mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut punya kemiripan homologi 100% dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*), ini menunjukkan Jepang dan Indonesia diduga dapat isolat dari negara ketiga yang sama.
4. Hasil analisis filogenetik berdasarkan sekuen gen *serine protease* dan 16S rRNA mengindikasikan bahwa enam isolat *Cmm* (intra spesies) merupakan satu kelompok, isolat-isolat tersebut adalah strain yang sama yang berasal dari satu sumber, dan keberadaan patogen ini baru di Indonesia.



## **BAB V**

### Reaksi Ketahanan Berbagai Genotipe Tomat Terhadap Inokulasi *Clavibacter* *michiganensis* subsp. *Michiganensis*

---

## Pengantar

Identifikasi ketahanan genotipe adalah langkah awal dalam pengembangan kultivar tahan terhadap serangan patogen. Tujuan penelitian ini adalah (i) mendapatkan cara inokulasi dengan jumlah dan konsentrasi inokulum *Cmm* yang efektif untuk mengevaluasi ketahanan tomat terhadap *Cmm* di rumah kaca, (ii) mendeterminasi reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat akibat inokulasi *Cmm*, (iii) melihat korelasi reaksi ketahanan genotipe tomat terhadap aktivitas peroksidase akibat inokulasi *Cmm*. Percobaan ini menggunakan 38 genotipe tomat yang terdiri dari 7 genotipe tomat lokal, 15 genotipe tomat komersial, dan 16 genotipe koleksi Pusat Studi Pemuliaan Tanaman IPB Bogor (PSPT/IPB). Agen penyebab penyakit yang digunakan adalah 6 isolat *Cmm* hasil percobaan sebelumnya. Cara inokulasi *Cmm* yang efektif terhadap tomat cv. Marta (sangat rentan), uji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat terhadap *Cmm*, dan korelasi reaksi ketahanan genotipe tomat terhadap aktivitas peroksidase akibat inokulasi *Cmm* telah dilakukan. Kesimpulan dari penelitian ini adalah (i) inokulasi dengan menyuntikkan inokulum *Cmm* 5 µl konsentrasi  $10^6$  cfu/ml pada beberapa tempat di ketiak daun (daun pertama, daun tengah dan pucuk) merupakan cara yang paling efektif mengevaluasi ketahanan tomat terhadap *Cmm*. (ii) Terhadap berbagai genotipe tomat yang diuji belum ada yang tahan terhadap *Cmm*, genotipe tomat lokal ada yang agak rentan dan agak tahan, (iii) Aktivitas peroksidase tidak berkorelasi dengan reaksi ketahanan genotipe tomat akibat inokulasi *Cmm*.

Penyakit kanker bakteri disebabkan *Cmm*, adalah salah satu penyakit penting pada tomat di dunia (Chang & Pataki 1992; Vasinauskienė 2002). Penelitian sebelumnya telah ditemukan penyakit kanker bakteri di beberapa daerah sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa.

Pengendalian penyakit ini sering tidak berhasil bila epidemi penyakit telah terjadi (Gitaitis *et al.* 1992). Beberapa faktor penyebabnya adalah: (1) agen penyebab penyakit ini memiliki kisaran inang yang luas; sisa tanaman (Hasan *et al.* 1968; Strider 1969), kelembaban yang tinggi, infeksi primer oleh tanaman (Ricker & Rieder 1993) dalam *CAB International 2007*, (2) belum ada pestisida komersial dapat mengendalikan bakteri.

Cara yang paling efektif untuk mengurangi penyakit ini adalah penanaman kultivar tomat tahan (Russel 1978; Francis *et al.* 2001; Agrios 2005) atau rotasi tanaman. Penggunaan kultivar tomat tahan sangat efektif dan ramah lingkungan. Sampai saat ini belum diketahui kultivar tomat tahan *Cmm* di Indonesia mengingat patogen ini baru dilaporkan. Pemuliaan tanaman perlu dilakukan dan penapisan reaksi tanaman tomat terhadap infeksi *Cmm* perlu dikembangkan.

Tulisan ini melaporkan tentang optimasi inokulasi *Cmm* pada tanaman uji, mendeterminasi reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat akibat inokulasi *Cmm*, dan korelasi reaksi ketahanan tomat akibat inokulasi *Cmm* terhadap aktivitas peroksidase. Program ini merupakan langkah awal pemuliaan tanaman dalam pengembangan kultivar unggul tahan penyakit kanker bakteri.

Secara fisiologis, mekanisme ketahanan tomat terhadap *Cmm* belum diketahui secara pasti. Penelitian melaporkan bahwa mekanisme ketahanan tanaman terhadap patogen melibatkan peningkatan aktivitas enzim tertentu antara lain aktivitas enzim peroksidase, peroksidase merupakan salah satu enzim yang terkait dengan mekanisme ketahanan tanaman terhadap cekaman (Artlip & Funkhouser 1995). Aktivitas peroksidase dilaporkan berperan dalam ketahanan tanaman terhadap virus pada tanaman mentimun (Yurina *et al.* 1993) dan kedelai (Andreeva 1989).

Percobaan ini bertujuan (i) mendapatkan cara inokulasi dengan jumlah dan konsentrasi inokulum *Cmm* yang efektif untuk mengevaluasi ketahanan tomat terhadap *Cmm* di rumah kaca, (ii) mendeterminasi reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat akibat inokulasi *Cmm*, (iii) melihat korelasi reaksi ketahanan genotipe tomat terhadap aktivitas peroksidase akibat inokulasi *Cmm*.

Percobaan dilaksanakan di laboratorium Bakteriologi dan rumah kaca kedap serangga Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang dari bulan Februari sampai dengan September 2008.

## **Bahan Tanaman dan Penanaman**

Genotipe tomat yang digunakan adalah 7 genotipe tomat lokal yaitu ceri oval Pasaman, ceri bulat Pasaman, ceri berlekuk Kerinci, ceri bulat kecil Kerinci, ceri bulat sedang Bengkulu, ceri rimbang paragi Tanah Datar, 15 genotipe tomat komersial yaitu Sapira, Dira,

Marta, Cosmonot, Brastagi, Hawaii, Warani, Martabat, Tamara, Rizky, Samina, Natama, Montera, Permata, Lyla, 16 genotipe koleksi PSPT/IPB Bogor yaitu SSH3, SSH8, SSH9, SSH10, AVGV, Gondol lembang, Gondol putih, Apel Belgia, Apel Belgia indeterminate, Karibia buah besar, Karibia buah kecil, Intan, Mahkota, Ceri buah besar, Pointed, Caraibe.

Sebelum ditanam, benih tomat disemai pada kotak persemaian (20 x 10 x 5 cm). Bibit dipindah tanam ke polibag (15 x 25 cm) setelah berumur tiga minggu. Media tanam yang digunakan adalah campuran tanah dan pupuk kandang (4:1) yang sudah disterilisasi dengan uap panas (suhu 100 °C ± 10 °C) selama 8 jam. Polibag yang sudah ditanam kemudian diletakkan secara teratur berjarak 50 cm (antar baris tanaman) x 50 cm (dalam baris tanaman). Tanaman dari satu genotipe diletakkan dalam lajur yang sama sedangkan ulangnya diletakkan secara acak, setiap polibag ditanam satu tanaman tomat. Saat berumur enam minggu, individu tanaman yang tidak menunjukkan gejala serangan hama dan penyakit dipilih untuk diinokulasi dengan *Cmm*. Pemupukkan tanaman dilakukan dua kali, pupuk pertama diberikan bersamaan waktu tanam dengan dosis Urea, SP36 dan KCl masing-masing 5 g/tanaman, sedangkan pemupukkan kedua setelah tanaman berumur 6 minggu dengan dosis Urea, SP36 dan KCl masing-masing 7 g/tanaman.

### **Persiapan Inokulum *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* Asal Isolat.**

*C. michiganensis* subsp. *michiganensis* yang digunakan adalah enam *Cmm* dari berbagai lokasi di Sumatera dan Jawa : R JL-74 (Rejang Lebong-Bengkulu), AGM-7 (Agam-Sumatera Barat), SLK-11 (asal Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat), CJR-45 (Cianjur-Jawa Barat), MLG-65 (Malang-Jawa Timur), dan KDR-68 (Kediri-Jawa Timur) (Zainal *et al.* 2008).

### **Perbanyak Isolat Bakteri.**

Biakan murni *Cmm* diinokulasikan pada media NBY kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 48-72 jam. Biakan murni bakteri disentrifus dengan kecepatan 1,564 x g selama 10 menit pada temperatur ruangan. Hasil sentrifus diresuspensi dengan akuades

steril dan suspensi bakteri ditetapkan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 480 nm dengan OD 0,67 yang diperkirakan mengandung sel bakteri  $10^8$  CFU/ml, kemudian diencerkan lagi 1 : 100 ( $\pm 1 \times 10^6$  CFU/ml) (Hadas *et al.* 2005). Uji patogenisitas *Cmm* sudah dilakukan pada penelitian sebelumnya.

### **Uji Efektivitas Berbagai Cara Inokulasi *Cmm* pada Tanaman Tomat**

Uji inokulasi memakai *Cmm* SLK-11 yang virulen hasil penelitian sebelumnya, yang diisolasi dari buah tomat yang bergejala *bird's eye spot* (asal Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat) (Zainal *et al.* 2008). Tanaman diinokulasi ketika berumur 6 minggu. Pra penelitian ini dilakukan menggunakan 3 cara inokulasi inokulum yaitu, (inokulasi inokulum pada tangkai daun dengan 2 cara dan inokulasi inokulum pada ketiak daun dengan 1 cara) dengan berbagai konsentrasi bakteri pada varietas tomat sangat rentan (c.v Marta) hasil penelitian sebelumnya. Cara inokulasi pada tangkai daun adalah daun pertama tanaman dipotong miring dengan gunting steril berjarak 0,5 dan 2,0 cm dari batang sehingga terdapat permukaan yang agak datar, kemudian suspensi bakteri diteteskan dengan pipet eppendorf. Konsentrasi bakteri diukur secara fotometer pada OD 0,67 dan 0,06 dan jumlah suspensi bakteri yang diinokulasi adalah 5  $\mu$ l dan 20  $\mu$ l. Inokulasi pada ketiak daun adalah dengan cara menyuntikkan suspensi bakteri pada beberapa tempat di ketiak daun tanaman (daun pertama, daun tengah dan pucuk). Konsentrasi bakteri diukur secara fotometer pada OD 0,67 dan 0,06 dan jumlah suspensi bakteri yang diinokulasi adalah 5  $\mu$ l dan 20  $\mu$ l. Kontrol negatif diinokulasi dengan akuades steril. Masing-masing cara inokulasi dilakukan sebanyak lima ulangan dan tiap ulangan terdiri dari 3 tanaman, tiap tanaman tomat ditanam dalam wadah satu polibag.

Tingkat serangan *Cmm* diamati pada tanaman tomat yang diinokulasi secara buatan berdasarkan gejala serangan mengacu kriteria (Habazar 1990) pada Tabel 7.

Tabel 7. Tingkat serangan *C. michiganensis* yang diinokulasi buatan pada tanaman tomat.

| Tingkat serangan | Gejala   |
|------------------|--|
| 1                | sehat  |
| 2                | sehat, tetapi terlihat gejala layu pada ujung daun (1-2 helai daun)  |
| 3                | pertumbuhan agak terlambat, terlihat gejala layu ringan (daun layu 20%) sampai sedang (daun layu hingga 50%) |
| 4                | pertumbuhan terhambat, terlihat gejala layu berat (daun layu hingga 70%)                                     |
| 5                | pertumbuhan sangat terhambat, terlihat gejala layu dan semua daun mati atau mengering                        |
| 6                | pertumbuhan total terhambat, semua daun mengering  |
| 7                | tanaman mati total   |

Cara inokulasi dengan konsentrasi dan jumlah suspensi bakteri yang paling efektif menimbulkan gejala menurut tingkat serangan seperti pada Tabel 7, dilanjutkan untuk pengujian tingkat kelayuan dengan menggunakan beberapa pengenceran suspensi bakteri yaitu tanpa pengenceran, pengenceran 1 : 10, dan pengenceran 1 : 100. Penilaian ketahanan tanaman menurut tingkat kelayuan ini didasarkan kepada indeks serangan (tingkat kelayuan) yang berdasarkan pada kriteria menurut Mavridis (1982) yang dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Reaksi ketahanan varietas tomat terhadap serangan *C. michiganensis* (Mavridis 1982)

| Indeks serangan | Reaksi        | Tingkat kelayuan       |
|-----------------|---------------|------------------------|
| 0               | tahan         | tidak ada layu         |
| 1               | agak tahan    | 1 - 2 helai daun layu  |
| 2               | agak rentan   | daun layu 20%          |
| 3               | rentan        | daun layu 50 - 70%     |
| 4               | sangat rentan | hampir semua daun layu |

Pengamatan waktu inkubasi diamati saat melakukan inokulasi *Cmm* pada tomat sampai saat timbulnya gejala pertama (skala 4) (hari). Pengamatan interval waktu antara inokulasi dengan tanaman layu total diamati saat melakukan inokulasi *Cmm* pada tomat sampai tanaman layu total (skala 4) (hari) (Tabel 9).

Tabel 9. Kriteria penilaian pengamatan reaksi tanaman tomat yang diinokulasi dengan *C. michiganensis*

| Reaksi        | Interval waktu antara inokulasi dengan |                   | Nilai |
|---------------|--|-------------------|-------|
|               | gejala pertama (hari)                  | layu total (hari) |       |
| tahan         | > 35                                   | > 60              | 0,5   |
| agak tahan    | 25 - 35                                | 50 - 60           | 1,5   |
| agak rentan   | 15 - 25                                | 40 - 50           | 2,5   |
| rentan        | 10 - 15                                | 35 - 40           | 3,5   |
| sangat rentan | < 10                                   | < 35              | 4,0   |

### Reaksi Ketahanan 38 Genotipe Tomat terhadap Inokulasi *Cmm*

Cara inokulasi *Cmm* yang dipakai untuk uji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat adalah dengan menyuntikkan suspensi bakteri 5 µl konsentrasi 10<sup>6</sup> CFU/ml melalui ketiak daun pada beberapa tempat (daun pertama, daun tengah dan pucuk) pada tanaman tomat berumur 6 minggu. Kontrol negatif dilakukan dengan menyuntikkan akuades steril.

Percobaan rekasi ketahanan 38 genotipe tomat ini dilakukan terhadap enam isolat *Cmm* hasil percobaan sebelumnya. Sehingga terdapat enam seri percobaan, setiap seri percobaan terdiri dari uji reaksi ketahanan 38 genotipe tomat terhadap satu isolat *Cmm*. Masing-masing genotipe diulang sebanyak lima ulangan dan masing-masing ulangan terdiri dari 3 tanaman, tiap tanaman tomat ditanam dalam wadah satu polibag. Percobaan seri selanjutnya sampai seri keenam dilakukan seperti halnya dengan seri percobaan sebelumnya.

Pengamatan gejala dilakukan sejak inokulasi *Cmm* ke tanaman sampai tanaman berbuah. Pengamatan ditujukan untuk melihat masa inkubasi dan tipe gejala yang muncul. Penilaian ketahanan genotipe tomat terhadap *Cmm* (Tabel 8) adalah nilai masing-masing

pengamatan dikalikan dengan faktor yang berbeda sebagai berikut (i) interval waktu sejak inokulasi sampai saat tanaman layu total dengan faktor 6, (ii) tingkat kelayuan dengan faktor 3, (iii) saat mulai timbulnya gejala dengan faktor 1. Nilai yang diperoleh pada masing-masing pengamatan ditambahkan, kemudian dibagi 10.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan rumah kaca kedap serangga Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Kondisi suhu dan kelembaban (RH) di laboratorium terkontrol (27 °C dan 80%), sedangkan suhu dan kelembaban (RH) di dalam rumah kaca tidak terkontrol.

Aktivitas peroxidase adalah salah satu enzim yang berhubungan dengan ketahanan tanaman terhadap infeksi patogen (Chen *et al.* 2000). Aktivitas enzim peroksidase diukur pada sampel daun tomat 4 hari setelah inokulasi (hsi) *Cmm*. Prosedur analisis dilakukan mengikuti prosedur (Silva 2004).

Tingkat variabilitas pengamatan ketahanan diukur berdasarkan nilai koefisien variasi (KV) rumus Singh & Chaudhary (1979), Steel & Torrie (1981).

$$KV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

s, dan  $\bar{x}$  adalah standar deviasi, dan nilai rata-rata pengamatan. Untuk menentukan tinggi rendahnya variabilitas masing-masing pengamatan berdasarkan koefisien variasi mengikuti pengelompokan yang dikemukakan oleh Mattjik & Sumertajaya (1999), yaitu rendah (KV < 20%), sedang (20% ≤ KV ≤ 25%, dan tinggi KV > 25%.

Korelasi antar variabel dilihat berdasarkan koefisien korelasi (r) menurut rumus Singh & Chaudhary (1979);

$$r = \frac{COV_{xy}}{S_x S_y}$$

Dengan  $cov_{xy}$ ,  $s_x$ ,  $s_y$  berturut-turut adalah kovarian variabel xy, standar deviasi variabel x, standar deviasi variabel y. Menurut Young (1982) dalam Djarwanto dan Subagyo (1993) tingkat korelasi antar variabel dilihat dari nilai koefisien korelasi (r). Nilai  $0.7 < r \leq 1,0$  erat  $0,4 < r \leq 0,7$  sedang  $0,2 < r \leq 0,4$  rendah  $r \leq 0,2$  tidak berkorelasi.

Konfirmasi *Cmm* pada sampel tanaman uji dilakukan 3 minggu setelah inokulasi menggunakan metode *dilution plating* pada medium SCM. Sampel tanaman uji diekstraksi menggunakan buffer PBT dan cairan hasil ekstraksi tanaman diencerkan hingga 100 kali. Selanjutnya ekstrak tanaman yang telah diencerkan (0,5 ml) ditumbuhkan pada médium SCM dalam ruang bersuhu 26-28 °C. Jumlah koloni *Cmm* dan bakteri saprofit dihitung pada 10 hari setelah *plating* sebagai konfirmasi *Cmm* pada sampel uji.

### Efektivitas Berbagai Cara Inokulasi *Cmm* pada Tanaman Tomat

Inokulasi melalui pemotongan tangkai daun berjarak 2 cm dari batang menghasilkan gejala serangan yang lemah dibandingkan dengan pemotongan tangkai daun berjarak 0,5 cm dari batang. Inokulasi pada ketiak daun terlihat gejala serangan berat, pertumbuhan tanaman terhambat semua daun mengering pada semua kombinasi perlakuan, kontrol tidak terlihat gejala menunjukkan gejala serangan hanya disebabkan *Cmm*. Perbedaan konsentrasi dan volume inokulum tidak banyak perbedaan pada kedua cara inokulasi (Tabel 10).

Tabel 10. Perbandingan tingkat serangan *Cmm* menggunakan beberapa cara inokulasi dengan konsentrasi dan volume inokulum *Cmm* pada tanaman tomat cv. Marta.

| Cara inokulasi   | Tingkat serangan                |       |         |       | Kontrol (air) |
|--|---------------------------------|-------|---------|-------|---------------|
|  | Konsentrasi dan jumlah inokulum |       |         |       |               |
|  | OD 0,67                         |       | OD 0,06 |       |               |
|  | 5 µl                            | 20 µl | 5 µl    | 20 µl |               |
| 1. Tangkai daun pertama dipotong miring berjarak 0,5 cm dari batang dengan gunting steril, kemudian inokulum <i>Cmm</i> diteteskan | 4                               | 3     | 4       | 5     | 1             |
| 2. Tangkai daun pertama dipotong miring berjarak 2,0 cm dari batang dengan gunting steril, kemudian inokulum <i>Cmm</i> diteteskan | 3                               | 2     | 2       | 3     | 1             |
| 1. Menyuntikkan inokulum <i>Cmm</i> pada beberapa tempat di ketiak daun tomat  | 6                               | 6     | 6       | 6     | 1             |

Penelitian lebih lanjut menggunakan cara inokulasi dengan menyuntikkan inokulum *Cmm* pada beberapa tempat di ketiak daun tomat (daun pertama, daun tangan dan pucuk), konsentrasi pada OD 0,67 dengan volume inokulum 5 µl dengan beberapa pengenceran menunjukkan tidak banyak perbedaan dalam tingkat kelayuan, namun konsentrasi inokulum tanpa pengenceran menyebabkan tanaman lebih cepat layu (Tabel 11).

Pengamatan saat timbulnya gejala pertama (hari) terlihat pada inokulum konsentrasi tinggi dimana gejalanya timbul lebih awal 9 (hsi) (OD 0,67 tanpa pengenceran). Demikian juga dengan interval waktu sejak inokulasi sampai tanaman layu total yakni 28 hari setelah inokulasi. Perlakuan kontrol tidak terlihat bergejala, menunjukkan bahwa gejala serangan penyakit pada tanaman uji hanya disebabkan oleh *Cmm* (Tabel 12).

Tabel 11. Laju infeksi *Cmm* pada berbagai konsentrasi inokulum setelah diinokulasi dengan menyuntikkan inokulum *Cmm* pada beberapa tempat di ketiak daun tomat cv. Marta.

| Konsentrasi inokulum pada OD 0,67 | Tingkat Kelayuan             |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------------------------|------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
|                                   | Hari Setelah Inokulasi (hsi) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |
|                                   | 10                           | 13 | 16 | 19 | 22 | 25 | 28 | 31 | 34 | 37 |
| Tanpa pengenceran                 | 1                            | 1  | 1  | 2  | 2  | 3  | 4  |    |    |    |
| Pengenceran 1 : 10                | 0                            | 1  | 1  | 1  | 1  | 2  | 2  | 3  | 4  | 4  |
| Pengenceran 1 : 100               | 0                            | 1  | 1  | 1  | 1  | 2  | 2  | 3  | 4  | 4  |
| Kontrol (air)                     | 0                            | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

Tabel 12. Pengaruh perbedaan konsentrasi inokulum *Cmm* yang diinokulasi dengan menyuntikkan inokulum pada beberapa tempat di ketiak daun tomat cv. Marta.

| Konsentrasi inokulum pada OD 0,67 | Pengamatan                           |                  |   |
|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------|---|
|                                   | Saat timbulnya gejala pertama (hari) | Tingkat kelayuan | Interval waktu sejak inokulasi sampai terjadi layu total (hari) |
| Tanpa pengenceran                 | 9                                    | 4                | 28  |
| Pengenceran 1 : 10                | 12                                   | 4                | 32  |
| Pengenceran 1 : 100               | 13                                   | 4                | 34  |
| Kontrol (air)                     | 0                                    | 0                | 0   |

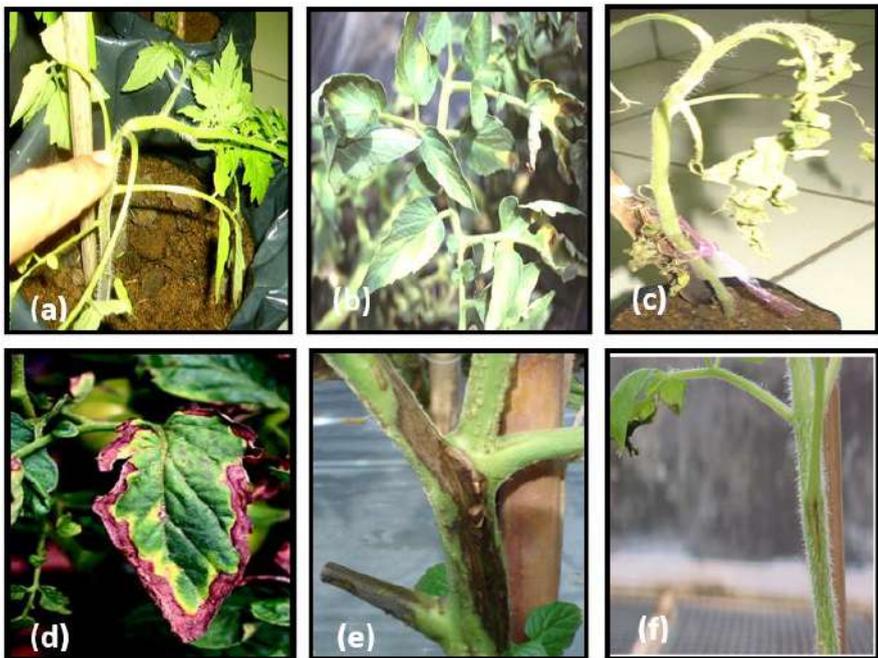
Berdasarkan hasil percobaan ini didapatkan bahwa cara inokulasi *Cmm* dengan menyuntikkan 5 µl inokulum kerapatan 10<sup>6</sup> CFU/ml pada beberapa tempat di ketiak daun, (daun pertama, daun tengah dan pucuk) sudah menimbulkan kerusakan berat pada tanaman uji. Cara inokulasi ini selanjutnya digunakan untuk uji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat terhadap *Cmm*.

### Reaksi Ketahanan 38 Genotipe Tomat terhadap *Cmm*

Reaksi ketahanan genotipe tomat terhadap *Cmm* menurut interval waktu antara inokulasi dengan saat timbul gejala menunjukkan variabilitas yang rendah (15,1%). Masa inkubasi *Cmm* paling cepat 5 (hsi) terjadi pada sebagian genotipe tomat komersial dan genotipe PSPT/IPB sedangkan saat timbul gejala paling lama (9 hsi) terjadi pada sebagian genotipe tomat lokal, genotipe tomat komersial, dan genotipe tomat PSPT/IPB. Interval waktu antara inokulasi dengan layu total menunjukkan variabilitas yang tinggi (38,6%) paling cepat (11 hsi) pada genotipe Lyla dan SSH10, paling lambat lebih 60 hari umumnya pada genotipe tomat lokal. Tingkat kelayuan berbagai genotipe tomat menunjukkan variabilitas yang rendah (17,0%) terlihat dengan indeks serangan paling rendah pada genotipe tomat lokal dan indeks serangan paling tinggi pada genotipe tomat komersial dan genotipe tomat PSPT/IPB.

Terhadap 38 genotipe tomat yang diuji tidak ada yang tahan terhadap *Cmm*. Genotipe tomat lokal umumnya bereaksi agak tahan dan atau agak rentan, sebagian genotipe tomat lokal lebih dari 60 (hsi) baru memperlihatkan gejala daun layu sekitar 20% namun setelah itu tanaman mentolerir, beberapa dari genotipe ini memperlihatkan layu total sebelum 60 hari setelah inokulasi. Genotipe tomat komersial dan genotipe tomat koleksi PSPT/IPB bereaksi sangat rentan, rentan dan agak rentan (Tabel 13).

Gejala yang muncul akibat inokulasi *Cmm* pada berbagai genotipe tomat antara lain terjadinya layu daun, klorotik, nekrotik, kering pada bagian tepi daun, petiol daun kering dan kanker batang. Gejala layu dan klorotik dapat diikuti dengan gejala nekrotik atau daun kering dan atau kerdil. Semua tanaman tomat akhirnya menunjukkan gejala kanker batang dan beberapa tanaman akhirnya mati (Gambar 10). Gejala pada buah paling spesifik adalah *bird's eye spot* tapi belum ditemukan di percobaan ini, karena genotipe tomat yang rentan dan sangat rentan pertumbuhannya sangat terhambat terlihat gejala layu, dan semua daun mati atau mengering dan tidak sampai berbunga.



Gambar 9. Gejala penyakit kanker bakteri yang disebabkan *Cmm* pada tanaman tomat terinfeksi. (a) nekrotik pada batang, daun layu dan nekrotik terjadi pada genotipe Lyla akibat diinokulasi *Cmm* KDR-68 asal Kediri-Jawa Timur, (b) daun yang layu menggulung ke atas dan ke arah dalam, menjadi coklat dan mengering, tetapi tangkai daun tetap segar dan daunnya tidak gugur terjadi pada genotipe kosmonot akibat diinokulasi *Cmm* CJR-45, asal Cianjur-Jawa Barat), (c) gejala layu akan menjalar dari satu daun ke daun berikutnya, bahkan sampai seluruh daun dan menghancurkan seluruh daun terjadi pada genotipe Marta akibat diinokulasi *Cmm* SLK-11 asal Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat, (d) Gejala yang muncul terjadinya layu daun, klorotik, nekrotik, kering pada bagian tepi daun, petiol daun kering terjadi pada genotipe apel belgia indeterminate akibat diinokulasi *Cmm* R JL-74 asal Rejang Lebong-Bengkulu, (e) batang terbelah dan disklorosi rengkahan muncul pada goresan batang dan biasanya membentuk kanker terjadi pada genotipe permata akibat diinokulasi *Cmm* AGM-7 asal Agam-Sumatera Barat, (f) nekrotik pada batang, bercak dan layu pada helaian daun terbawah, terjadi pada genotipe apel belgia indeterminate akibat diinokulasi *Cmm* MLG-65 asal Malang-Jawa Timur.

Waktu pembungaan dari berbagai genotipe tomat yang telah diuji diduga dipengaruhi oleh infeksi *Cmm*. Genotipe tomat yang bereaksi sangat rentan dan rentan hampir semua daunnya telah layu sebelum pembungaan, sedangkan genotipe lokal yang bereaksi agak tahan dan agak rentan umur berbunganya rata-rata 39 (hsi) dan sampai menghasilkan buah, tetapi buah yang terbentuk tidak (belum) menunjukkan gejala *bird's eye spot*.

Tabel 13. Reaksi ketahanan 38 genotipe tomat akibat diinokulasi enam *Cmm*

| No | Genotipe                    | Asal      | Reaksi ketahanan terhadap <i>Cmm</i> |       |       |       |        |        |
|----|-----------------------------|-----------|--------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
|    |                             |           | SLK-11                               | AGM-7 | CJR45 | RJL74 | MLG-65 | KDR-68 |
| 1  | Ceri oval                   | Pasaman   | AR                                   | AR    | AT    | AR    | AT     | AT     |
| 2  | Ceri bulat                  | Pasaman   | AR                                   | AR    | AR    | AT    | AT     | AT     |
| 3  | Ceri berlekuk tidak beratur | Kerinci   | AR                                   | AR    | AT    | AR    | AT     | AT     |
| 4  | Ceri bulat kecil            | Kerinci   | AR                                   | AR    | AT    | AR    | AT     | AT     |
| 5  | Ceri bulat sedang           | Bengkulu  | AR                                   | AR    | AR    | AT    | AT     | AT     |
| 6  | Ceri rimbang paragi         | T. Datar  | AR                                   | AR    | AT    | AR    | AT     | AT     |
| 7  | Ceri bulat/rimbang          | Solok     | AR                                   | AR    | AR    | AT    | AT     | AT     |
| 8  | Sapira                      | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | SR    | SR     | R      |
| 9  | Dira                        | Komersial | SR                                   | SR    | R     | R     | R      | R      |
| 10 | Marta                       | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | R     | R      | R      |
| 11 | Cosmonot                    | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | R     | R      | R      |
| 12 | Brastagi                    | Komersial | R                                    | R     | AR    | AR    | AR     | AR     |
| 13 | Hawai                       | Komersial | SR                                   | SR    | R     | R     | AR     | AR     |
| 14 | Warani                      | Komersial | SR                                   | SR    | AR    | R     | AT     | AT     |
| 15 | Martabat                    | Komersial | R                                    | R     | AR    | AR    | AR     | AR     |
| 16 | Tamara                      | Komersial | SR                                   | SR    | AR    | AR    | AT     | AT     |
| 17 | Rizky                       | Komersial | R                                    | R     | AR    | AR    | AR     | AR     |
| 18 | Samina                      | Komersial | R                                    | R     | AT    | AR    | AT     | AT     |
| 19 | Natama                      | Komersial | R                                    | R     | AR    | AR    | AT     | AT     |
| 20 | Montera                     | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | R     | R      | R      |
| 21 | Permata                     | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | R     | R      | R      |
| 22 | Lyla                        | Komersial | SR                                   | SR    | SR    | SR    | SR     | SR     |
| 23 | SSH3                        | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | R     | SR     | SR     |
| 24 | SSH8                        | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | R     | R     | AR     | AT     |
| 25 | SSH9                        | PSPT/IPB  | R                                    | SR    | R     | AR    | AR     | AR     |
| 26 | SSH10                       | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | R     | SR     | R      |
| 27 | AVGV                        | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | R     | SR     | R      |
| 28 | Gondol Lembang              | PSPT/IPB  | AR                                   | SR    | AR    | AR    | AT     | AT     |
| 29 | Gondol Putih                | PSPT/IPB  | AR                                   | AR    | AR    | R     | AT     | AT     |
| 30 | Apel Belgia                 | PSPT/IPB  | AR                                   | AR    | AR    | R     | AR     | AR     |
| 31 | ABelgia Indeterminate       | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | SR    | SR     | SR     |
| 32 | Karibia buah besar          | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | AR    | R     | AR     | AR     |
| 33 | Karibia buah kecil          | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | SR    | R      | R      |
| 34 | Intan                       | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | SR    | R      | SR     |
| 35 | Mahkota                     | PSPT/IPB  | SR                                   | R     | AR    | R     | AR     | AT     |
| 36 | Ceri buah besar             | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | SR    | SR     | SR     |
| 37 | Pointed                     | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | AR    | R     | AR     | AR     |
| 38 | Caraibe                     | PSPT/IPB  | SR                                   | SR    | SR    | R     | R      | SR     |

Catatan: (T) tahan; (AT) agak tahan; (AR) agak rentan; (R) rentan; (SR) sangat rentan. CV (%) saat timbul gejala (15,1), interval waktu inokulasi dengan layu total (38,6), dan tingkat kelayuan (17,0).

Koefisien korelasi reaksi ketahanan dengan saat muncul gejala ( $r$ ) = -0,226\*\*, artinya nilai ketahanan rendah sangat nyata dengan saat muncul gejala. Nilai  $r$  negatif menunjukkan semakin tahan genotipe semakin lama saat muncul gejala serangan. Korelasi reaksi ketahanan dengan tingkat kelayuan berkaitan erat dan sangat nyata, dengan koefisien korelasi = 0,727\*\*. Artinya semakin tinggi indeks serangan *Cmm* semakin rentan tomat tersebut. Koefisien korelasi reaksi ketahanan dengan interval waktu inokulasi sampai layu total erat dan sangat nyata, yaitu  $r$  = -0,933\*\*. Genotipe tahan gejala layu terjadi lebih lama bahkan sama sekali tidak layu, genotipe tomat rentan gejala layu total sangat cepat bahkan kurang dari 35 hari setelah inokulasi.

Tabel 14. Koefisien korelasi antara peubah aktivitas peroksidase, reaksi ketahanan, interval inokulasi sampai layu total (hari), tingkat kelayuan, dan saat muncul gejala (hari).

|                                     | Inteval inokulasi sampai layu total | Tingkat kelayuan | Saat muncul gejala (hari) |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------|---------------------------|
| Peroksidase                         | -0,404 **                           | 0,302**          | -0,101                    |
| Reaksi Ketahanan                    | -0,933**                            | 0,727**          | -0,226**                  |
| Inteval inokulasi sampai layu total |                                     | -0,560**         | 0,244**                   |
| Tingkat Kelayuan                    |                                     |                  | -0,167                    |

Catatan: (\*) = nyata, (\*\*) = sangat nyata, ( $r$ ) didasarkan pengamatan variabel ketahanan 6 isolat *Cmm*

Variabilitas aktivitas peroksidase antar genotipe yang terserang *Cmm* tinggi yaitu 54,4%. Korelasi aktivitas peroksidase dengan interval waktu inokulasi sampai terjadi layu total (hari) dan tingkat kelayuan adalah sedang dan sangat nyata (Tabel 14), nilai koefisien korelasinya -0,404 \*\* dan 0,302\*\*. Korelasi positif aktivitas peroksidase dengan tingkat kelayuan, korelasi negatif interval inokulasi sampai layu total dengan peroksidase menunjukkan aktivitas enzim peroksidase cenderung berlawanan dengan reaksi ketahanan tomat terhadap *Cmm*.

## Pembahasan

Cara inokulasi melalui ketiak daun pada percobaan ini paling efektif untuk pengujian ketahanan tomat terhadap *Cmm*, karena melalui penyuntikan pada beberapa tempat di ketiak daun tanaman tomat, bakteri dapat langsung masuk ke jaringan *phloem*. Disamping itu dengan konsentrasi inokulum yang relatif rendah  $10^6$  CFU/ml sebanyak 5  $\mu$ l telah dapat menimbulkan gejala serangan berat pada tanaman, bila dibandingkan dengan konsentrasi inokulum yang lebih tinggi ( $10^8$  CFU/ml) lagi pula tanaman tomat hanya mengalami sedikit perlukaan pada tempat inokulasi. Metode inokulasi pada ketiak daun adalah yang terbaik untuk uji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat terhadap *Cmm* untuk percobaan ini. Inokulasi kontrol (air) tidak terlihat gejala, berarti gejala yang timbul pada tanaman uji hanya disebabkan oleh *Cmm*. Foster & Echandi (1973) menggunakan metode penusukan batang melalui kotiledon dengan "*dental root canal file*" yang direndam dalam inokulum bakteri dengan konsentrasi  $10^9$ . Mavridis (1982) menggunakan pemotongan tangkai daun dengan konsentrasi inokulum  $10^8$ , inokulasi melalui akar (Emmatty & John 1973), melalui batang (Forster & Echandi 1973), melalui pucuk diketiak daun dan daun (Kontaxis 1965). De Jong & Honma (1976) melaporkan penusukan pada batang sering menyebabkan patahnya tanaman yang diinokulasi sebelum munculnya lesio pada batang, sehingga menyebabkan sulitnya penilaian ketahanan.

Pengamatan terhadap gejala mempunyai arti penting terhadap penilaian akhir ketahanan tomat. Pengamatan dalam percobaan ini yang merupakan kriteria utama adalah interval waktu sejak inokulasi sampai tanaman layu total. Pengamatan ketahanan tomat berdasarkan tingkat kelayuan kurang meyakinkan, karena ada beberapa genotipe yang telah layu (indeks serangan 4) tiga minggu setelah inokulasi sedangkan genotipe yang lain sampai akhir pengamatan masih belum menunjukkan gejala yang khas. Pengamatan ketahanan tanaman berdasarkan munculnya gejala pertama bukan pula faktor penentu dalam penilaian ketahanan tomat terhadap *Cmm*, karena ada beberapa varietas yang menunjukkan gejala pertama lebih awal tetapi baru layu pada waktu pengamatan hampir berakhir, sebaliknya pada varietas yang lain gejalanya yang muncul lebih lambat tetapi tanaman layu dalam

waktu relatif singkat. Penilaian ketahanan tomat terhadap inokulasi *Cmm* adalah setiap unsur pengamatan dikalikan dengan faktor yang berbeda sebagai berikut; (a) interval waktu sejak inokulasi sampai saat tanaman layu total dikali dengan 6, (b) tingkat kelayuan dengan 3, (c) saat mulai timbulnya gejala pertama dengan 1.

Penelitian uji ketahanan tomat yang telah dilakukan para peneliti terdahulu biasanya hanya menggunakan satu kriteria ketahanan, tetapi dalam penelitian ini menjadi masalah. Metode penilaian ketahanan tomat terhadap *Cmm* juga sama halnya dengan yang dilakukan (Habazar *et al.* 1987, 1990). Elenkov (1962) menggunakan interval sejak inokulasi sampai munculnya gejala pertama sebagai kriteria penentu dalam pengujian ketahanan genotipe. Berry *et al.* (1989) menggunakan kriteria layunya pucuk pada ketiak daun, selanjutnya peneliti lain hanya menggunakan tingkat kelayuan sebagai kriteria ketahanan (Forster & Echandi 1973, Mavridis 1982). Ketahanan tomat terhadap *Cmm* di Indonesia belum banyak dilaporkan mengingat patogen ini masih baru dilaporkan.

Uji reaksi ketahanan berbagai genotipe tomat ini dengan menggunakan 6 *Cmm* dari hasil penelitian terdahulu, yang berarti pengujian ketahanan ini dilakukan sebanyak 6 seri percobaan. Berdasarkan kombinasi penilaian ketahanan yang berbeda, maka penelitian uji reaksi ketahanan 38 genotipe tomat yang terdiri dari genotipe tomat lokal (asal Pasaman-Sumatera Barat, Kerinci-Jambi, Rejang Lebong-Bengkulu), genotipe tomat komersial, dan genotipe koleksi PSPT IPB belum ada yang tahan terhadap inokulasi *Cmm*.

Genotipe tomat lokal seperti tomat-tomat ceri cenderung memperlihatkan reaksi agak tahan dan atau agak rentan akibat inokulasi *Cmm* dibandingkan dengan genotipe tomat koleksi PSPT IPB dan genotipe tomat komersial. Diduga genotipe tomat lokal ini toleran terhadap infeksi patogen *Cmm*, walaupun tanaman terinfeksi dengan bergejala daun layu hingga 20% tetapi pada tahap selanjutnya tanaman mentolerir gejala ini. Penghambatan ini terjadi diduga adanya sifat ketahanan atau toleran pada genotipe yang pada mulanya ketahanan tanaman masih rendah kemudian seiring dengan pertumbuhan akan terbentuk ketahanan pada genotipe ini. Ketahanan pada genotipe tersebut akan menghambat penyebaran bakteri lebih lanjut ke seluruh bagian tanaman (Francis *et al.* 2001). Genotipe tomat lokal yang diuji di penelitian ini hanya berasal dari

beberapa lokasi di Sumatera Barat, Jambi, dan Bengkulu. Diduga ada genotipe tomat lain di berbagai lokasi yang bisa dipelajari ketahanannya terhadap inokulasi *Cmm*, guna meningkatkan peluang menseleksi genotipe tomat tahan. Pendekatan lain yang mungkin dilakukan adalah dengan melakukan *backcross* berulang antar genotipe tomat lokal yang agak tahan dan atau agak rentan tersebut, sehingga menyebabkan terakumulasi alel dan lokus gen tahan pada satu genotipe turunan hasil *backcross* berulang, ini bisa dijadikan sumber gen ketahanan pada program pemuliaan tanaman dalam perakitan kultivar tomat unggul tahan kanker bakteri yang disebabkan *Cmm*.

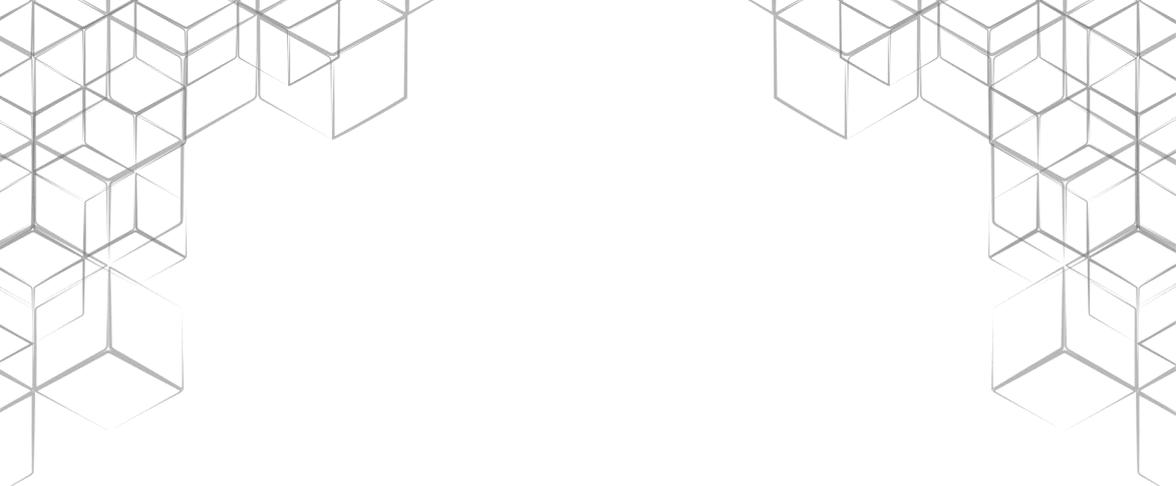
Aktivitas enzim peroksidase berhubungan dengan ketahanan dan dapat digunakan sebagai penanda seleksi ketahanan terhadap penyakit (Gupta *et al.* 1990). Cekaman suhu rendah pada gandum dan jagung (Peruanskii *et al.* 1991), cekaman hara pada kedelai (Leidi *et al.* 1989), cekaman polusi udara (Rao & Dubey 1990), cekaman suhu rendah pada apel (Wu & Zhang 1990), dan cekaman fisik ataupun fisiologis (Artlip & Funkhouser 1995) dapat meningkatkan aktivitas enzim peroksidase.

Aktivitas peroksidase hasil penelitian ini tidak berkorelasi dengan reaksi ketahanan tomat terhadap *Cmm*. Interaksi tanaman-patogen seperti interaksi genotipe tomat dengan *Cmm* adalah reaksi sistemik. Aktivitas peroksidase kemungkinan tidak berperan dalam mekanisme pertahanan tanaman. Herison *et al.* (2007) menyatakan aktivitas peroksidase tidak berperan dalam mekanisme pertahanan cabai merah dengan virus CMV yang menghasilkan reaksi sistemik. Aktivitas enzim peroksidase pada fase buah bibit juga tidak berperan dalam mekanisme ketahanan penyakit antraknosa pada buah cabai (Zen *et al.* 2002). Tanaman tahan penyakit cenderung memperlihatkan aktivitas peroksidase yang lebih tinggi dibandingkan tanaman rentan (Andreeva 1989; Gupta *et al.* 1990; Zhou *et al.* 1992; Yurina *et al.* 1993). Mekanisme pertahanan di sini melibatkan aktivitas peroksidase bekerja pada infeksi cendawan atau virus menghasilkan reaksi hipersensitif (Vance *et al.* 1980; Keppler & Novacky 1986; Keppler *et al.* 1989, Gupta *et al.* 1990; Hutchenson 1998).

## Simpulan

Simpulan dari penelitian ini adalah (i) inokulasi dengan menyuntikkan inokulum *Cmm* 5  $\mu$ l konsentrasi  $10^6$  cfu/ml pada beberapa tempat di ketiak daun (daun pertama, daun tengah dan pucuk) merupakan cara yang paling efektif mengevaluasi ketahanan tomat terhadap *Cmm*. (ii) Terhadap berbagai genotipe tomat yang diuji belum ada yang tahan terhadap *Cmm*, genotipe tomat lokal ada yang agak rentan dan agak tahan. (iii) Aktivitas peroksidase tidak berkorelasi dengan reaksi ketahanan genotipe tomat akibat inokulasi *Cmm*.





## **BAB VI**

Efektivitas Ekstrak Tumbuhan untuk  
Mengeliminasi *Clavibacter michiganensis*  
subsp. *michiganensis* Secara *In Vitro*

---

## Pengantar

Penelitian ini bertujuan mengevaluasi (1) pengaruh penghambatan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap *Clavibacter michiganensis* subsp, *michiganensis* (*Cmm*) secara *in vitro*, (2) pengaruh penghambatan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap infeksi *Cmm* pada benih tomat terinfeksi. Setelah dievaluasi terhadap 20 jenis minyak dan ekstrak tumbuhan; ekstrak rizoma temulawak, sirih hutan, minyak kulit kayu manis, dan minyak cengkeh dipilih untuk uji selanjutnya. Benih tomat diinokulasi secara buatan dengan *Cmm* untuk mendapatkan tingkat infeksi yang tinggi. Benih terinfeksi direndam masing-masing dalam suspensi ekstrak terpilih selama 20 menit. Eliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi dievaluasi 10 hari setelah perlakuan. Hasil percobaan menunjukkan bahwa; (1) Perlakuan dengan ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, minyak kulit kayu manis atau minyak cengkeh menunjukkan pengaruh penghambatan terhadap *Cmm* secara *in vitro*. (2) Perendaman benih tomat terinfeksi masing-masing dalam ekstrak rizoma temulawak 5%, minyak kulit kayu manis 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, atau minyak cengkeh 0,5% efektif mengeliminasi *Cmm*. Perlakuan benih ini berpotensi digunakan dan dikembangkan secara komersial untuk mengeliminasi *Cmm* pada benih tomat.

Aspek penting manajemen mutu benih yaitu manajemen kesehatan benih, diantaranya pencegahan infeksi atau kontaminasi benih selama proses produksi dan mengurangi infeksi atau kontaminasi pada lot benih berpenyakit. Proses pengadaan benih sayuran di Indonesia, langkah-langkah manajemen tersebut seharusnya melibatkan Badan Karantina Pertanian (BKP), Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura (BPSB TPH), dan produsen benih (Anwar *et al.* 2005).

Bakteri *Cmm* adalah agen penyakit kanker bakteri yang ditransmisikan melalui benih (*seed-transmitted patogen*) dan dapat menyebabkan kerugian serius pada pertanaman tomat (Basim *et al.* 2004). Evaluasi terhadap lot benih tomat komersial yang beredar sepanjang tahun 2000-2003 di Indonesia oleh Anwar *et al.* (2004a.b) menunjukkan bahwa beberapa lot benih telah tercemar bakteri *Cmm* penyebab penyakit kanker bakteri. Keberadaan *Cmm* di antara benih tomat komersial di Indonesia perlu mendapat perhatian serius

mengingat benih terkontaminasi merupakan inokulum primer penyebaran penyakit kanker bakteri. Penyebaran lebih luas patogen ini dapat dicegah antara lain dengan perlakuan benih untuk mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi.

Belakangan ini pendekatan pengendalian penyakit mulai bergeser meninggalkan fungisida yang berpotensi menimbulkan masalah kesehatan, untuk itu pemakaian fungisida untuk perlakuan benih perlu dikurangi agar tidak menimbulkan dampak negatif terhadap lingkungan. Sebagai contoh di Eropa fungisida berbasis merkuri dan *lindane* telah secara menyeluruh dilarang digunakan (Brandl 2001). Pemanfaatan ekstrak tumbuhan (*plant extracts*) seperti minyak atsiri sebagai pestisida untuk pengendalian penyakit telah semakin mendapat perhatian (Paul & Sharma 2002; Park *et al.* 2003; Pino *et al.* 2004; Bowers *et al.* 2004). Minyak dan tepung daun cengkeh, minyak sereh wangi, ekstrak mimba dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan patogen *Colletotrichum capsici* secara *in vitro* (Biswas *et al.* 2002; Asie 2004; Sutariati *et al.* 2005). Kandungan 2',6'-*dihydroxy-4'methoxychalcone* pada sirih hutan menghambat 98% parasit *Leishmania amazonensis* secara *in vitro* (Santos *et al.* 1999; Rali *et al.* 2007). Temulawak dengan bahan aktif *xanthorizol* memiliki aktivitas fungisida terhadap sejumlah *Candida sp.* (Rukayadi *et al.* 2006). Kulit kayu manis mengandung *cinnamaldehyde* sebagai anti fungi (*Saccharomyces cerevisiae*), antimikroba gram positif (*Staphylococcus albus*) dan gram negatif (*Eschericia coli*) (Friedmen *et al.* 2002; Maidment *et al.* 2006). Namun demikian, efektivitas daya hambat ekstrak tumbuhan terhadap berbagai bakteri patogen yang menyerang tanaman masih belum banyak dilaporkan.

Anwar *et al.* (2004b) telah mencoba mengeliminasi bakteri *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi secara buatan hingga 99% terbebas dari infeksi *Cmm* dengan 0,5 % minyak cengkeh tanpa menurunkan kualitas benih.

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi (1) daya hambat *in vitro* dari berbagai minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap *Cmm*, (2) daya hambat minyak dan ekstrak tumbuhan terpilih terhadap *Cmm* pada benih tomat terinfeksi secara buatan. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan formulasi perlakuan benih untuk menurunkan kemungkinan penyebaran *Cmm* lewat benih tomat.

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian dan Kimia Bahan Alam FMIPA Universitas Andalas Padang dari bulan Juli hingga November 2008.

### **Minyak dan Ekstrak Tumbuhan sebagai Bakterisida Nabati**

Jenis minyak dan ekstrak tumbuhan yang digunakan adalah: minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*), sereh wangi (*Cymbopogon nardus*), kulit kayu manis (*Cinnamomum burmannii*); ekstrak daun kunyit (*Curcuma longa*), kencur (*Kaempferia galanga*), mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), surian (*Toona sureni*), beringin sungsang (*Ficus deltoidea*), pluchea (*Pluchea indica*), sirih hutan (*Piper aduncum*), gambir (*Uncaria gambier*), rutin (*Manihot utilisima*), bunga pahit (*Thitonia diversifolia*), sirih (*Piper betel*), daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*); ekstrak biji pala (*Myristica fragrans*), ekstrak rizoma temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), ekstrak umbi bawang putih (*Alium sativum*), serta ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*). Minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut diperoleh dari Lab. Kimia Bahan Alam FMIPA Universitas Andalas. Pemberian antibiotika *kloramfenikol* digunakan sebagai pembanding.

### **Benih Tomat Terinfeksi Buatan**

Bahan tanaman yang digunakan adalah benih tomat cv. Marta nomor lot 6107516024. Benih tomat terinfeksi *Cmm* secara alami tidak tersedia, maka lot benih tomat terinfeksi berat oleh *Cmm* didapatkan dengan perlakuan inokulasi buatan (*artificial inoculation*). Inokulasi buatan dilakukan dengan merendam benih tomat di dalam suspensi *Cmm* SLK-11 (diisolasi dari buah tomat bergejala *bird's eye spot*) berasal dari Danau Kembar, Solok (Zainal *et al.* 2008) dengan konsentrasi  $3 \times 10^8$  cfu/ml dan dikocok di atas *shaker* dengan kecepatan 300 rpm selama 30 menit. Benih yang telah diinokulasi dikeringkan dengan tiupan udara hangat, berasal dari pengering rambut (*hair drier*) yang diatur pada suhu sekitar 36°C, selama 45 menit kecepatan angin sekitar 40 km/jam. Jarak antara pengering rambut dengan benih diatur sekitar 20 cm. Pengeringan benih dilakukan sehingga kadar air benih setelah perlakuan mendekati kadar air benih awal sebelum perlakuan. Benih disimpan dalam wadah plastik kedap udara selama satu minggu sebelum digunakan dalam percobaan berikutnya.

## **Penentuan Lokasi *Cmm* pada Benih Hasil Inokulasi Buatan**

Benih hasil inokulasi buatan dengan *Cmm* disimpan pada suhu ruang selama satu minggu untuk memberi kesempatan bakteri berkembang dan memperbanyak diri pada benihnya. Evaluasi lokasi keberadaan *Cmm* pada benih tomat yaitu 6 g benih yang telah terinfeksi *Cmm* dibilas tiga kali dengan air steril, air bilasan yang terakhir ditumbuhkan pada medium SCM, dan jumlah koloni yang tumbuh dihitung serta digunakan sebagai data awal tingkat infeksi.

Enam gram benih yang lain disterilisasi dengan perendaman NaClO 2% selama 10 menit, dicuci dua kali untuk menghilangkan sterilan, dan dibilas tiga kali dengan akudes steril. Air bilasan yang terakhir ditumbuhkan pada medium SCM untuk mendeteksi keberadaan *Cmm* dalam air bilasan. Benih tomat steril selanjutnya diekstraksi dengan *seed grinder* dan hasil ekstraksi ditumbuhkan pada medium SCM dengan pengenceran 100 kali (*agar dilution plating*) untuk menghitung tingkat kontaminasi setelah sterilisasi. Penentuan lokasi keberadaan *Cmm* pada benih tomat yang diinokulasi secara buatan ditentukan berdasarkan nilai tingkat kontaminasi awal, pada air bilasan setelah sterilisasi, dan pada ekstrak benih setelah sterilisasi.

## **Skrining Daya Hambat berbagai Jenis Minyak dan Ekstrak Tumbuhan terhadap *Cmm* Secara *in Vitro***

Skrining anti mikroba dari 20 jenis minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap enam bakteri *Cmm* dari berbagai lokasi di Sumatera dan Jawa; RJL-74 (Rejang Lebong-Bengkulu), AGM-7 (Agam-Sumatera Barat), SLK-11 (asal Danau Kembar, Solok-Sumatera Barat), CJR-45 (Cianjur-Jawa Barat), MLG-65 (Malang-Jawa Timur), dan KDR-68 (Kediri-Jawa Timur) (Zainal *et al.* 2008) dilakukan melalui skrining awal. Minyak dan ekstrak tumbuhan yang menunjukkan daya hambat terhadap *Cmm* dalam uji *in vitro* dipilih untuk diterapkan dalam pengujian menggunakan benih terinfeksi. Penentuan konsentrasi minyak dan ekstrak tumbuhan yang efektif sebagai anti mikroba dilakukan melalui uji konsentrasi hambat minimal (*minimum inactivation concentration (MIC)*). Uji skrining awal dan penentuan konsentrasi tersebut dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode difusi agar (Schaad *et al.* 2001) memakai

kertas *Whatman* No 3 berdiameter 0,5 cm.

Metode difusi agar dilakukan dengan cara sebagai berikut; stok minyak dan ekstrak tumbuhan (konsentrasi 1%) dibuat dengan melarutkan minyak dan ekstrak 1 ml dalam DMSO 2,5 ml dan disuspensikan dalam air. Stok minyak dan ekstrak tumbuhan dipipet sebanyak 10  $\mu$ l dan diteteskan pada kertas *Wathman* No 3 berdiameter 0,5 cm. *Kloramfenikol* (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) sebanyak 10  $\mu$ l diteteskan pada kertas yang sama dan digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan larutan DMSO (2,5%) 10  $\mu$ l diteteskan pada kertas yang sama tanpa minyak dan ekstrak tumbuhan digunakan sebagai kontrol negatif. Ke dalam medium NA bersuhu 45 °C ditambahkan 100  $\mu$ l suspensi *Cmm* (OD 0,25 pada  $\lambda$  580 nm), disuspensikan dengan putaran teratur sehingga merata. Campuran bakteri dan medium dituangkan ke dalam cawan petri ( $\varnothing$  9 cm) sejumlah 10 ml dan dibiarkan menjadi padat. Kertas *Wathman* yang sudah diberi minyak dan ekstrak tumbuhan, kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan pada permukaan campuran bakteri dan medium dan diinkubasikan selama 24-48 jam dalam ruang inkubasi bersuhu 26-28 °C dan diamati terbentuknya halo (transparan) di sekitar kertas yang mengandung ekstrak uji. Pengukuran diameter daerah halo dilakukan dengan menggunakan jangka sorong.

Penentuan konsentrasi hambat minimal dari minyak kulit kayu manis, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh dari hasil skrining awal menggunakan metode difusi agar (Schaad *et al.* 2001) memakai kertas *Whatman* No. 3 berdiameter 0,5 cm secara *in vitro* dengan mikroba uji *Cmm* SLK-11 (Zainal *et al.* 2008).

Metode difusi agar dilakukan dengan cara sebagai berikut; stok masing-masing minyak kulit kayu manis, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh dengan konsentrasi (0,25%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, dan 10%) dibuat dengan melarutkan minyak dan ekstrak tersebut dalam DMSO 2,5 ml dan disuspensikan dalam air. Stok minyak dan ekstrak tumbuhan dengan berbagai konsentrasi tersebut dipipet masing-masing sebanyak 10  $\mu$ l dan diteteskan pada kertas *Wathman* No.3 berdiameter 0,5 cm. *Kloramfenikol* (3  $\mu$ g/ $\mu$ l) sebanyak 10  $\mu$ l diteteskan pada kertas yang sama dan digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan larutan DMSO (2,5%) 10  $\mu$ l diteteskan pada kertas yang sama tanpa minyak dan ekstrak tumbuhan digunakan sebagai kontrol negatif, masing-

masing perlakuan diulang tiga kali. Ke dalam medium NA bersuhu 45 °C ditambahkan 100 µl suspensi *Cmm* (OD 0,25 pada λ 580 nm), disuspensikan dengan putaran teratur sehingga merata. Campuran bakteri dan medium dituangkan ke dalam cawan petri (Ø 9 cm) sejumlah 10 ml dan dibiarkan menjadi padat. Kertas *Wathman* yang sudah diberi minyak dan ekstrak tumbuhan pada berbagai konsentrasi, kontrol positif, dan kontrol negatif diletakkan pada permukaan campuran bakteri dan medium dan diinkubasikan selama 24-48 jam dalam ruang inkubasi bersuhu 26-28 °C dan diamati terbentuknya halo (transparan) di sekitar kertas yang mengandung ekstrak uji. Pengukuran diameter daerah halo dilakukan dengan menggunakan jangka sorong.

### **Uji Daya Hambat Minyak dan Ekstrak Tumbuhan terhadap *Cmm* pada Benih Terinfeksi**

Minyak dan ekstrak tumbuhan yang efektif dari hasil uji *in vitro* yaitu minyak kulit kayu manis, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh kemudian diuji daya hambatnya terhadap *Cmm* pada benih tomat terinfeksi. Uji masing-masing minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut disusun dengan rancangan lingkungan acak lengkap (RAL), unit percobaan terdiri atas satu cawan petri dan masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Benih tomat terinfeksi *Cmm* SLK-11 (6 g) direndam dalam suspensi minyak kulit kayu manis dan air dengan konsentrasi 0%, 1%, 2,5%, 5%, atau 10% selama 20 menit; ekstrak rizoma temulawak dan air dengan konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2,5%, 5%, atau 10% selama 20 menit; ekstrak daun sirih hutan dan air dengan konsentrasi 0%, 1%, 2,5%, 5%, atau 10% selama 20 menit; dan minyak cengkeh dan air dengan konsentrasi 0%, 0,25%, 0,5%, 1%, atau 1,5% selama 20 menit. Suspensi minyak dan ekstrak tumbuhan dengan berbagai konsentrasi dibuat dengan melarutkan minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut dalam DMSO 2,5 ml dan disuspensikan dalam air.

Setelah perendaman dalam minyak dan ekstrak tumbuhan, benih dibilas satu kali dengan akuades steril dan diekstraksi dalam 50 ml *Phosphate Buffer Tween* (PBT) menggunakan *seed grinder*. Ekstrak yang didapatkan diencerkan hingga 100 kali, selanjutnya ekstrak benih yang telah diencerkan (0,5 ml) ditumbuhkan dalam

media SCM dalam ruang bersuhu 26-28 °C. Jumlah koloni *Cmm* dan bakteri saprofit lainnya yang tumbuh dalam media SCM dihitung pada 10 hari setelah *dilution plating*.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. Kondisi suhu dan kelembaban (RH) di dalam laboratorium terkontrol (27 °C dan 80%).

### Lokasi *Cmm* pada Benih Hasil Inokulasi Buatan

Berdasarkan jumlah koloni yang tumbuh pada medium SCM dapat diketahui ekstrak benih hasil inokulasi buatan terinfeksi *Cmm* dengan konsentrasi  $368,3 \times 10^2$  *cfu/ml*. Setelah sterilisasi dan beberapa tahapan pembilasan, air bilasan terakhir yang ditumbuhkan pada medium SCM tidak mengandung bakteri *Cmm* karena tidak ada koloni *Cmm* yang tumbuh dan berkembang pada medium uji (Tabel 15).

Hasil evaluasi pada medium SCM untuk ekstrak benih tomat hasil inokulasi buatan setelah tahapan sterilisasi mengindikasikan tingkat infeksi *Cmm* dengan konsentrasi  $0,7 \times 10^2$  *cfu/ml*. Sebelum dan sesudah inokulasi buatan, benih tomat juga terinfeksi oleh bakteri saprofit selain *Cmm* dengan tingkat infeksi antara  $0,2 \times 10^2$  hingga  $0,3 \times 10^2$  *cfu/ml*. Benih yang digunakan juga terinfeksi oleh cendawan, tetapi tingkat infeksi tidak ditentukan (Tabel 15).

Tabel 15. Lokasi *Cmm* SLK-11 pada benih tomat cv. Marta hasil perlakuan inokulasi buatan.

| Kondisi benih tomat               | Tingkat infeksi terjadi pada ( <i>cfu/ml</i> ) |                       |          |
|-----------------------------------|--|-----------------------|----------|
|                                   | <i>Cmm</i>                                     | Bakteri saprofit lain | Cendawan |
| <b>Sebelum inokulasi buatan :</b> |  |                       |          |
| • Air bilasan benih               | 0  | $0,2 \times 10^2$     | +        |
| • Ekstrak benih                   | 0  | $0,3 \times 10^2$     | +        |
| <b>Setelah inokulasi buatan :</b> |  |                       |          |
| (a) Tanpa sterilisasi             |  |                       |          |
| • Air bilasan benih               | TD   | TD                    | TD       |
| • Ekstrak benih                   | $368,3 \times 10^2$                            | $0,3 \times 10^2$     | +        |
| (b) Dengan sterilisasi            |  |                       |          |
| • Air bilasan benih               | 0  | $0,2 \times 10^2$     | -        |
| • Ekstrak benih                   | $0,7 \times 10^2$                              | $0,2 \times 10^2$     | -        |

TD : tidak ditentukan. (+) ada koloni cendawan, (-) tidak ada koloni cendawan yang tumbuh pada médium SCM (médium semi-selektif untuk menumbuhkan bakteri).

### **Skринing Daya Hambat berbagai Jenis Minyak dan Ekstrak Tumbuhan terhadap *Cmm* Secara *in Vitro***

Koloni enam bakteri *Cmm* yang diuji mampu tumbuh dengan baik pada medium NA tanpa penambahan minyak dan ekstrak tumbuhan, yang mengindikasikan bakteri dalam kondisi viabel. Dua puluh jenis minyak dan ekstrak tumbuhan yang diuji yang menunjukkan daya hambat cukup tinggi terhadap *Cmm* adalah ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh (Tabel 16). Larutan DMSO (kontrol negatif) tidak menghambat *Cmm* sehingga daya hambat terhadap *Cmm* yang diamati betul-betul sebagai akibat perlakuan minyak dan ekstrak tumbuhan.

Konsentrasi minyak dan ekstrak tumbuhan yang efektif berdasarkan uji konsentrasi hambat minimal secara *in vitro* untuk ekstrak rizoma temulawak 0,25%, minyak kulit kayu manis 1%, ekstrak daun sirih hutan 1%, dan minyak cengkeh 0,25% (Tabel 17, Gambar 11). Konsentrasi hambat minimal minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap mikroba uji terlihat dengan terbentuknya daerah bening pada minyak dan ekstrak tumbuhan yang diuji. Empat jenis minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut ditetapkan untuk percobaan mengeliminasi *Cmm* yang menginfeksi benih tomat dan untuk perlakuan benih pada percobaan berikutnya.

Tabel 16. Skrining daya hambat dari 20 jenis minyak dan ekstrak tumbuhan pada konsentrasi 1% terhadap enam *Cmm* secara *in vitro* dengan metode difusi agar.

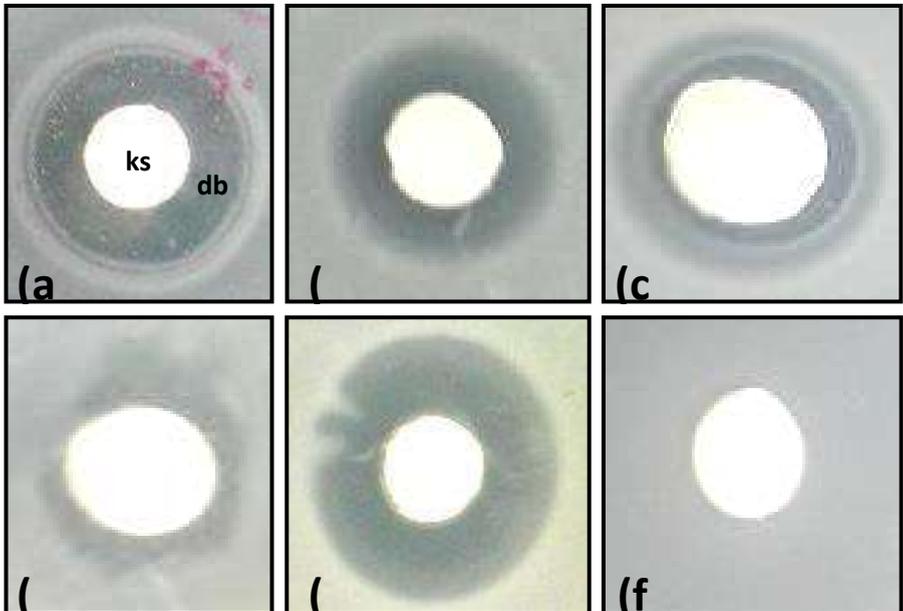
| Jenis tanaman           |                              | Metode ekstraksi | Diameter daerah bening (mm) penghambatan pertumbuhan koloni <i>Cmm</i> |          |         |         |         |         |
|-------------------------|------------------------------|------------------|--|----------|---------|---------|---------|---------|
| Nama Daerah             | Nama Latin                   |                  | MLG - 65   | KDR - 68 | RJL- 74 | SLK- 11 | CJR- 45 | AGM - 7 |
| Cengkeh                 | <i>Syzygium aromaticum</i>   | Fr. Heksan       | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Kunyit                  | <i>Curcuma longa</i>         | Fr. Heksan       | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Kencur                  | <i>Kaempferia galanga</i>    | Fr. Heksan       | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Pala                    | <i>Myristica fragrans</i>    | Fr. Heksan       | -  | -        | -       | -       | -       | 12,0    |
| Kulit Manis             | <i>Cinnamomum burmannii</i>  | Minyak           | 7,2  | 7,3      | 7,7     | 9,2     | 7,5     | 9,2     |
|                         | <i>Curcuma xanthorrhiza</i>  | Fr. Heksan       | 8,2  | 8,2      | 9,5     | 9,3     | 10,3    | 8,5     |
| Mimba                   | <i>Azadirachta indica</i>    | MeOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Surian                  | <i>Toona sureni</i>          | MeOH             | -  | -        | -       | 7,8     | -       | -       |
| Baringin sungsang       | <i>Ficus deltoidea</i>       | MeOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Pluchea                 | <i>Pluchea indica</i>        | MeOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Sirih hutan             | <i>Piper aduncum</i>         | MeOH             | 7,3  | -        | 8,0     | 7,8     | 8,7     | 8,2     |
| Gambir                  | <i>Uncaria gambier</i>       | Air              | -  | -        | -       | 10,7    | -       | -       |
| Bawang putih            | <i>Alium sativum</i>         | EtOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Rutin                   | <i>Manihot utilisima</i>     | MeOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Bungo paik              | <i>Thitonia diversifolia</i> | MeOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Sirih                   | <i>Piper betle</i>           | MeOH             | -  | -        | -       | 7,5     | -       | -       |
| Daun Mahkota Dewa       | <i>Phaleria macrocarpa</i>   | EtOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Buah Mahkota Dewa       | <i>Phaleria macrocarpa</i>   | EtOH             | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Sereh wangi             | <i>Cymbopogon nardus</i>     | Minyak           | -  | -        | -       | -       | -       | -       |
| Cengkeh                 | <i>Syzygium aromaticum</i>   | Minyak           | 8,3  | 12,3     | 9,5     | 8,0     | 9,0     | 8,5     |
| Kloramfenikol (3 ug/ul) | -                            | -                | 17,3   | 16,2     | 19,5    | 19,7    | 17,3    | 18,3    |

Catatan: isolat MLG-65 dari Pujon, Malang; KDR-68 dari Matus, Kediri; RJI-74 dari Rejang Lebong, Bengkulu; SLK 11 dari Danau Kembar, Solok; CJR-45 dari Cianjur, Cipanas; dan AGM-7 dari Agam, Banuhampu. Perlakuan DMSO tidak berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan koloni semua isolat *Cmm*.

Tabel 17. Penentuan konsentrasi daya hambat minimal dari minyak dan ekstrak tumbuhan sebagai anti mikroba *Cmm* SLK-11 secara *in vitro* dengan menggunakan metode difusi agar.

| Konsentrasi perlakuan   | Diameter daerah bening (mm) akibat perlakuan ekstrak tumbuhan |                  |             |                |
|-------------------------|---|------------------|-------------|----------------|
|                         | Temulawak   | Kulit kayu manis | Sirih hutan | Minyak cengkeh |
| 10,0%                   | 12,7  | 17,5             | 15,2        | 12,8           |
| 5,0%                    | 11,7  | 12,2             | 13,2        | 12,2           |
| 2,5%                    | 11,5  | 8,7              | 10,5        | 11,5           |
| 1,0%                    | 11,2  | 7,0              | 7,8         | 11,3           |
| 0,5%                    | 9,8   | 0,0              | 0,0         | 10,0           |
| 0,25%                   | 8,7   | 0,0              | 0,0         | 9,0            |
| DMSO (2,5%)             | 0,0   | 0,0              | 0,0         | 0,0            |
| Kloramfenikol (3 ug/ul) | 20,3  | 22,3             | 22,3        | 21,5           |

Angka pada kolom adalah rata-rata pengukuran diameter daerah bening (*halo*) dari aktivitas ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh terhadap *Cmm* SLK-11.



Gambar 10. Hasil uji aktivitas anti mikroba didasarkan terbentuknya daerah bening (halo) dengan metode difusi agar. Bidang hambatan pada perlakuan (a) ekstrak rizoma temulawak 5% terhadap *Cmm* RJL-74, (b) minyak kulit kayu manis 2,5% terhadap *Cmm* SLK-11, (c) minyak cengkeh 0,5% terhadap *Cmm* CJR-45, (d) ekstrak daun sirih hutan 1% terhadap *Cmm* AGM-7, (e) Kloramfenikol 30  $\mu\text{g}/10\ \mu\text{l}$  terhadap *Cmm* MLG-65 ( $\text{K}^+$ ), dan (f) DMSO 2,5% terhadap *Cmm* KDR-68 ( $\text{K}^-$ ) tidak terbentuk bidang hambatan. ks : kertas saring dengan penambahan minyak dan ekstrak tumbuhan. db: daerah bening, bidang penghambatan pertumbuhan koloni *Cmm* oleh minyak dan ekstrak tumbuhan.

### Daya Hambat Minyak dan Ekstrak Tumbuhan terhadap *Cmm* pada Benih Terinfeksi

Hasil uji daya hambat minyak dan ekstrak tumbuhan yang paling efektif terhadap *Cmm* pada benih tomat terinfeksi adalah ekstrak rizoma temulawak konsentrasi 5%, minyak kulit manis konsentrasi 5%, ekstrak daun sirih hutan konsentrasi 5%, dan minyak cengkeh konsentrasi 0,5%. Hasil percobaan yang dilakukan juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan penurunan jumlah populasi bakteri saprofit lain yang ada pada benih tomat bersama-sama *Cmm*, kecuali untuk perlakuan minyak cengkeh (Tabel 18).

Tabel 18. Daya hambat minyak dan ekstrak tumbuhan terpilih terhadap jumlah koloni *Cmm* SLK-11 dan bakteri saprofit lainnya pada lot benih tomat terinfeksi.

| Kon-sentrasi (%) | Ekstrak rizoma temulawak |                    | Minyak kayu kulit manis |                   | Ekstrak daun sirih hutan |                   | Minyak cengkeh      |                   |
|------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
|                  | Σ koloni <i>Cmm</i> *    | Σ koloni saprofit* | Σ koloni <i>Cmm</i>     | Σ koloni saprofit | Σ koloni <i>Cmm</i>      | Σ koloni saprofit | Σ koloni <i>Cmm</i> | Σ koloni saprofit |
| 0                | 391,7 a                  | 4,3 a              | 375,0 a                 | 4,7 a             | 368,3 a                  | 4,3 a             | 371,7 a             | 4,3 a             |
| 0,25             | 20,3 b                   | 4,0 a              | TD                      | TD                | TD                       | TD                | 15,0 b              | 4,0 a             |
| 0,5              | 16,0 bc                  | 4,0 a              | TD                      | TD                | TD                       | TD                | 4,0 c               | 1,0 b             |
| 1,0              | 12,0 bc                  | 2,3 a              | 24,3 b                  | 4,3 a             | 19,7 b                   | 4,0 a             | 4,0 c               | 1,0 b             |
| 1,5              | TD                       | TD                 | TD                      | TD                | TD                       | TD                | 4,0 c               | 0,0 b             |
| 2,5              | 8,0 c                    | 2,0 a              | 8,0 c                   | 4,3 a             | 14,3 c                   | 4,0 a             | TD                  | TD                |
| 5,0              | 4,0 c                    | 2,0 a              | 3,7 d                   | 2,3 a             | 5,0 d                    | 2,7 a             | TD                  | TD                |
| 10,0             | 4,0 c                    | 2,0 a              | 3,7 d                   | 2,0 a             | 5,0 d                    | 1,0 a             | TD                  | TD                |

Catatan: \* ( $\times 10^2$  cfu/ml). Data pada kolom dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%. TD : tidak diamati.

## Pembahasan

Bakteri *Cmm* adalah *seedborne* patogen, salah satu upaya yang paling efektif untuk pengendalian penyakit akibat infeksi *Cmm* adalah dengan mengeliminasi *Cmm* dari benih. Ekstrak tumbuhan seperti minyak atsiri yang efektif dapat digunakan untuk tujuan tersebut. Ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh terbukti dapat menghambat pertumbuhan koloni *Cmm* secara *in vitro*.

Minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut juga mampu mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi secara buatan pada tingkat infeksi sebesar  $368,3 \times 10^2$  cfu/ml. Eliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi tersebut berhasil dilakukan hingga 99%. Berdasarkan data tingkat eliminasi tersebut maka diduga perlakuan benih dengan minyak dan ekstrak tumbuhan akan efektif untuk diterapkan secara komersial untuk mengeliminasi *Cmm* dari lot benih komersial.

Pengamatan yang dilakukan dalam percobaan sebelumnya, lot benih tomat komersial dari Indonesia yang terinfeksi *Cmm* secara alami mempunyai tingkat infeksi  $0,1 \times 10^2$  hingga  $1,25 \times 10^2$  cfu/ml (Anwar *et al.* 2004a). Tingkat infeksi ini jauh lebih rendah dari tingkat infeksi benih tomat yang diinokulasi buatan sehingga

eliminasi total *Cmm* diharapkan dapat terjadi. Sebelum digunakan secara komersial perlu dievaluasi ada tidaknya pengaruh negatif minyak dan ekstrak tumbuhan yang diuji terhadap perkecambahan benihnya. Adanya pengaruh negatif minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap perkecambahan benih dapat menghilangkan kegunaan minyak dan ekstrak tumbuhan untuk tujuan perlakuan benih secara komersial.

Bakteri *Cmm* diketahui dapat berada di permukaan benih dan di bagian dalam kulit benih yang dipanen dari tanaman tomat terinfeksi penyakit kanker bakteri di lapangan. Perlakuan inokulasi buatan pada benih tomat cv. Marta mampu mensimulasikan kondisi tersebut karena pada benih tomat hasil infeksi buatan berhasil dibuktikan bahwa *Cmm* tidak hanya dijumpai di permukaan benih tetapi juga di bagian dalam benih yang tidak terjangkau oleh perlakuan sterilisasi. Penetrasi *Cmm* ke bagian dalam benih tomat inokulasi buatan diduga masuk melalui hilum dan mikropil benih, karena permeabilitas kulit benih yang tertinggi berada pada kedua bagian tersebut (Anwar *et al.* 2004a).

Senyawa eugenol yang terkandung pada minyak cengkeh merupakan anti-mikroba dengan spektrum yang luas (Nurdin *et al.* 2001; Friedman *et al.* 2002; Maidment *et al.* 2006) dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif maupun gram negatif (Arora & Keur 1999; Dorman & Deans 2001; Burt 2004). Minyak cengkeh 0,25% telah menunjukkan daya hambat terhadap *Cmm* secara *in vitro* dengan metoda difusi agar, tetapi untuk eliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu 0,5%.

Ekstrak daun sirih hutan, ekstrak rizoma temulawak, dan minyak kulit kayu manis kurang efektif untuk mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat terinfeksi dibandingkan dengan minyak cengkeh. Diperlukan konsentrasi lebih tinggi dari ekstrak daun sirih hutan, ekstrak rizoma temulawak, dan minyak kulit manis untuk mencapai tingkat penghambatan yang sama dengan minyak cengkeh. Konsentrasi yang lebih tinggi menuntut penyediaan minyak dan ekstrak tumbuhan yang lebih banyak, hal ini tidak diinginkan jika dikembangkan secara komersial. Penggunaan konsentrasi minyak dan ekstrak tumbuhan yang lebih tinggi dapat berpengaruh negatif terhadap perkecambahan benih. Efektivitas minyak dan ekstrak tumbuhan diduga dapat ditingkatkan dengan meningkatkan

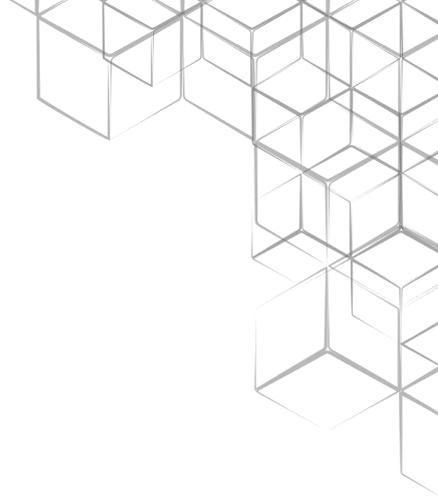
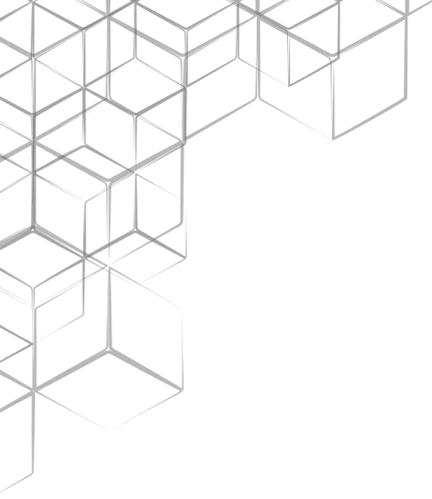
konsentrasi bahan aktifnya, misalnya dengan memakai ekstrak hasil penyulingan.

Perbedaan daya hambat antara minyak cengkeh dengan ekstrak daun sirih hutan, ekstrak rizoma temulawak, atau minyak kulit kayu manis diduga akibat adanya perbedaan efektivitas antara bahan aktif eugenol pada minyak cengkeh, *2',6'-dihydroxy-4'methoxychalcone* pada sirih hutan, *xanthorizol* pada temulawak, dan *cinnamaldehyde* pada kulit manis. Eugenol mempunyai efektivitas paling tinggi dibanding dengan bahan aktif lainnya untuk mengeliminasi keberadaan *Cmm* secara *in vitro*.

## **Simpulan**

Simpulan dari penelitian ini adalah; (1) Ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, atau minyak cengkeh mampu menghambat pertumbuhan *Cmm* secara *in vitro*. (2) Penghambatan pertumbuhan *Cmm* pada benih tomat terinfeksi diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5% dan minyak cengkeh 0,5%. Perlakuan ini berpotensi dikembangkan secara komersial untuk mengeliminasi *Cmm* pada benih tomat terinfeksi.





## **BAB VII**

Efektivitas Perlakuan Benih Dengan  
Ekstrak Tumbuhan Untuk Mengeliminasi  
*Cmm* dan Perbaikan Mutu Fisiologis Benih  
Tomat Terinfeksi

---

## Pengantar

Penelitian ini bertujuan, (1) mengevaluasi efektivitas berbagai perlakuan benih untuk mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi. (2) Mengevaluasi daya berkecambah, kecepatan tumbuh, indeks vigor, atau waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total pemunculan kecambah ( $T_{50}$ ) benih tomat terinfeksi *Cmm* akibat perlakuan benih dengan ekstrak tumbuhan untuk mengeliminasi *Cmm*. Ekstrak yang diuji adalah ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, minyak kulit kayu manis, dan minyak cengkeh. Benih tomat terinfeksi buatan *Cmm* direndam masing-masing dalam suspensi ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5%, minyak cengkeh 0,5% selama 20 menit, dan benih terinfeksi diperlakukan *matriconditioning* menggunakan bubuk arang sekam plus masing-masing dalam minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut. Eliminasi *Cmm* dari benih dievaluasi 10 hari setelah perlakuan, dan mutu fisiologis benih di evaluasi sebelum dan setelah perlakuan benih. Hasil percobaan menunjukkan, (1) perlakuan eliminasi *Cmm* pada benih dengan ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5%, dan minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* menurunkan tingkat infeksi *Cmm* lebih dari 99%. (2) Eliminasi *Cmm* pada benih tomat terinfeksi menggunakan minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut tidak menurunkan daya berkecambah, kecepatan tumbuh, indeks vigor, atau waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total pemunculan kecambah ( $T_{50}$ ) benih kecuali perlakuan dengan minyak kulit kayu manis 5% dengan atau tanpa *matriconditioning*. Kajian efektivitas perlakuan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap benih yang akan disimpan dalam jangka waktu tertentu sangat diperlukan.

Pengendalian penyakit pada pertanaman dapat dilakukan mulai dari persiapan benih yaitu mengendalikan patogen terbawa benih. Patogen terbawa benih akan berdampak aborsi pada benih, penurunan daya berkecambah, peningkatan kematian bibit atau tanaman muda, peningkatan perkembangan penyakit di lapangan, dan peluang terjadinya ledakan penyakit di daerah baru, serta toksik yang dihasilkan patogen mengubah nutrisi benih. Patogen *Cmm* terbawa benih yang ditemukan pada benih tomat komersial di Indonesia perlu pengendalian sedini mungkin, guna mengatasi

serangan penyakit di lapangan.

Pengendalian patogen terbawa benih dapat dilakukan antara lain dengan perlakuan benih menggunakan ekstrak tumbuhan (pestisida nabati). Perlakuan menggunakan minyak cengkeh konsentrasi 0,5% mampu mengeliminasi bakteri *Cmm* pada lot benih tomat yang terinfeksi secara buatan hingga 99% tanpa menurunkan kualitas benih (Anwar *et al.* 2004b). Efektivitas perlakuan benih dengan minyak dan ekstrak tumbuhan untuk mengeliminasi *Cmm* tanpa menurunkan kualitas benih tomat belum banyak dilaporkan. Belakangan banyak dikembangkan teknik pengendalian patogen terbawa benih secara biologi (Vasudevan *et al.* 2002) dan atau bahan nabati (*plant extracts*) seperti minyak atsiri (Park *et al.* 2003; Pino *et al.* 2004; Bowers *et al.* 2004).

Pengendalian patogen terbawa benih hendaknya juga dikombinasikan dengan peningkatan mutu fisiologis benih. Umumnya benih yang terserang patogen akan mengalami kemunduran mutu yang lebih cepat. Peningkatan mutu fisiologis dapat dilakukan dengan cara invigorasi. Invigorasi adalah proses peningkatan vigor benih secara buatan melalui proses metabolisme terkendali yang dapat memperbaiki kerusakan subseluler dalam benih. Salah satu perlakuan invigorasi benih adalah *matriconditioning*.

Perlakuan benih seperti *matriconditioning*, *coating*, atau *pelleting* telah digunakan untuk meningkatkan perkecambahan atau melindungi benih dari infeksi patogen (Ilyas 2006). *Matriconditioning* memakai media karbon aktif dengan nisbah 1:2:1 pada suhu 22 °C selama 3 hari, dengan atau tanpa penambahan minyak cengkeh dilaporkan efektif untuk mengeliminir *seedborne Colletotrichum capsici* dari benih cabai (Ilyas & Sudarsono 2002).

Media yang digunakan untuk *matriconditioning* harus mempunyai potensial matrik rendah dan potensial osmotik yang dapat diabaikan, daya larut rendah, tetap utuh selama perlakuan, *inert*, tidak beracun, dan daya pegang air tinggi. Selain itu matrik mampu mengalirkan air yang tinggi, memiliki luas permukaan yang besar, berat jenis rendah, dan mampu melekat pada kulit benih (Khan *et al.* 1992). Bahan-bahan yang digunakan untuk *matriconditioning* diantaranya adalah karbon aktif, arang sekam, serbuk gergaji, abu gosok, zeolit, vermikulit dan *micro-Cel E* (Yunitasari & Ilyas 1994).

*Matriconditioning* efektif meningkatkan perkecambahan berbagai jenis benih. Perlakuan ini dapat diintegrasikan dengan zat pengatur tumbuh, pestisida sintetis atau nabati, atau mikroba yang berfungsi sebagai agen biokontrol (Ilyas 2005). Perlakuan *matriconditioning* plus *Bacillus subtilis* pada benih padi menghasilkan pertumbuhan bibit dan penurunan persentase *X. oryzae* pv. *Oryzae* yang lebih baik dari pada perlakuan lain yang diuji. Perlakuan *matriconditioning* plus minyak serai wangi 1% menghasilkan daya berkecambah tertinggi, meningkatkan indeks vigor, dan menurunkan tingkat infeksi *X. oryzae* pv. *Oryzae* (Ilyas et al. 2008). Pengendalian *Cmm* mulai dari tahapan persiapan benih diharapkan mampu memperbaiki mutu kesehatan benih dan perlakuan invigorasi diharapkan dapat memperbaiki mutu fisiologis benih.

Penelitian ini bertujuan untuk (1) efektivitas berbagai perlakuan benih untuk mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi. (2) Mengevaluasi daya berkecambah, kecepatan tumbuh, indeks vigor, atau waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total pemunculan kecambah ( $T_{50}$ ) benih tomat terinfeksi *Cmm* akibat perlakuan eliminasi *Cmm* menggunakan minyak kulit kayu manis, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh dengan atau tanpa *matriconditioning* menggunakan bubuk arang sekam.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Teknologi Benih Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang dari bulan September hingga Desember 2008.

### **Minyak dan Ekstrak Tumbuhan sebagai Bakterisida Nabati**

Minyak dan ekstrak tumbuhan yang digunakan adalah minyak cengkeh (*Syzygium aromaticum*), minyak kulit kayu manis (*Cinnamomum burmannii*), ekstrak daun sirih hutan (*Piper aduncum*), ekstrak rizoma temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) dengan konsentrasi yang efektif menghambat *Cmm* pada benih tomat terinfeksi. Minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut diperoleh dari lab. Kimia Bahan Alam FMIPA Universitas Andalas Padang.

## **Benih Tomat Terinfeksi Buatan**

Bahan tanaman perlakuan yang digunakan adalah benih tomat cv. Marta nomor lot 6107516024. Benih tomat yang terinfeksi *Cmm* secara alami tidak tersedia, maka lot benih tomat terinfeksi berat oleh *Cmm* didapatkan dengan perlakuan inokulasi buatan (*artificial inoculation*). Inokulasi buatan dilakukan dengan merendam benih tomat di dalam suspensi isolat *Cmm* SLK-11 yang diisolasi dari buah tomat yang bergejala *bird's eye spot* berasal dari Danau Kembar, Solok (Zainal *et al.* 2008) dengan konsentrasi  $3 \times 10^8$  cfu/ml dan dikocok di atas *shaker* dengan kecepatan 300 rpm selama 30 menit. Benih yang telah diinokulasi dikeringkan dengan tiupan udara hangat, berasal dari pengering rambut (*hair drier*) yang diatur pada suhu sekitar 36°C, selama 45 menit kecepatan angin 40 km/jam. Jarak antara pengering rambut dengan benih diatur sekitar 20 cm. Pengeringan benih dilakukan sehingga kadar air benih setelah perlakuan mendekati kadar air benih awal sebelum perlakuan. Benih disimpan dalam wadah plastik kedap udara selama satu minggu sebelum digunakan dalam percobaan berikutnya.

## **Penentuan Efektivitas Eliminasi *Cmm* dengan Minyak dan Ekstrak Tumbuhan dari Lot Benih Tomat Terinfeksi**

Efektivitas eliminasi *Cmm* dari lot benih tomat terinfeksi dievaluasi dengan menggunakan empat jenis minyak dan ekstrak tumbuhan dengan konsentrasi yang efektif menghambat *Cmm* berdasarkan uji daya hambat minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap *Cmm* pada benih terinfeksi. Efektivitas eliminasi *Cmm* dari lot benih terinfeksi menggunakan minyak dan ekstrak tumbuhan dan juga diinkorporasikan dalam *matriconditioning* menggunakan bubuk arang sekam. Percobaan disusun dalam rancangan acak lengkap (RAL) dengan sepuluh macam perlakuan benih. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali sehingga terdapat 30 satuan percobaan.

Setiap perlakuan disiapkan tiga kantong benih tomat terinfeksi buatan *Cmm* (14 g). Perlakuan benih terdiri atas (1) perendaman dalam minyak kulit kayu manis 5% selama 20 menit, (2) *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5%, (3) perendaman dalam minyak cengkeh 0,5% selama 20 menit, (4) *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5%, (5) perendaman dalam ekstrak daun sirih

hutan 5% selama 20 menit, (6) *matriconditioning* plus ekstrak daun sirih hutan 5%, (7) perendaman dalam ekstrak rizoma temulawak 5% selama 20 menit, (8) *matriconditioning* plus ekstrak rizoma temulawak 5%, (9) *matriconditioning* saja, dan (10) benih terinfeksi *Cmm* tanpa perlakuan benih sebagai kontrol.

Benih tomat terinfeksi *Cmm* direndam selama 20 menit dalam 90 ml larutan minyak dan ekstrak tumbuhan sesuai dengan perlakuan benih tersebut di atas, dengan penambahan 5 tetes *Tween* 80 steril. *Matriconditioning* dilakukan dengan mencampur benih tomat terinfeksi *Cmm* dalam satuan gram terhadap masing-masing ekstrak tumbuhan sesuai perlakuan benih tersebut di atas dalam milliliter ke dalam botol kultur 250 ml dan terakhir dengan menambahkan bubuk arang sekam sebagai *carrier* (ukuran 210  $\mu$ /65 *mesh*) dalam satuan gram kemudian diaduk rata. Perbandingan antara benih, bubuk arang sekam dan ekstrak tumbuhan adalah 2 : 1 : 1. Perlakuan *matriconditioning* tanpa ekstrak tumbuhan digantikan dengan akuades steril. Benih tomat terinfeksi yang tidak diberi perlakuan, langsung diekstraksi untuk menentukan jumlah koloni bakteri.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang. Kondisi suhu dan kelembaban (RH) di dalam laboratorium terkontrol (27 °C dan 80%). *Matriconditioning* dilakukan pada suhu 22 °C dan RH 60-70% di bawah cahaya lampu diinkubasi selama 4 hari. Selama waktu tersebut benih yang sedang *diconditioning* diaduk beberapa kali. Setelah perlakuan, benih dibilas satu kali dengan akuades steril dan dikeringkan kembali dengan *hair drier* sebagaimana yang telah diuraikan sebelumnya. Benih terinfeksi yang telah diberi perlakuan masing-masing sejumlah 6 g diekstraksi menggunakan *buffer* PBT dan cairan hasil ekstraksi benih diencerkan hingga 100 kali. Selanjutnya ekstrak benih yang telah diencerkan (0,5 ml) ditumbuhkan dalam media SCM dalam ruang bersuhu 26-28 °C. Jumlah koloni *Cmm* dan bakteri saprofit lainnya yang tumbuh dalam media SCM dihitung pada 10 hari setelah *dilution plating*.

## Evaluasi Mutu Fisiologis Benih Tomat Terinfeksi setelah Eliminasi *Cmm* dengan Minyak dan Ekstrak Tumbuhan

Pengaruh perlakuan benih terhadap mutu fisiologis benih tomat terinfeksi dievaluasi setelah perlakuan eliminasi *Cmm*. Benih terinfeksi yang telah diberi perlakuan masing-masing sejumlah 6 g digunakan untuk evaluasi mutu fisiologis benih. Benih terinfeksi yang telah diperlakukan dibilas satu kali dengan akuades steril dan dikeringkan kembali dengan *hair drier* sebagaimana yang telah diuraikan sebelumnya. Benih terinfeksi *Cmm* yang tidak diberi perlakuan langsung digunakan untuk evaluasi mutu fisiologis benih.

Benih terinfeksi yang telah diperlakukan dikecambahkan dalam bak/wadah plastik berisi media pasir steril dan dengan metode *top of paper*. Bak/wadah plastik berukuran 20 x 35 x 7,5 cm (lebar x panjang x tinggi) diisi dengan pasir steril sekitar dua pertiganya, dilembabkan, kemudian benih tomat ditanamkan di pasir tersebut. Bak/wadah plastik tersebut ditempatkan di rumah kaca. Pengujian pada metode *top of paper* kertas yang digunakan terdiri atas dua lembar kertas merang sebagai alas dan tiga lembar kertas tisu yang ditempatkan di atas kertas merang. Media kertas ini ditempatkan di dalam kotak plastik. Benih dikecambahkan di atas kertas tisu yang sebelumnya telah dilembabkan. Kotak plastik berisi benih tersebut kemudian ditutup dengan kaca transparan dan ditempatkan pada ruang inkubasi pada suhu 23 °C.

Unit percobaan terdiri atas satu wadah plastik berisi pasir steril tempat penanaman benih atau metode *top of paper* di dalam kotak plastik, untuk masing-masing perlakuan ditanam 100 benih tomat dan masing-masing perlakuan terdiri atas tiga ulangan. Pengamatan dilakukan terhadap parameter mutu viabilitas dan vigor benih;

1. Daya berkecambah (DB), menggambarkan viabilitas potensial benih (Sadjad *et al*, 1999), dihitung berdasarkan persentase kecambah normal (KN) hitungan pertama yaitu 7 hari setelah tanam (HST) dan kedua (14 HST) dengan rumus;

$$DB = \frac{\Sigma \text{KN hitungan I} + \Sigma \text{KN hitungan II}}{\Sigma \text{ benih yang ditanam}} \times 100\%$$

2. Kecepatan tumbuh ( $K_{CT}$ )

Kecepatan tumbuh dihitung berdasarkan perbandingan persentase kecambah normal setiap hari pengamatan, satuannya adalah %/hari,

$$K_{CT} = \sum_{i=0}^{t_n} \frac{N_n - N_{(n-1)}}{t}$$

$N_n$  = persentase kecambah normal hari ke-n

$N_{(n-1)}$  = persentase kecambah normal hari ke n-1

$t$  = waktu pengamatan (hari ke-i)

$t_n$  = waktu akhir pengamatan (hari ke-n)

3. Indeks vigor (IV), menggambarkan vigor kecepatan tumbuh (Copeland & Mc Donald 1995), dihitung berdasarkan persentase kecambah normal pada hitungan pertama (7 hst) dengan rumus ;

$$IV = \frac{\sum \text{KN hitungan I}}{\sum \text{benih yang ditanam}} \times 100\%$$

4.  $T_{50}$  adalah waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total pemunculan kecambah, diamati dengan menghitung jumlah benih yang berkecambah setiap hari,  $T_{50}$  menggambarkan vigor benih dihitung dengan rumus;

$$T_{50} = t_i + \frac{(n_{50} - n_i)}{(n_j - n_i)}$$

Keterangan :

$T_{50}$  = waktu (hari) yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total perkecambahan

$t_i$  = waktu (hari) yang dibutuhkan untuk mencapai 50 % total perkecambahan

$n_{50}$  = jumlah kecambah 50% dari total perkecambahan

$n_i$  = jumlah kecambah batas bawah sebelum mencapai 50% total perkecambahan

$n_j$  = jumlah kecambah atas setelah mencapai 50% total perkecambahan

Sebagai data pendukung, kadar air benih ditentukan menggunakan alat pengukur kadar air OHAUS.

Percobaan dilakukan di Laboratorium Teknologi Benih dan rumah kaca Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Padang. Kondisi suhu dan kelembaban (RH) di dalam laboratorium terkontrol (27 °C dan 80%), sedangkan suhu di dalam rumah kaca tidak terkontrol. Konstruksi rumah kaca (atap kaca, dinding kawat kasa kedap serangga) menyebabkan kondisi di dalam ruangan (suhu dan RH) hampir sama dengan di luar ruangan. Pengamatan terhadap suhu dan RH rata-rata harian di dalam rumah kaca menggunakan *thermohygrometer*.

### **Efektivitas Eliminasi *Cmm* dengan Minyak dan Ekstrak Tumbuhan dari Lot Benih Tomat Terinfeksi**

Benih tomat terinfeksi yang diberi perlakuan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, ekstrak rizoma temulawak 5%, minyak kulit manis 5%, atau yang direndam dalam minyak cengkeh 0,5% selama 20 menit dapat mengeliminasi tingkat infeksi *Cmm* lebih 99%. Perlakuan perendaman benih tomat terinfeksi di dalam ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, atau minyak kulit kayu manis 5% tanpa *matriconditioning* bisa menurunkan tingkat infeksi *Cmm* hingga 98% (Tabel 19).

Hasil percobaan juga menunjukkan tidak terdapat perbedaan penurunan jumlah populasi bakteri saprofit, kecuali pada perlakuan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5%. *Matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5% mampu mengeliminasi bakteri *Cmm* dan saprofit selain *Cmm* yang menginfeksi benih tomat. Fokus penelitian yang dilakukan adalah menguji efektivitas minyak dan ekstrak tumbuhan untuk mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat.

Tabel 19. Tingkat infeksi *Cmm* SLK-11 dan bakteri saprofit selain *Cmm* pada benih tomat sebelum dan sesudah perlakuan benih serta persentase eliminasi *Cmm* oleh perlakuan benih.

| Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>  | Bakteri patogen <i>Cmm</i> |                        | Infeksi bakteri saprofit (cfu/ml) |
|---|----------------------------|------------------------|-----------------------------------|
|   | Tingkat infeksi (cfu/ml)   | Persentase eliminasi * |                                   |
| Tanpa perlakuan benih                             | 373,7 x 10 <sup>2</sup> a  | 0                      | 4,3 x 10 <sup>2</sup> a           |
| Temulawak 5%, 20'                                 | 5,0 x 10 <sup>2</sup> b    | 98                     | 2,7 x 10 <sup>2</sup> ab          |
| Sirih hutan 5%, 20'                               | 5,0 x 10 <sup>2</sup> b    | 98                     | 2,7 x 10 <sup>2</sup> ab          |
| Kulit manis 5%, 20'                               | 4,0 x 10 <sup>2</sup> b    | 98                     | 3,0 x 10 <sup>2</sup> a           |
| Minyak cengkeh 0.5%, 20'                          | 3,7 x 10 <sup>2</sup> b    | 99                     | 3,7 x 10 <sup>2</sup> a           |
| <i>Matriconditioning</i>                          | 365,0 x 10 <sup>2</sup> a  | 2                      | 4,7 x 10 <sup>2</sup> a           |
| <i>Matriconditioning</i> plus sirih hutan 5%      | 3,0 x 10 <sup>2</sup> b    | 99                     | 3,3 x 10 <sup>2</sup> a           |
| <i>Matriconditioning</i> plus temulawak 5%        | 3,3 x 10 <sup>2</sup> b    | 99                     | 2,3 x 10 <sup>2</sup> ab          |
| <i>Matriconditioning</i> plus kulit manis 5%      | 2,3 x 10 <sup>2</sup> b    | 99                     | 2,7 x 10 <sup>2</sup> ab          |
| <i>Matriconditioning</i> plus minyak cengkeh 0.5% | 0,7 x 10 <sup>2</sup> b    | 99                     | 1,3 x 10 <sup>2</sup> b           |

Catatan: Data pada kolom dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%. \*Dihitung dengan rumus =  $\left[\frac{T_0 - T_s}{T_0}\right] \times 100\%$ ; T<sub>0</sub> = tingkat infeksi *Cmm* tanpa perlakuan benih dan T<sub>s</sub> = tingkat infeksi *Cmm* dengan perlakuan benih.

### **Pengaruh Mutu Fisiologis Benih Tomat Terinfeksi setelah Eliminasi *Cmm* dengan Minyak dan Ekstrak Tumbuhan**

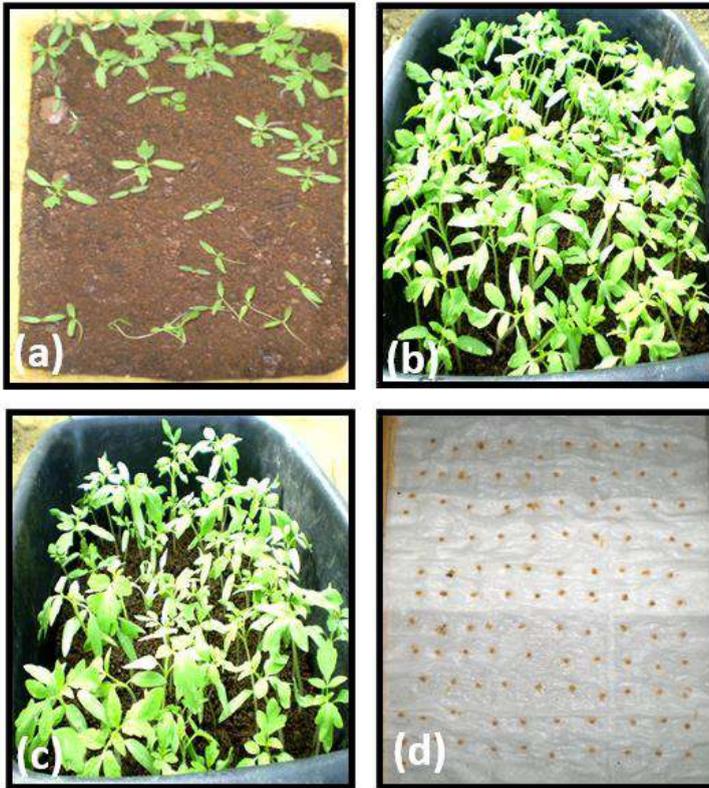
Daya berkecambah benih awal sebelum diinokulasi buatan dengan *Cmm* mencapai 80% pada media pasir (Gambar 12a) dan 82% pada media kertas sedangkan setelah inokulasi buatan mencapai 79% pada media pasir dan 90% pada media kertas. Daya berkecambah benih di media pasir menunjukkan berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih, daya berkecambah benih di media kertas tidak berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih kecuali *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5%. Daya berkecambah benih dengan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% hanya 51% (Gambar 12c), angka

tersebut berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih dan perlakuan benih lain pada kedua sistem pengecambahan (Tabel 20).

Tabel 20. Pengaruh berbagai perlakuan benih menggunakan ekstrak uji terhadap daya berkecambah benih tomat yang terinfeksi *Cmm* pada dua sistem pengecambahan

| Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>  | Daya berkecambah benih (%) |              |
|---|----------------------------|--------------|
|   | Media pasir                | Media kertas |
| Tanpa perlakuan benih                             | 79 c                       | 90 a         |
| Temulawak 5%, 20'                                 | 97 a                       | 97 a         |
| Sirih hutan 5%, 20'                               | 98 a                       | 98 a         |
| Kulit kayu manis 5%, 20'                          | 85 bc                      | 84 a         |
| inyak cengkeh 0,5%, 20'                           | 98 a                       | 97 a         |
| <i>Matriconditioning</i>                          | 98 a                       | 97 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus sirih hutan 5%      | 97 a                       | 98 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus temulawak 5%        | 94 ab                      | 81 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus kulit kayu manis 5% | 51 d                       | 51 b         |
| <i>Matriconditioning</i> plus minyak cengkeh 0,5% | 98 a                       | 91 a         |

Data pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%. Daya berkecambah awal benih tomat sebelum inokulasi buatan dengan *Cmm* pada media pasir dan media kertas masing-masing 80% dan 82%.



Gambar 11. Performansi pengecambahan benih tomat pada perlakuan : (a) sebelum benih diinokulasi buatan dengan *Cmm* di media pasir daya berkecambahnya 80%, (b) benih terinfeksi *Cmm* diberi perlakuan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5% di media pasir daya berkecambahnya 98%, (c) benih terinfeksi *Cmm* perlakuan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% di media pasir daya berkecambahnya 51%, dan (d) pengecambahan benih di media kertas. Setiap perlakuan terdiri atas 100 benih tomat yang dikecambahkan di media pasir dan media kertas tissue.

Pola yang sama pada Tabel 21 menunjukkan kecepatan tumbuh benih di media pasir berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih kecuali perendaman dalam minyak kulit kayu manis 5%. Kecepatan tumbuh benih dengan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% dan *matriconditioning* plus minyak cengkeh 0,5% berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih di

media kertas. Kecepatan tumbuh benih dengan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% hanya sekitar 8%/hari yang jauh lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan benih yang lain atau tanpa perlakuan benih (Tabel 21).

Tabel 21. Pengaruh berbagai perlakuan benih menggunakan ekstrak uji terhadap kecepatan tumbuh benih tomat yang terinfeksi *Cmm* pada dua sistem pengecambahan

| Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>  | Kecepatan tumbuh (%/hari) |              |
|---|---------------------------|--------------|
|   | Media pasir               | Media kertas |
| Tanpa perlakuan benih                             | 14 c                      | 20 bc        |
| Temulawak 5%, 20'                                 | 28 a                      | 20 bc        |
| Sirih hutan 5%, 20'                               | 26 a                      | 21 b         |
| Kulit kayu manis 5%, 20'                          | 15 c                      | 14 c         |
| Minyak cengkeh 0,5%, 20'                          | 26 a                      | 24 b         |
| <i>Matriconditioning</i>                          | 19 b                      | 25 ab        |
| <i>Matriconditioning</i> plus sirih hutan 5%      | 19 b                      | 21 b         |
| <i>Matriconditioning</i> plus temulawak 5%        | 19 b                      | 19 bc        |
| <i>Matriconditioning</i> plus kulit kayu manis 5% | 7 d                       | 8 d          |
| <i>Matriconditioning</i> plus minyak cengkeh 0,5% | 25 a                      | 31 a         |

Data pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%, Kecepatan tumbuh benih tomat sebelum inokulasi buatan dengan *Cmm* (benih awal) pada media pasir dan media kertas masing-masing 16 dan 22%/hari.

Indeks vigor (IV) benih di media pasir berbeda nyata dengan yang tidak diberi perlakuan benih kecuali perendaman dalam minyak kulit manis 5%. Indeks vigor benih pada media kertas tidak berbeda nyata kecuali *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5%. *Matriconditioning* plus kayu minyak kulit manis 5% menunjukkan indeks vigor yang nyata lebih rendah yakni mencapai 22% dan 25% (Tabel 22).

Tabel 22. Pengaruh berbagai perlakuan benih menggunakan ekstrak uji terhadap indeks vigor (IV) benih tomat yang terinfeksi *Cmm* pada dua sistem pengecambahan.

| Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>  | Indeks vigor (%) |              |
|---|------------------|--------------|
|   | Media pasir      | Media kertas |
| Tanpa perlakuan benih                             | 66 b             | 77 a         |
| Temulawak 5%, 20'                                 | 97 a             | 92 a         |
| Sirih hutan 5%, 20'                               | 98 a             | 98 a         |
| Kulit kayu manis 5%, 20'                          | 59 b             | 59 ab        |
| Minyak cengkeh 0,5%, 20'                          | 96 a             | 95 a         |
| <i>Matriconditioning</i>                          | 91 a             | 88 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus sirih hutan 5%      | 91 a             | 78 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus temulawak 5%        | 92 a             | 72 a         |
| <i>Matriconditioning</i> plus kulit kayu manis 5% | 22 c             | 25 b         |
| <i>Matriconditioning</i> plus minyak cengkeh 0,5% | 98 a             | 89 a         |

Data pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%, Indeks vigor benih tomat sebelum inokulasi buatan dengan *Cmm* (benih awal) pada media pasir dan media kertas masing-masing 66% dan 77%

Tabel 23. Pengaruh berbagai perlakuan benih menggunakan ekstrak uji terhadap waktu yang dibutuhkan untuk berkecambah 50% ( $T_{50}$ ) benih tomat yang terinfeksi *Cmm* pada dua sistem pengecambahan

| Perlakuan pada benih tomat terinfeksi <i>Cmm</i>  | $T_{50}$ (hari) |              |
|---|-----------------|--------------|
|   | Media pasir     | Media kertas |
| Tanpa perlakuan benih                             | 5,2 bc          | 4,5 bc       |
| Temulawak 5%, 20'                                 | 3,0 d           | 4,7 bc       |
| Sirih hutan 5%, 20'                               | 3,3 cd          | 4,5 bc       |
| Kulit kayu manis 5%, 20'                          | 6,3 b           | 6,6 bc       |
| Minyak cengkeh 0,5%, 20'                          | 3,4 cd          | 5,0 bc       |
| <i>Matriconditioning</i>                          | 4,7 bcd         | 3,5 bc       |
| <i>Matriconditioning</i> plus sirih hutan 5%      | 4,5 bcd         | 5,3 bc       |
| <i>Matriconditioning</i> plus temulawak 5%        | 4,7 bcd         | 6,7 b        |
| <i>Matriconditioning</i> plus kulit kayu manis 5% | 13,3 a          | 11,0 a       |
| <i>Matriconditioning</i> plus minyak cengkeh 0,5% | 3,6 cd          | 2,6 c        |

Data pada kolom yang diikuti dengan huruf yang sama, tidak berbeda nyata berdasarkan uji BNJ pada taraf nyata 5%,  $T_{50}$  benih tomat sebelum inokulasi buatan dengan *Cmm* (benih awal) pada media pasir dan media kertas masing-masing 6,3 dan 3,8.

Waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% benih berkecambah akibat berbagai perlakuan benih pada media pasir dan kertas tidak berpengaruh kecuali *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5%. Waktu yang dibutuhkan untuk 50% benih berkecambah sekitar 3-6 hari yang tidak berbeda nyata dengan tanpa perlakuan benih, sedangkan *matriconditioning* plus kayu minyak kulit manis 5% membutuhkan waktu nyata lebih lama mencapai 50% benih berkecambah yaitu 11,0 atau 13,3 hari (Tabel 23).

## Pembahasan

Perlakuan menggunakan minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* tidak mampu mengeliminasi *Cmm* secara total dari benih terinfeksi. Ketidak mampuan perlakuan benih menggunakan minyak cengkeh 0,5% tersebut untuk mengeliminasi *Cmm* secara total, diduga terjadi karena (1) minyak cengkeh dalam perlakuan ini tidak dapat menjangkau *Cmm* yang ada di bagian dalam benih tomat atau (2) konsentrasi *Cmm* pada benih tomat hasil inokulasi buatan yang sangat tinggi. Jika perlakuan yang sama digunakan untuk mengeliminasi *Cmm* dari benih tomat yang terinfeksi secara alami yang tingkat infeksiya jauh lebih rendah dibandingkan dengan inokulasi buatan, perlakuan minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* diduga akan dapat mengeliminasi *Cmm* hingga 100%.

Eliminasi *Cmm* pada benih terinfeksi dengan minyak dan ekstrak tumbuhan, evaluasi pengaruh negatif setelah perlakuan benih dengan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap vigor dan viabilitas benih terinfeksi sangat penting. Perlakuan benih dengan ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, atau minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* tidak berpengaruh negatif terhadap perkecambahan benih, kecepatan tumbuh, indeks vigor, dan  $T_{50}$  dari benih tomat terinfeksi *Cmm*. Bahan aktif *xanthorizol* pada temulawak (Rukayadi *et al.* 2006), eugenol pada minyak cengkeh (Nurdin *et al.* 2001), *2',6'-dihydroxy-4'methoxychalcone* pada sirih hutan (Torres-Santos *et al.* 1996; Rali *et al.* 2007) tidak menghambat daya berkecambah benih tomat.

Ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh dapat dimanfaatkan untuk perlakuan benih karena selain mengeliminasi *Cmm* pada benih, penampilan perkecambahan

yang baik dan laju perkecambahan serta keseragaman tumbuh yang tinggi tetap terjaga setelah benih diberi perlakuan. Ekstrak rizoma temulawak dan ekstrak daun sirih hutan memerlukan konsentrasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan minyak cengkeh, hal ini tidak efektif bila dikembangkan secara komersial karena tingginya konsentrasi menuntut penyediaan ekstrak tumbuhan yang lebih banyak. Efektivitas kedua ekstrak tersebut diduga dapat ditingkatkan dengan meningkatkan konsentrasi bahan aktif dalam ekstrak tumbuhan yang digunakan. Penggunaan minyak dan ekstrak tumbuhan untuk dapat diterima oleh industri benih, disyaratkan bahwa penampilan perkecambahan yang baik dan laju perkecambahan serta keseragaman tumbuh yang tinggi tetap terjaga setelah benih diberi perlakuan (Brandl 2001).

Ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh dapat diterapkan langsung oleh petani dengan jumlah benih yang relatif sedikit sebelum persemaian. Jika perlakuan ini akan diterapkan pada skala produsen benih komersial perlu dikaji terlebih dahulu terutama pengembangan formulasi minyak dan ekstrak tumbuhan untuk tujuan perlakuan benih atau penyimpanan benih dalam jangka waktu tertentu.

Perlakuan *matriconditioning* plus minyak kulit kayu manis 5% menurunkan daya berkecambah, kecepatan tumbuh, indeks vigor, atau  $T_{50}$  benih tomat terinfeksi dibanding tanpa perlakuan benih. Perlakuan menggunakan minyak kulit kayu manis 5% juga berpengaruh negatif terhadap vigor dan viabilitas benih terinfeksi. Minyak kulit kayu manis tidak memenuhi syarat bagi perlakuan benih untuk dapat diterima oleh industri benih.

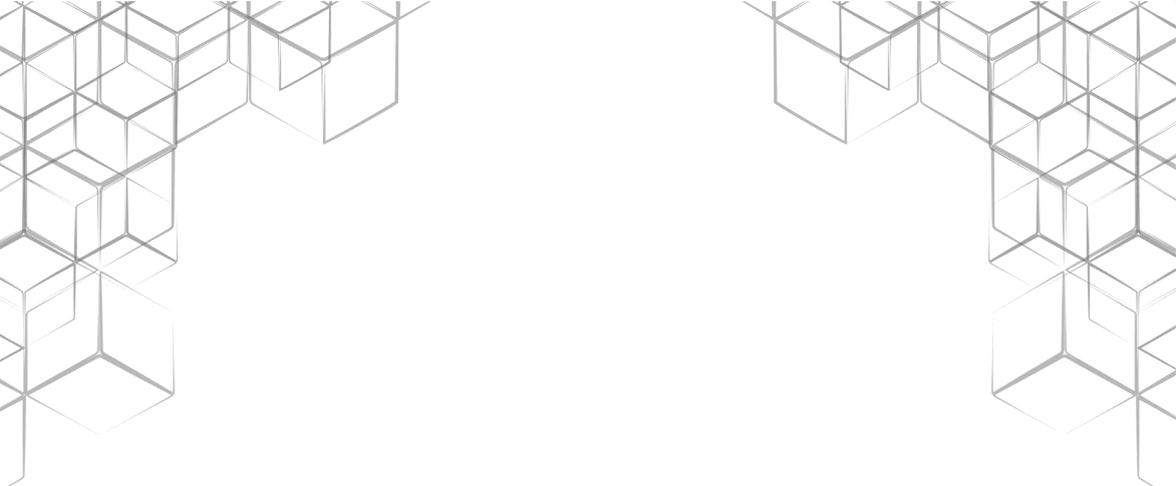
Bahan aktif kulit kayu manis *Cinnamaldehyde* (Belitz & Grosch 1999; Maidment *et al.* 2006) diduga menghambat daya berkecambah benih tomat. Penurunan vigor dan viabilitas benih tomat sangat nyata pada perlakuan minyak kulit kayu manis diinkorporasikan dalam *matriconditioning*. *Matriconditioning* diduga meningkatkan aktivitas bahan aktif *Cinnamaldehyde* terhadap viabilitas benih sehingga menghambat daya berkecambah benih tomat.

Perlu dikembangkan studi penghambatan vigor dan viabilitas benih tomat oleh minyak kulit kayu manis antara lain senyawa kimia, bahan aktif, mekanisme reaksi penghambatan untuk formulasi teknologi bioherbisida.

## Simpulan

Hasil penelitian ini menyimpulkan bahwa; (1) perlakuan eliminasi *Cmm* pada benih dengan ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5%, dan minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* menggunakan bubuk arang sekam, mampu menurunkan tingkat infeksi *Cmm* hingga lebih dari 99%. (2) Eliminasi *Cmm* pada benih akibat perlakuan dengan minyak dan ekstrak tumbuhan tidak menurunkan daya berkecambah, kecepatan tumbuh, indeks vigor, atau waktu yang dibutuhkan untuk mencapai 50% total pemunculan kecambah ( $T_{50}$ ) benih kecuali perlakuan dengan minyak kulit kayu manis 5% dengan atau tanpa *matriconditioning*. Kajian efektivitas perlakuan minyak dan ekstrak tumbuhan terhadap benih yang akan disimpan dalam jangka waktu tertentu sangat diperlukan.





# **BAB VIII**

# **PENUTUP**

---

*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agen penyebab penyakit kanker bakteri pada tomat adalah patogen tular benih (*seedborne pathogen*) telah tersebar di hampir seluruh penjuru dunia. Penyakit ini baru di Indonesia karena negara ini dilaporkan bebas dari penyakit ini hingga tahun 2002. Deteksi *Cmm* diantara benih tomat komersial di Indonesia pertama kali dilaporkan oleh Anwar *et al.* (2004a,b).

Konsekuensi impor benih yang telah berlangsung selama ini dan lalu lintas plasmanutrafah untuk perakitan varietas-varietas baru adalah semakin besar kemungkinan terbawanya patogen bersama benih-benih tersebut, karena benih merupakan wahana yang sangat cocok bagi patogen untuk menyebar melintasi batasan alaminya (Neergard 1988; Agrios 2005). Kenyataan ini disadari atau tidak telah turut menyebarkan bahkan memasukkan patogen baru ke Indonesia diantaranya adalah *Cmm*.

Ditemukannya *Cmm* pada lot benih tomat komersial yang beredar di Indonesia, perlu disusun strategi pengendalian penyakit yang berpotensi terjadi di masa yang akan datang. Langkah awal adalah memonitor keberadaan penyakit ini di lapangan dalam hal ini mengamati gejala serangan pada tanaman tomat di enam provinsi di Indonesia yaitu Sumatera Utara, Sumatera Barat, Bengkulu, Jawa Barat, Jawa Tengah, dan Jawa Timur. Provinsi tersebut merupakan sentra produksi tomat di Indonesia (Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura Departemen Pertanian 2005).

Penelitian ini menunjukkan penyakit kanker bakteri yang disebabkan *Cmm* telah ditemukan di sentra produksi tomat di Indonesia. Intensitas serangan penyakit ini masih cukup rendah. Namun mesti diingat jika hal ini dibiarkan bukan tidak mungkin dalam jangka waktu yang tidak terlalu lama akan muncul ledakan penyakit (*outbreak*) yang akan merugikan petani. Ledakan penyakit kanker bakteri sudah terjadi di berbagai negara, seperti di Amerika Serikat (Hausbeck *et al.* 2000) dan di Turkey (Sahin *et al.* 2002).

Gejala yang terlihat pada tanaman dan buah tomat antara lain, gejala bercak mata burung (*bird's eye spot*) diamati di Danau Kembar, Solok, Sumatera Barat; sekresi batang yang membelah dan terlihat disklorosi jaringan diamati di Lembah Gumanti, Solok, Sumatera Barat; layu daun dan nekrosis pada lingkaran daun diamati di Matus, Kediri, Jawa Timur; nekrotik pada batang, layu daun dan nekrosis pada lingkaran daun diamati di Wanayasa, Banjarnegara,

Jawa Tengah; dan nekrotik pada batang (*tissue discoloration*) diamati di Cipanas, Cianjur, Jawa Barat.

Metode deteksi standar untuk isolasi *Cmm* pada tanaman tomat sampel adalah agar *dilution plating* pada medium semi selektif (Fatmi & Schaad 1998; Kritzman 1991). Kemudian dikembangkan pada pengujian serologi dengan *immunofluorescence microscopy* (Van Vaerenbergh & Chauveau 1987; Francen 1993) analisis asam lemak (Gitaitis *et al.* 1992), ELISA (Alvarez-Derie *et al.* 1993) dan rep-PCR (Louws *et al.* 1998). Metode deteksi yang sensitif, cepat dan *reliable* seperti PCR (Santos *et al.* 1997). Southern hybridization dan PCR (Dreier *et al.* 1995) dapat diterapkan pada *Cmm*. Namun demikian metode serologi dan PCR tidak memberikan data tentang viabilitas patogen. Metode real time PCR akan efektif memberikan data tentang viabilitas patogen. Pengujian cepat, sensitif, dan spesifik ini dapat diterapkan sebagai metode deteksi standar yang dilakukan.

Metode *dilution plating* pada medium semi selektif mempunyai keunggulan dimana dengan metode ini selain mampu mengidentifikasi bakteri sekaligus mampu melihat aktivitasnya. Metode ini membutuhkan waktu lama, tenaga kerja lebih banyak, memerlukan antibiotik yang cukup berbahaya dan mahal. Kesulitan bagi laboratorium yang belum lengkap fasilitasnya adalah peralatan dan bahan penunjang tidak tersedia.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa tidak ada metode deteksi tunggal yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan *Cmm* pada lot benih tomat (Anwar *et al.* 2005). Metode yang dikembangkan menggabungkan metode *dilutin plating* pada media universal NA, koloni yang diduga *Cmm* dipindahkan ke media YDC dilanjutkan dengan uji gram dan uji lainnya seperti HR, patogenisitas dan uji pektinase bisa lebih murah dan dapat dilakukan oleh laboratorium dengan standar Indonesia.

Agrios (2005), Fatmi & Schaad (1998), Kritzman (1991) menjelaskan bahwa bakteri *Cmm* adalah gram positif. Dengan pola kerja seperti di atas, setelah dipastikan isolat yang diuji gram positif maka uji HR, uji patogenisitas, pektinase, uji-fisiologis seperti Tabel 2 dapat dengan langsung memberi jawaban bahwa isolat tersebut positif *Cmm*. Jika masih dibutuhkan dan fasilitas tersedia uji serologi, uji fluoresens, uji biolog, uji ELISA dan PCR dapat dilakukan untuk memperkuat hasil pengujian.

Karakteristik isolat bakteri yang diduga *Cmm* dari berbagai lokasi penanaman tomat bereaksi gram positif, enzim pektinase positif, oksidase negatif, bereaksi hypersensitif, bersifat patogenisitas, tidak berpigmen *fluorescent* pada media King's, tidak mereduksi nitrat, aerobik, enzim protease positif, tidak menghasilkan sulfida ( $H_2S$ ), dan enzim katalase positif. Koloni *Cmm* pada medium YDC tumbuh lambat, mukoid, dan kuning muda hingga kuning tua, cembung.

Sekuen nukleotida gen *serine protease* membuktikan bahwa agen penyebab penyakit kanker pada tomat di berbagai lokasi di Sumatera dan Jawa adalah *Cmm*. Dibuktikan dari hasil analisis *Blast* menggunakan sekuen nukleotida gen *serine protease*. Sekuen ini tidak dapat menjawab filogeni berdekatan, melainkan hanya untuk mendeteksi bahwa bakteri yang dideterminasi adalah benar *Cmm* (Santos *et al.* 1997; Hadas *et al.* 2005).

Sekuensing gen 16S-rRNA merupakan kriteria penting dalam taksonomi mikroba (Krueze *at al.* 1999). Kombinasi dari persamaan dan sekuen yang bervariasi ini sangat berguna dalam identifikasi genus dan spesies bakteri, dan mengungkap bagaimana proses keberadaan bakteri itu (Alizadeh *et al.* 1997). Analisis filogenetik sekuen nukleotida parsial gen 16S rRNA *Cmm* yang dikarakterisasi dalam penelitian ini punya kemiripan dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*). Data sekuen ini menunjukkan bahwa patogen *Cmm* yang ditemukan di Sumatera dan Jawa ini diduga dari introduksi. Kemiripan *Cmm* di Sumatera dan Jawa dengan aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*) bukan berarti patogen ini berasal dari Jepang, karena Jepang memang tidak mengekspor benih langsung ke Indonesia, tetapi Jepang dan Indonesia diduga dapat isolat dari negara ketiga yang sama. Data sekuen nukleotida gen *serine protease* dan 16S rRNA intra spesies enam isolat ini menunjukkan bahwa patogen ini satu strain yang sama (homologinya 99%), berasal dari satu sumber dan keberadaannya baru di Indonesia, patogen ini belum mengalami mutasi untuk beradaptasi dengan iklim dan keragaman tanaman inang.

Upaya yang tepat untuk pengendalian penyakit ini adalah penanaman kultivar tomat tahan. Metode ini sangat efektif dan ramah lingkungan tetapi kultivar tomat tahan belum diketahui di Indonesia. Langkah pertama adalah mempelajari reaksi ketahanan

genotipe tomat untuk pengembangan kultivar unggul tahan penyakit kanker bakteri. Optimasi inokulasi *Cmm* pada tomat yang efektif adalah dengan menyuntikkan inokulan *Cmm* 5 µl konsentrasi 10<sup>6</sup> cfu/ml pada beberapa tempat di ketiak daun pertama, daun tengah dan pucuk. Jumlah inokulan *Cmm* yang rendah sudah menimbulkan kerusakan berat pada tanaman uji, dan tanaman tomat sedikit mengalami kerusakan pada tempat inokulasi.

Percobaan ini menunjukkan genotipe tomat yang diuji belum ada yang tahan terhadap *Cmm*. Genotipe tomat komersial sebagian besar bereaksi sangat rentan dan rentan begitu juga genotipe koleksi PSPT-IPB, genotipe tomat lokal ada yang bereaksi agak rentan dan atau agak tahan diduga genotipe ini toleran terhadap infeksi *Cmm*. Mungkin masih ada genotipe tomat lokal lain yang bisa diuji ketahanannya terhadap *Cmm* guna memperbesar peluang seleksi genotipe tomat tahan.

Pendekatan lain adalah menjamin ketersediaan benih yang bebas patogen. Pengendalian penyakit melalui perlakuan benih menggunakan produk bahan nabati (*plant extracts*) sangat berpeluang. Jenis bahan tumbuhan yang digunakan diantaranya ekstrak daun (sirih, mimba, *tithonia*, surian), gambir, minyak serai dan minyak cengkeh. Semua bahan tersebut diuji secara *in vitro* dan pada benih tomat. Bahan tumbuhan tersebut bersifat ramah lingkungan, tidak melanggar peraturan di berbagai negara terhadap formulasi berbasis air. Pengendalian penyakit berbasis produk bahan alam (*plant extracts*) yang tersedia berlimpah di Indonesia diharapkan merupakan keuntungan tersendiri bagi kita, tidak saja secara ekonomi juga dari aspek keselamatan lingkungan.

Uji aktivitas *in vitro* memperlihatkan penghambatan pertumbuhan *Cmm* cukup baik oleh ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, dan minyak cengkeh. Perlakuan benih dengan minyak cengkeh, ekstrak rizoma temulawak, dan ekstrak daun sirih hutan dengan atau tanpa *matriconditioning* dapat mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat (Tabel 19) tanpa mengurangi kualitas fisiologis benih (Tabel 20, 21, 22, 23). Jadi minyak cengkeh, ekstrak rizoma temulawak, dan ekstrak daun sirih hutan berpotensi dikembangkan untuk mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat. Sifat *antimikrobia* senyawa eugenol yang dikandung minyak cengkeh dalam spektrum yang luas (Maidment *et al.* 1998; Nurdin *et al.* 2001; Friedman *et al.* 2002; Maidment *et al.*

2006). 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone dikandung sirih hutan (Torres-Santos *et al.* 1996, 1999; Novotny *et al.* 2003; Rali *et al.* 2007). temulwak dengan bahan aktif *xanthorizol* (Fuganti & Serra 2000; Park *et al.* 2003; Rukayadi *et al.* 2006) diyakini telah menghambat pertumbuhan bakteri *Cmm* dan seperti bahan kimia alami (*plant extracts*) lainnya tidak begitu berpengaruh terhadap tanaman. Minyak kulit kayu manis yang diinkorporasikan dalam *matriconditioning* mampu mengeliminasi *Cmm* dari lot benih tomat, tetapi mengurangi kualitas fisiologis benih. Kulit kayu manis mengandung *cinnamaldehyde* (Belitz & Grosch 1999; Maidment *et al.* 2006) dan antimikroba gram positif dan gram negatif (Friedman *et al.* 2002) diduga menghambat pertumbuhan *Cmm* tapi sebagai bahan kimia alami berpengaruh terhadap benih tomat.

Penggunaan bahan alam berbasis air (*water-based formulation*) untuk perlakuan benih diyakini akan semakin berkembang. Karena sifatnya yang ramah bagi pengguna (*user-friendliness*) dan tidak menghadapi hambatan peraturan di berbagai negara terhadap formulasi berbasis air, tidak berbahaya bagi tumbuhan, ekonomis, mudah didapat, stabil dalam waktu yang panjang (Ke-Qiang & van Bruggen 2001; Paul & Sharma 2002). Minyak cengkeh, ekstrak rizoma temulwak, dan ekstrak daun sirih hutan yang digunakan dalam percobaan ini diencerkan dengan air dan beberapa tetes *Tween*. Kondisi ini diharapkan memenuhi kriteria formulasi berbasis air dari berbagai minyak atsiri yang tersedia cukup banyak di Indonesia.

## Simpulan Umum

1. Bakteri *Cmm* telah ada di sejumlah sentra produksi tomat di Sumatera dan Jawa, dan persentase tanaman terserang oleh penyakit ini masih rendah berkisar antara 1-20%.
2. Analisis sekuen nukleotida, asam amino dari *gen serine protease* dan sekuen nukleotida 16S rRNA membuktikan bahwa 6 isolat *Cmm* yang dikarakterisasi dalam penelitian ini adalah satu strain yang sama, yang punya kemiripan dengan bagian sekuen nukleotida gen 16S rRNA aksesori D84128 (*Cmm* Jepang di pangkalan data *GeneBank*), dari data ini menunjukkan bahwa Jepang dan Indonesia dapat isolat dari negara ketiga yang sama.

3. Terhadap berbagai genotipe tomat yang diuji melalui penyuntikkan inokulum *Cmm* 5  $\mu$ l konsentrasi  $10^6$  cfu/ml pada beberapa tempat di ketiak daun belum ada yang tahan terhadap *Cmm*, genotipe tomat lokal ada yang agak rentan dan agak tahan.
4. Ekstrak rizoma temulawak, minyak kulit kayu manis, ekstrak daun sirih hutan, atau minyak cengkeh mampu menghambat *Cmm* secara *in vitro*. Diperlukan konsentrasi yang lebih tinggi yaitu ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, minyak kulit kayu manis 5% dan minyak cengkeh 0,5% untuk mengeliminasi *Cmm* pada benih.
5. Penggunaan ekstrak rizoma temulawak 5%, ekstrak daun sirih hutan 5%, dan minyak cengkeh 0,5% dengan atau tanpa *matriconditioning* efektif mengeliminasi *Cmm* tanpa menurunkan mutu fisiologis benih tomat, tetapi dengan minyak kulit kayu manis 5% dengan atau tanpa *matriconditioning* menurunkan mutu fisiologis benih.

## Saran

1. Dasar ditemukannya *Cmm* di Indonesia perlu diwaspadai dan pengendalian sedini mungkin segera dilakukan oleh semua pihak yang terkait khususnya pertanggung jawaban dalam regulasi perdagangan benih, impor dan karantina tumbuhan. Areal pertanaman tomat yang ditemukan gejala *Cmm* agar segera diisolasi agar penyebarannya dapat dikendalikan.
2. Rotasi tanaman dan penanaman kultivar tomat tahan adalah salah satu pendekatan yang paling efektif dalam upaya pengendalian penyakit ini, untuk itu perlu dikembangkan metode lebih lanjut untuk mendapatkan kultivar tomat tahan.
3. Metode eliminasi bakteri *Cmm* dari lot benih tomat dengan minyak cengkeh, ekstrak rizoma temulawak, ekstrak daun sirih hutan sudah dapat digunakan langsung oleh petani dengan jumlah benih relatif sedikit sebelum menyemai benih. Namun untuk produsen benih dengan skala besar masih diperlukan kajian lebih lanjut terutama dalam teknik aplikasi metode ini untuk jumlah benih yang banyak. Penelitian perlakuan benih dengan minyak dan ekstrak tumbuhan tersebut untuk benih tomat yang akan mengalami penyimpanan untuk jangka waktu tertentu juga perlu dilakukan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology*. Ed ke-5. San Diego, California: Academic Press.
- Alarcon C, Castro J, Munoz F, Arce-Johnson P, Delgado J. 1998. Protein(s) from the gram-positive bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* induced a hypersensitive response in plants. *Phytopathol* 88:306-310.
- Alizadeh A, Artlat M, Sarrafi A, Barrault G. 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis of Iranian strains of *Xanthomonas campestris* from cereal and grasses. *Plant Dis*. 81 : 31-35.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipinan DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J of Mol Biol* 215: 403-410.
- Alvarez AM. 2004. Integrated approaches for detection of plant pathogenic bacteria and diagnosis of bacterial diseases. *Annu. Rev. Phytopathol* 42 : 339-366.
- Alvarez A, Derie M, Benedict A, Gabrielson. R. 1993. Characteristics of a monoclonal antibody to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathol* 83:1405.
- Andreeva I.V. 1989. Membrane permeability and peroxidase activity in soy cultivars differing in resistance to mosaic virus. *Soviet Plant Physiol*. 35(4): 667-674.
- Anwar A, Ilyas S dan Sudarsono. 2004<sup>a</sup>. Deteksi Bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada Benih Tomat Komersial yang Beredar di Indonesia. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. Vol 10, No. 2, 2004 : 74 – 86.
- Anwar A, Sudarsono dan Ilyas S. 2005. Evaluasi dan Pengembangan Metode Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada Benih Tomat. *Jurnal Stigma*. Vol. XIII no. 3, Jan- Maret 2005.
- Anwar A, van der Zouwen PS, Ilyas S, and van der Wolf JM. 2004<sup>b</sup>. Bacterial Cancer (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) of Tomato in Commercial Seed Produced in Indonesia. *Plant Disease* 88:680.

- Ark PA. 1994. Studies on bacterial cancer of tomato. *Phytopathol* 34 : 394 - 400.
- Arora DS, Keur J. 1999. Antimicrobial activity of spices. *Phyther Res* 13: 616 – 618.
- Artilip TS and Funkhouser EA. 1995. Protein synthetic responses to environmental stresses. In M. Pessaraki (Ed). Handbook of plant and crop physiology. Marcel Dekker, Inc., New York. Pp. 627-644.
- Asie, K.V., 2004. *Matriconditioning* plus pestisida botani untuk perlakuan benih cabai terinfeksi *Collectotrichum capsici*: Evaluasi mutu benih selama penyimpanan. Tesis. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 97 hal.
- Basim E, Basim H, Dickstein ER, Jones JB. 2004. Bacterial cancer caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on greenhouse-grown tomato in the Western Mediterranean region of Turkey. *Plant Dis* 88 : 1043 - 1048.
- Bavykin SG *et al.* 2004. Use of 16S rRNA, 23 S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationship of *Bacillus cereus* group microorganism *Journal of Clinical Microbiology* 42(8): 3711-3730.
- Belitz HD, and Grosch W. 1999. *Food Chemistry*, Springer-Verlag. Berlin.
- Berry SZ, Madumadu GG, Uddin MR, Copplin DL. 1989. Virulence studies and resistance to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato germplasm. *Hortsci* 24:362-365.
- Biswas, K., I. Chattopadhyay, R.K. Banerjee, U. Bandyopadhyay. 2002. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*. (82) (11) 1336-1345.
- Bonn WG, & Mac Neill BH. 1983. Establishment and survival of doubly marked strain of *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* on tomato and other crops. *Phytopath.* 73, 363.
- Bowers, J.H., J.C. Locke. 2004. Effect of formulated plant extracts and oil on population density of *Phytophthora nicotiana* in soil and control of *Phytophthora blight* in the greenhouse. *Plant Dis.* 88:11-16.
- Brandl F. 2001. Seed treatment technologies, evolving the achieve crop genetic potential. Di dalam: Biddle AJ, editor. Seed Treatment Challengers & Opportunities. Symposium Proceedings no 76, North Warwickshire. BCPC hlm 3-18.

- Brown SE, Reilley AA, Knudson DI, Ishimaru CA. 2002. Genomic fingerprinting of virulent and avirulent strains of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Curr. Microbiol.* 44: 112-119.
- Burokienė D, Pulawska, and Sobiczewski P. 2005. Genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathol. Pol.* 38: 79-90.
- Burt S.2004. Essential oils, their antibacterial properties and potential applications in foods- a review, *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 94 No. 3, pp. 223-53.
- CAB *International*.2007. Crop Protection Compendium [CD-ROM]. Wallingford. Uk. CAB *International* 2 CD-ROM dengan penuntun di dalamnya.
- Chang RJ, and Pataky JK. 1992. Reduction in yield of processing tomatoes and incidence of bacterial cancer. *Plant Disease* 76 (8):905-809.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK. 1989. Epidemiology and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomato. *Phytopathol* 79:1168-1169.
- Chang RJ, Ries SM, Pataky JK. 1991. Dissemination *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by practices used to produce tomato transplants. *Phytopathol* 81:1276-1281.
- Chen C, Belanger RR, Benhamaou N, Paulitz TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Phytium aphanidermatum*. *Physiol Mol Plant Pathol* 56 : 13 – 23.
- Copeland LO, McDonald MB. 1995. Principles of Seed Science and Technology. Third edition. New York: Chapman & Hall.
- Crop Protection Compendium*. 2002. Distribution map for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (bacterial cancer of tomato).  
[http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp?](http://www.cabicompendium.org/cpc/datasheet.asp)
- De Jong J and Honma S. 1976. Evaluation of screening technique and determination of criteria for assessing resistance of *Corynebacterium michiganensis* in tomato. – *Euphytica* 25. 405-414.
- Departemen Pertanian Republik Indonesia. 2006. Keputusan Menteri Pertanian No. 38/Kpts/HK.060/I/2006. Jenis-jenis Organisme Pengganggu Tumbuhan Karantina (OPTK) Golongan I dan Golongan II (Kategori A1 dan A2). Jakarta: RI.

- Desai BB, Kotecha PM, Salunkhe DK. 1997. Seeds Handbook Biology, Production, Processing, and Storage. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Dickstein ER, Jones JB, Stead DE. 2001. Appendix automated techniques. In Schaad NW *et al.*, editor. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third Edition. APS Press. St. Paul Minnesota. Hlm 343-358.
- Direktorat Jenderal Bina Produksi Hortikultura. 2005. Budidaya Tomat. Direktorat Tanaman Sayuran, Hias dan aneka tanaman. Departemen Pertanian. Jakarta.
- Djarwanto dan Subagyo. 1993. Statistik Induktif. Cetakan ke-4. BPE Yogyakarta.
- Dorman HJD, Deans SG. 2001. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 88: 308-316.
- Dreier J, Bermpohl A, Eichenlaub R. 1995. Southern hybridization and PCR for specific detection of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* 85: 462-468.
- Dreier J, Meletzus D, and Eichenlaub. 1997. Characterization of the plasmid encoded Virulence region pat-1 of phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *MPMI vol 10 no. 2. The American Phytopathological Society*.
- Elenkov S. 1962. Effect of age of plants at the moment of infections on the development of bacterial cancer in tomatoes (engl. Summary). *Plovidiv Nauchnoizsled. Inst. Po Zelenchukovite Kult. Maritsa Izv.* 2 : 5 – 18.
- Emmatty DA, John CA. 1973. Evaluation of resistance to bacterial cancer of H 2990, a new tomato variety. *Plant Dis. Reprtr.* 57 : 584-586.
- Fatmi M, Schaad NW, Bolkan HA. 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Dis* 75 : 383-385.
- Fatmi M, Schaad NW. 1998. Semiselective agar medium for isolation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato seed. *J. Phytopathology*: 78; 121-126.

- Fatmi M, Schaad NW. 2002. Survival of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in infected tomato stems under natural field conditions in California, Ohio and Morocco. *Plant Pathology* 51: 149-154.
- Foster RL, Echandi E. 1973. Relation of age plants, temperature and inoculum concentration to bacterial cancer development in resistant and susceptible *Lycopersicum* spp. *Phytopathology*. 63: 773-777.
- Francen AAJM, Kaminga GC, Sbijders W, van der Zouwen PS, Birnbaum YE. 1993. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by immunofluorescence microscopy and dilution plating. *Neth J.PL. Pathology* 99: 125-137.
- Francis DM, Kabelka E, Bell J, Franchino B, St. Clair D. 2001. Resistance to bacterial cancer in Tomato (*Lycopersicon hirsutum* LA407) and its progeny derived from crosses to *L. esculentum*. *Plant Disease* 85: 1171-1176.
- Friedman M, Henika PR and Mandrell RE. 2002. Bacterial activities of plant essential oils and some of their constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric*. *Journal of Food Protectio.*, Vol. 65 No 10. Pp. 1545-60.
- Fuganti C, dan Serra S. 2000. Baker's yeast-mediated enantioselective synthesis of the bisabolane sesquiterpenes (\*)-curcuphenol, (\*)-xanthorrhizal, (-)-curcuquinone and (\*)-curcuhydroquinone. *J. Chen. Soc., Perkin Trans. 1.* 3758-3764.
- Gang D. 2008. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strain 4 16S ribosomal RNA gene. School of Life Sciences, Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology of Ministry of Education, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, PR China
- Gartemann KH, *et al.* 2008. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *J. Bacteriol.* 190 (6), 2138-2149

- Gitaitis RD, Beaver RW, Dhanvantari BN. 1992. Detection of *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* in tomato transplants. In: Saettler AW, Schaad NW, Roth DA (eds). Detection of bacteria in seed and other planting material. The American Phytopathological Society, Minnesota, USA: 116-122.
- Gitaitis RD, Beaver RW, Voloudakis AE. 1991. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in symptomless tomato transplants. *Plant Dis* 75:834-838.
- Gitaitis RD. 1990. Induction of hypersensitive reaction in four-o'clock by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis* 74:58-60.
- Gomez P, Cubillo D, Mora GA, and Hilje L. 1997. Evaluation of possible repellents for *Bemisia tabaci*. II. Botanical substances. *Manejo Integrado de Plagas* 46: 17-25.
- Gupta SK, PP Gupta, tP Yadava, and CD Kaushik. 1990. Metabolic changes in mustard due to *Alternaria* leaf blight. *Indian Phytopathol.* 4391: 64-69.
- Gutell RR, Larsen N, Woese CR. 1994. Lessons from an evolving rRNA 16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective. *Microb. Rev.* 58: 10-26.
- Habazar T, Mavridis A, and Rudolph K. 1987. Untersuchungen zur Resistenz von Tomaten gegen den Erreger der bakteriellen Welke, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Corynebacterium michiganense*). *Phytomed., Mitteil. Deutsch. Phytomed. Gesellsch.* 17(2):18
- Habazar T, Rifai F. 2004. Bakteri patogenik tumbuhan. Andalas University Press. Padang.
- Habazar T. 1990. Studi resistansi penyakit kanker bakteri yang disebabkan oleh *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada tanaman tomat. Fakultas Pertanian Universitas Andalas Padang.
- Hadas R, Kritzman GF, Gefen T, Manulis S. 2005. Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology* 54: 643:649.
- Hasan AA, Strider DL, Konsler TR. 1968. Application of cotyledonary symptoms in screening for resistance to tomato bacterial cancer and in host range studies. *Phytopath.* 58. 233-239.

- Hausbeck MK, Bell J, Medina-Mora C, Podolsky R, Fulbright DW. 2000. Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathol* 90:38-44.
- Hayward AC, Waterston JM. 1964. *Corynebacterium michiganense*. *Description of Pathogenic Fungi and Bacteria* No. 19. CAB International, Wallingford, UK.
- Herison C, Rustikawati, Sudarsono. 2007. Aktivitas Peroksidase, Skor ELISA dan Reaksi Ketahanan 29 Genotipe Cabai Merah terhadap Infeksi *Cucumber mosaic Virus* (CMV). *Jurnal Akta Agrosia* Vol. 10 (1). Pp:1-13.
- Horita M, Tsuchiya K. 2001. Genetic diversity of Japanese strains of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* 91 : 399-407.
- Hutchenson SW. 1998. Current concepts of active defense in plants. *Ann. Rev. Phytopathology* 36 : 59 – 90.
- Ilyas S dan Sudarsono. 2002. Incorporation of clove oil or fungicide in *matriconditioning* as seed treatment for infected hot pepper (*Capsicum annum* L). seed. *Second Workshop on Management of Seed Health of Important Vegetable Crop*: Bogor, 7-11 Oktober 2002. Bogor. IPB-Plant Research International, Enza Zaden B.V. The Netherlands. (tidak dipublikasikan).
- Ilyas S, Amiyarsi TS, Kadir. 2008. Metode Uji dan Teknik Peningkatan Kesehatan Benih Padi [Makalah]. Di dalam Sinkronisasi Pengembangan Mutu Benih. Balai Besar Pengembangan Pengujian Mutu Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura; Banten, 26-28 Agustus 2008. Hal 1-16 (tidak dipublikasikan).
- Ilyas S. 2005. Invigorasi Benih. Makalah Magang Vigor Benih, Bagian Ilmu dan Teknologi Benih. Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian IPB, Bogor, 6-12 Desember 2005.
- Ilyas S. 2006. Seed treatments using *matriconditioning* to improve vegetable seed quality. *Buletin Agronomi*. (34) (2) 124-132.
- Jahr H J, Dreier, Dietmar Meletzus, Rainer Bahro, Rudolf Eichenlaub. 2000. The Endo- $\beta$ -1,4-glucanase Cel A of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is a pathogenicity determinant required for induction of bacterial wilt tomato. St Paul, Minnesota. APS Press. MPMI Vol 13, NO 7, 2000: pp. 703-714.

- Jaya B. 1997. Botani tanaman tomat. di dalam: Duriat AS, Hadisoeganda WW, Permadi AH, Sinaga RM, Hilman Y, Basuki RS (editors). Teknologi produksi tomat. Balitsa Lembang: hlm 25-41.
- Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA. Editors 1993. Compendium of Tomato Diseases. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Keppler LD and Novacky. 1986. Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology* 76 (1) : 104 – 107.
- Keppler LD, Baker CJ, and Atkinson MM. 1989. Active oxygen production during a bacterial induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* 79 (9) : 794 – 978.
- Ke-Qiang CAO & van Bruggen AHC. 2001. Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans* [http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/1/0/caoqueqiang\(21\).pdf](http://gilb.cip.cgiar.org/downloads/1/0/caoqueqiang(21).pdf). (21-5-2004).
- Khan AA, Maquire JD, Abawi GS, Ilyas S, 1992. Matriconditioning of vegetable seeds to improve stand establishment in early field plantings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117 (1): 41 – 47.
- Klement Z, Rudolph K, Sands DC, Editors. 1990. *Methods in Phytobacteriology*. Budapest: Akademiai Kiado.
- Kontaxis DG. 1965. Leaf trichomes as avenues for infection by *Corynebacterium michiganensis*. *Phytopath.* 52. 1306.
- Kritzman G. 1991. A method for detection of seedborne bacterial diseases in tomato seeds. *Phytoparasitica* 19 (2): 133-141.
- Krueze JF, Suomlainen S, Paulin L, Valkonen JPT. 1999. Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the *gene* from *Streptomyces* spp. Causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland *Phytopathology* 89: 462-469.
- Lafontaine DIJ, Tollervey D. 2007. Ribosomal RNA. Wikipedia, free Encyclope dia. <http://www.wikipe dia/free.encyclopedia.html>
- Lee IM, Bartoszyk IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE. 1997. Phylogeny and classification of bacteria in the genera *Clavibacter* and *Rathayibacter* on the basis of 16S rRNA gene sequence analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2631-2636.
- Lee IM, Lukaesko LA, and Maroon CJM. 2001. Comparison of Dig-Labeled PCR, Nested PCR, and ELISA for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *spedonicus* in field-grown potatoes. *The American Phytopathologi cal Society*.

- Leidi EO, Gomez M, and del Rio LA. 1989. Peroxidase isozyme patterns developed by soybean genotypes in response to manganese and iron stress. *Biochemie Physiol. Pflanzen* 185 : 5 – 6.
- Lelliott RA, Stead DE. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. London: Blackwell Scientific Publications.
- Li X and De Boer SH. 1995. Comparison of 16S ribosomal RNA genes in *Clavibacter michiganensis* subspecies with other coryneform bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41 (10), 925-929.
- Louws FJ *et al.* 1998. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting: A rapid and effective method to identify *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathol* 88: 862-868.
- Louws FJ, Cuppels, DA. 2001. Appendix. Molecular techniques. Di dalam : Schaad NW. *et al.*, editor. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3<sup>rd</sup> Ed. APS Press. St. Paul Minnesota. Hlm 321-337
- Maidment C, Dembny Z, and King P. 1998. Investigation into the antibacterial properties of garlic using the disc assay method. *Journal of Biological Education*, Vol 32 No. 3, pp. 162-4.
- Maidment C, Dyson A, and Hayson L. 2006. A study into the antimicrobial effects of cloves (*Syzygium aromaticum*) and cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) using disc-diffusion assay. *Nutrition & Food Science*, Vol. 36 No. 4, pp. 225-230.
- Mansfeld-Giese K. 1987. Plant to plant transmission of the bacterial ring rot not pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Potato Res* 40 : 229-235.
- Marchesi MT *et al.* 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *App. Environ Microbiol.* 64: 795-799.
- Mattjik AA dan Sumertajaya M. 1999. Perancangan Percobaan. Jurusan Statistika. Institut Pertanian Bogor.
- Maude RB. 1987. Treatment of vegetable seeds. Di dalam : Jeffs KA, editor. *Seed Treatment*. Surrey: BCPC Publi. 239-259.
- Mavridis A. 1982. Untersuchungen zum Vorkomen bakterieller Krankheitserreger (*C.michiganensis* pv. *Michiganense* (E. F. (Smith) Jesen und *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Okabe) Young, Dye & Wilkey) an Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Griechenland, zur Erkennung der Resistenz und zum von *P.tomato* gebildeten Chlorose-ausloesenden Toxin. Diss.

Univ. Goettingen.

- Medina-Mora CM, Hausbeck MK, Fullbright DW. 2001. Bird's eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Disease* 85:88-91.
- Moffett ML, Fahy PC, Cartwright D. 1983. *Corynebacterium*. In: Fahy PC, Persley GJ (eds). *Plant bacterial diseases. A Diagnostic Guide*. London, UK: Academic Press: 45-65.
- Myung I-S, Kim D-G, AnnSH, LeeY-K and KimWG. 2008. First Report of Bacterial Cancer of Tomato Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Korea. *Plant Disease*. 92 (10), 1472.
- Neergaard P. 1988. *Seed Pathology*. Volume 1. New York: John Wiley & Sons. 1
- Novotny V *et al.* 2003. Colonising aliens, caterpillar (*Lepidoptera*) feeding on *Piper aduncum* and *Piper umbellatum* in rainforests of Papua New Guinea. *Ecol. Entomol.* 28:704-716.
- Nurdin A, Mulyana A, Suratno H. 2001. Isolation eugenol dari minyak daun cengkeh skala pilot plant. *Jurnal Sains dan Teknologi Indonesia*. Vol 3, No. 9, hal. 58-62.
- Orjala J, Mian P, Rali T, Sticher O, Gibbilimbols A-D. 1998. Cytotoxic and Antibacterial Alkenylphenols from *Piper gibbilimbum* *J.Nat.Prod.* 61. 939-941.
- Park JH *et al.* 2003. Chemopreventive effect of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza*. *Journal of Korean Association of Cancer Prevention*. 8(2) : 91-97.
- Pastrik KH, Rainey FA. 1999. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by PCR based techniques. *J. Phytopathol.* 147: 687-693.
- Paul PK, Sharma PD. 2002. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistance in barley against leaf stripe disease. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61 : 3-13.
- Peruanskii YV, Savich IM, and Tazhibaeva TL. 1991. Relative content and amino acid composition of the iso peroxidases in leaves of wheat and maize seedlings as criterion of resistance to low temperature stress. *Sel'skhokhozyais tvennaya Biologiya* 1 : 139 - 146. .

- Pino, J.A., R. Marbot, A. Bello, A. Urquiola. 2004. Essential oils of *Piper peltata* (L.) Miq and *Piper aduncum* L. from Cuba J. Essent. Oil Res. 16. 124-126.
- Quattara B, Simardi RKE, Holley RA, Piette GJ, Begin A. 1996. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Farmaco*. 51 : 539-540.
- Rali T, Wossa ST, Leach DN, Waterman PG. 2007. Volatile chemical constituents of *Piper aduncum* .L and *Piper gibilimum* C. DC (*Piperaceae*) from Papua New Guinea. *Molecules*. 12. 389-394.
- Rao MV, and Dubey PS. 1990. Biochemical aspects (antioxidants) for development of tolerance in plants growing at different low levels of ambient air pollutants. *Environmental Pollution*. 64 : 55 – 56.
- Rukayadi Y, Yong D, Hwang JK. 2006. *In vitro* anticandidal activity of xanthorrhizol isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57 : 1231-1234.
- Russel G E. 1978. Plant breeding for pest and diseases resistances. – In: *Studies in the Agricultural and food Sciences*. Butterworths, London.
- Sadjad S, Murniati E, Ilyas S. 1999. Parameter Pengujian Vigor Benih dari Komparatif ke Simulatif. Jakarta: Grasindo.
- Sahin F, Uslu H, Kotan R, Donmez MF. 2002. Bacterial cancer, caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, on tomatoes in eastern Anatolia region of Turkey. *Plant Pathology* 51: 399.
- Santos MS, Cruz L, Norskov P, Rasmussen OF. 1997. A rapid and sensitive detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seeds by polymerase chain reaction. *Seed Sci Technol* 25:581-584.
- Santos, T., E.C. Moreira, D.L. Kapan, M.A.C. Mierelles, M.N. Rossi-Bergmann, B. 1999. Selective effect of 2',6'-dehydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43. 1234-1241.
- Sasaki J, Chijimatsu M and Suzuki K. 1998. Taxonomic significance of 2,4-diaminobutyric acid isomers in the cell wall peptidoglycan of actinomycetes and reclassification of *Clavibacter toxicus* as *Rathayibacter toxicus* comb. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 : 403-410.

- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. *Laboratory Guide For Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Ed ke-3. St. Paul. Minnesota: APS Press.
- Siemonsma JS, Piluek K. 1994. Plant Resources of South-East Asia, Vegetables. Bogor: Prosea, no. 8.
- Silva HAS, Romeiro RSR, Macagnan D, Vicira BAH, Pereira MCB, Mounteer A. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in isozyme activities. *Biol Control* 29:288-295.
- Singh RK and Chaudhary BD. 1979. Biometrical Methods in Quantitative Genetics Analysis. Kalyani Publ., New Delhi.
- Stackebrandt E, Brambilla E, and Richert K. 2006. Gene sequence phylogenies of the family Microbacteriaceae. Brambilla E., Molecular Systematics, DSMZ, Inhoffenstrasse 7b, Braunschweig 38124, Germany. Unpublished.
- Steel RGD, and Torrie JH. 1981. Principles and procedure of statistics. A Biometrical Approach. 2<sup>nd</sup>. Ed. Mc Graw-Hill Intl. Book Co. London.
- Strider D L. 1969. Foliage blight phase of bacterial cancer of tomato and survival of *Corynebacterium michiganensis* in toxicants and in an air-dried condition. *Plant Dis. Repr.* 53. 864-868.
- Sumarti T. 2009. Pengembangan metode deteksi *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* pada benih tomat. Thesis. Departement Proteksi Tanaman, Institut Pertanian Bogor. 39p.
- Suslow TV, Schroth MN, Isaka M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathol.* 72:917-918.
- Sutariati GAK, Asie KV, Ilyas S, Sudarsono. 2005. Efektivitas daya hambat pestisida nabati terhadap pertumbuhan koloni *Colletotrichum capsici* secara *In Vitro*. *Agriplus.* 15 : 75-82.
- Suwanto A. 1994. Strategies in molecular biology techniques for studying phytopathogenic bacteria. *Biotrop Spec Publ* 54:227-232. Bogor: SEAMEO-BIOTROP.
- Takikawa Y and Yamamoto K. 2007. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated from *Solanum mammosum*. University, Faculty of Agriculture; Suruga-ku Ohya 836, Shizuoka, Shizuoka 422-8529, Japan. Unpublished.

- Torres-Santos EC *et al.* 1996. Anti-leishmanial effect of a pure chalcone isolated from *Piper aduncum* (*Piperaceae*). *Memorias di Instituto Oswaldo Cruz* Vol. 91 (Suplement). 18 p.
- Torres-Santos EC, Moreira DL, Kapan MAC, Mierelles MN, Rossi-Bergmann B. 1999. Selective effect of 2',6'-dehydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43. 1234-1241.
- Untari M. 2004. Pengaruh perlakuan minyak cengkeh terhadap tingkat kontaminasi cendawan patogenik tular benih *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butl et. Bisby dan viabilitas benih cabai merah (*Capsicum annum* L). Skripsi: Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor. 64p.
- Van Vaerenbergh JPC, Chauveau JF. 1987. Detection of *Corynebacterium michiganense* in tomato lot benih. *Bulletin OEPP/EPPO* 17: 131-138.
- Vance CP, Kirk TK, and Sherwood RT. 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Ann. Rev. Phytopathology* 18 : 259 – 288.
- Vasinauskienė M. 2002. Bacterial diseases of greenhouse-grown tomatoes. *Biologija (Viln.)* 1:29-31.
- Vasudevan P, Reddy MS. 2002. Role of preparation in enhancement of rice seedling growth and grain yields. Centre for Advanced Studies in Botany University of Madras Guindy Campus. Chennai. India. *Current Science*. Vol 83. No 9.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor T. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* : Innis MA, *et al* editor. *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press INC. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto. Hlm 315-322.
- Wu JR, and Zhang JL. 1990. Evaluating the cold resistance of apple trees by means peroxidase enzyme analysis. *J. Fruit Science.* 7 : 41 – 44.
- Yunitasari M, Ilyas S. 1994. Possible use of several solid carriers for matricconditioning of pepper (*Capsicum annum* L.). *Keluarga Benih* 5 (2): 29-34. (Indonesia).
- Yurina OV, Yurina TP and Anikina II. 1993. Peroxidase activity of leaves in cucumber as as a test for resistance to mildew. *Sel 'skokhozyaistvennaya Biol.* 1: 113-117.

- Zainal A, Anwar A, Khairul U, Sudarsono. 2008. Distribution of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in various tomato production centers in in Sumatera and Java. *Microbiology Indonesia*. 2(2) : 63-68.
- Zen K, Setiamiharja R, Murdaningsih T, Suganda. 2002. Aktivitas Enzim Peroksidase pada Lima Genotipe Cabai yang Mempunyai Ketahanan Berbeda terhadap Penyakit Antraknosa. *Zuriat* 13 (2) : 97-105.
- Zhou BW *et al.* 1992. Peroxidase in relation to varietal resistance to virus diseases in rapeseed (*Brassica napus*). *Oil crops of China* 2: 52-54.

## PROFIL PENULIS



Dr. Aprizal Zainal, S.P., M.Si. lahir di Toboh Apar Kec. Sintuk Toboh Gadang (Kab. Padang Pariaman, Sumbar) 09 April 1970. Telah menyelesaikan studi S1 Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Andalas tahun 1996 dan S2 Agronomi Pascasarjana IPB tahun 2003 serta S3 Doktor Agronomi Pascasarjana IPB tahun 2010. Dosen tetap Fakultas Pertanian Universitas Andalas, Menulis *book chapter* Mikroorganisme dan pemanfaatannya dalam berbagai bidang tahun 2010, Dedikasi untuk Anak Nagari

Kasus Nagari Campago Kec. V Koto Kampung Dalam Padang Pariaman tahun 2021. Mengikuti *Training course "Capacity Building for Breeding Techniques and Seed Technology for Crop Adaptation to Abiotic Stress Factors in Indonesia" Module 2: Breeding for Tolerance to Abiotic Stress Factors held in Bogor, between 14-18 October 2019. On-line refresher course "Management and Utilization of Genetic Resources for Improved Food Security in Indonesia" with a duration of 90 hours held between 6th September to 1st October 2021. Wageningen University and Research (WUR)-Plant Breeding , The Netherlands.*

# INDEKS

## A

aksesi, 34, 53, 54, 55, 56, 57,  
58, 59, 60, 61, 126, 129  
amplifikasi, viii, x, 4, 12, 34, 36,  
40, 44, 61

## B

bakteri, ix, xi, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10,  
11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20,  
21, 22, 24, 25, 26, 28, 29, 30,  
31, 34, 35, 36, 37, 40, 59, 65,  
66, 68, 69, 71, 73, 77, 81, 83,  
87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95,  
99, 100, 101, 106, 109, 110,  
113, 114, 124, 125, 126,  
127, 128, 130, 136  
benih, v, ix, x, xi, 2, 3, 4, 6, 8, 9,  
10, 14, 15, 16, 19, 20, 30, 59,  
60, 61, 67, 87, 88, 89, 90, 91,  
92, 93, 94, 95, 98, 99, 100,  
101, 102, 105, 106, 107,  
108, 109, 110, 111, 112,  
113, 114, 115, 116, 117,  
118, 119, 120, 121, 124,  
125, 127, 128, 129, 130,  
131, 142

## E

efektif, v, ix, 4, 11, 14, 15, 35,  
61, 65, 66, 69, 81, 84, 87, 91,  
92, 95, 98, 99, 100, 101, 106,

107, 108, 109, 120, 125, 127,  
129, 130  
efektivitas, 4, 15, 17, 88, 101,  
105, 107, 113, 121  
ekstrak, ix, x, xi, 4, 15, 16, 17,  
21, 73, 87, 88, 89, 90, 91, 92,  
93, 95, 96, 97, 98, 99, 100,  
101, 105, 106, 107, 108,  
109, 110, 112, 113, 115,  
117, 118, 120, 121, 127,  
128, 129, 130

## F

filogenetik, xi, 34, 38, 39, 57,  
58, 60, 61, 126  
fisiologis, 4, 11, 16, 19, 22, 26,  
27, 28, 30, 66, 83, 105, 106,  
107, 110, 126, 128, 129  
fragmen, x, 34, 39, 40, 41, 61

## G

gejala, v, viii, ix, 3, 8, 9, 13, 19,  
20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28,  
30, 31, 34, 44, 45, 67, 69, 70,  
71, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79,  
80, 81, 82, 124, 130  
gen, viii, x, xi, 4, 11, 12, 34, 35,  
36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 52,  
53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60,  
61, 83, 126, 129

genotipe, ix, 4, 14, 61, 65, 66,  
67, 71, 75, 76, 77, 78, 79, 80,  
81, 82, 83, 84, 127, 129

## H

hipersensitif, 13, 19, 22, 84  
homologi, 34, 38, 53, 54, 59,  
60, 61

## I

in vitro, ix, 4, 12, 87, 88, 89, 91,  
92, 95, 96, 97, 100, 101, 102,  
127, 128, 129  
infeksi, viii, ix, 9, 16, 19, 20, 21,  
22, 23, 26, 28, 30, 31, 32, 66,  
72, 75, 78, 82, 84, 87, 88, 90,  
94, 99, 100, 105, 106, 107,  
113, 114, 121, 127  
inokulasi, viii, ix, 4, 14, 28, 31,  
32, 61, 65, 66, 68, 69, 70, 71,  
72, 73, 74, 75, 76, 79, 80, 81,  
82, 84, 89, 90, 93, 94, 100,  
108, 115, 117, 118, 119, 127  
inokulum, viii, ix, 14, 59, 65,  
66, 68, 73, 74, 75, 81, 84, 88,  
129  
isolat, viii, ix, xi, 4, 10, 11, 19,  
21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29,  
30, 32, 34, 36, 37, 38, 44, 45,  
52, 55, 57, 59, 60, 61, 65, 71,  
80, 97, 108, 126, 127, 129

## K

ketahanan, viii, ix, 4, 13, 14,  
61, 65, 66, 70, 71, 72, 75, 76,

78, 79, 80, 81, 82, 83, 84,  
127

koloni, ix, 9, 10, 19, 21, 26, 28,  
73, 90, 93, 94, 96, 97, 98, 99,  
100, 109, 110, 125, 142

konsentrasi, viii, ix, 9, 11, 65,  
66, 68, 69, 71, 73, 74, 75, 81,  
84, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96,  
97, 99, 101, 102, 106, 108,  
119, 120, 127, 129

korelasi, ix, 4, 65, 66, 72, 79,  
80

## M

matriconditioning, 16, 17, 105,  
106, 107, 109, 112, 113,  
115, 116, 117, 118, 119,  
120, 121, 128, 129, 136,  
137, 143

mengeliminasi, 4, 16, 87, 88,  
95, 99, 100, 101, 102, 105,  
106, 107, 113, 119, 120,  
128, 129

## N

nabati, 17, 106, 107, 127, 142  
nukleotida, viii, x, xi, 4, 11, 34,  
38, 39, 41, 44, 45, 53, 54, 55,  
57, 58, 59, 60, 61, 126, 129

## P

patogen, v, 2, 3, 7, 8, 10, 12, 13,  
14, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 30,  
35, 36, 59, 60, 61, 62, 65, 66,

72, 82, 83, 87, 88, 99, 105,  
106, 114, 124, 125, 126, 127  
patogenesis, 10, 11, 19, 22,  
28, 31, 32, 68, 125, 126  
pengendalian, 14, 15, 36, 61,  
88, 99, 106, 124, 127, 130  
peroksidase, ix, 4, 65, 66, 67,  
72, 79, 80, 83, 84  
primer, 9, 11, 12, 34, 35, 36,  
37, 38, 39, 40, 41, 44, 59, 66,  
88

## R

rentan, 14, 22, 32, 65, 68, 70,  
76, 78, 79, 82, 84, 127, 129

## S

seedborne, 17, 59, 99, 106,  
124, 138  
sekuen, viii, x, xi, 4, 12, 34, 35,  
36, 38, 41, 44, 45, 52, 53, 54,  
55, 56, 57, 58, 59, 60, 61,  
126, 129  
sekuensing, 12, 34, 36  
spesifik, 12, 34, 35, 37, 38, 39,  
40, 41, 44, 60, 76, 125

## T

tomat, v, viii, ix, x, xi, 2, 3, 4, 6,  
7, 8, 13, 14, 15, 19, 20, 21,  
22, 23, 24, 25, 26, 28, 30, 31,  
32, 34, 36, 39, 40, 44, 45, 59,  
61, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71,  
72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79,  
80, 81, 82, 83, 84, 87, 88, 89,  
90, 92, 93, 94, 95, 98, 99,  
100, 101, 102, 105, 106, 107,  
108, 109, 110, 111, 112,  
113, 114, 115, 116, 117,  
118, 119, 120, 121, 124,  
125, 126, 127, 128, 129,  
130, 136, 137, 142  
transmitted, 2, 8, 87

## U

universal, 12, 13, 34, 36, 37,  
38, 40, 41, 44, 125

## V

varietas, v, viii, 3, 13, 14, 60,  
68, 70, 81, 124